DETERMINACIÒN DE LA ESTABILIDAD DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN HEMOCOMPONENTES ALMACENADOS EN CONDICIONES ESTÀNDAR DE BANCO DE SANGRE

Valerie Cárdenas Sánchez

Axel Vergel Hernández

Biología molecular – Virología

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica

Bogotá DC. – octubre 2023

DETERMINACIÒN DE LA ESTABILIDAD DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN HEMOCOMPONENTES ALMACENADOS EN CONDICIONES ESTÀNDAR DE BANCO DE SANGRE

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Químico Farmacéutico

Investigación

Félix Giovanni Delgado Tiria

Biología molecular – Virología

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica

Bogotá DC. – octubre 2023

Hoja de identificación

Título:	Determinación de la estabilidad del virus Chikungunya en hemocomponentes almacenados en condiciones estándar de banco de sangre
Grupo de investigación:	
Línea de Investigación:	
Institución (es) Participante (s):	Universidad El Bosque
Tipo de Investigación:	
Estudiantes:	Valerie Cárdenas Sánchez Axel Vergel Hernández
Director:	Félix Giovanni Delgado Tiria

Dedicatoria o lema

Agradecimientos

Tabla de contenido

Dedicatoria o lema 9
Agradecimientos 10
Tabla de contenido 11
Listado de tablas 13
Listado de figuras 13
Lista de Símbolos y abreviaturas 15
Resumen 16
Abstract 17
1. Introducción 1
2. Marco teórico 2
2.1 Arbovirus 2
2.2 Chikungunya 2
2.2.1 Células diana para la infección del Chikungunya 4
2.2.2 Epidemiología 4
2.2.3 Patogénesis 5
2.4 Seguridad transfusional 7
2.5 Transfusiones y arbovirus 8
3. Planteamiento del problema 9
4. Pregunta de investigación 10
5. Objetivos 11
5.1 Objetivo general del Anteproyecto 11
5.2 Objetivos específicos 11
6. Metodología 12
6.1 Población y muestras 12
6.2 Infección de CHIKV en unidad de plaquetas y glóbulos rojos 13

6.3 Detección molecular de virus Chikungunya y β-Actina en plaquetas y glóbulos rojos infectados, provenientes de donantes de sangre sanos....14
7. Resultados y análisis de resultados....18
7.1 Generación de curvas estándar para la unidad de plaquetas y glóbulos rojos 18
Generación de curva estándar para la cuantificación de CHIKV en la unidad de glóbulos rojos 19
8. Consideraciones éticas....26
9. Conclusiones 30
10. Recomendaciones 31
11. Anexos....32
12. Referencias bibliográficas....40

Listado de tablas

		Pág.
Tabla 1	Primers usados en la investigación	16
Tabla 2	Construcción de curva estándar	16
Tabla 3	Curva estándar CHIKV para cuantificación en plaquetas	18
Tabla 4	Ecuación de la gráfica junto a la correlación R2	19
Tabla 5	Curva estándar CHIKV para cuantificación en glóbulos rojos	19
Tabla 6	Cuantificación absoluta de CHIKV en plaquetas	37
Tabla 7	Cuantificación relativa en plaquetas	38
Tabla 8	Cuantificación absoluta de CHIKV en glóbulos rojos	39
Tabla9	Cuantificación relativa en glóbulos rojos	39

Listado de figuras

		Pág.
Figura 1	Nombre	**6**
Figura 2	Curva estándar TEXAS RED para cuantificación en plaquetas	**18**
Figura 3	Curva estándar TEXAS RED para cuantificación en glóbulos rojos.	**19**

Figura 4	Evolución de carga viral de CHIKV en plaquetas	**20**
Figura 5	Evolución absoluta de carga viral de CHIKV en glóbulos rojos	**21**
Figura 6	Evolución relativa de carga viral del CHIKV con respecto a la β-Actina en glóbulos rojos.	**22**
Figura 7	Evolución absoluta de carga viral de CHIKV en glóbulos rojos	**23**
Figura 8	Cq de β-Actina en el desarrollo experimental en glóbulos rojos	**24**
Figura 9	Evolución relativa de carga viral del CHIKV con respecto a la β-Actina en glóbulos rojos	**24**
Figura 10	Proceso para la infección de plaquetas con CHIKV	**32**
Figura 11	Proceso para la infección de glóbulos rojos con CHIKV	**32**
Figura 12	Rotulo de unidad de plaquetas	**33**
Figura 13	Parámetros hematológicos de la unidad de plaquetas recibida	**34**
Figura 14	Rótulos e información de unidad de plaquetas recibida por parte de la Cruz Roja Colombiana	**35**
Figura 15	Parámetros hematológicos de la unidad de plaquetas recibida	**36**

Lista de Símbolos y abreviaturas

BL: Glóbulos rojos

CHIKV: Chikungunya

Cq: Cycle quantification

GAG: Glucosaminoglicanos

IgG: Inmunoglobulina G

MOI Multiplicity of infection

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

Pb: Pares de bases

PHB1: Prohibitina 1

PL: Plaquetas

RPM: Revoluciones por minuto

RT-qPCR: Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction

SFB: Suero Fetal Bovino

TIM: T cell immunoglobulin and mucin domain

UFP: Unidades Formadoras de Placa

Resumen

El virus Chikungunya, es usual en regiones tropicales y subtropicales, y en las últimas décadas ha aumentado su incidencia donde se destaca su adaptación a entornos urbanos generando una mayor propagación y por ende, convirtiéndose en un foco de atención para la salud pública, llevando a establecer estrategias para contener la expansión [1]. A esta preocupación se suma que en diferentes lugares del mundo se han llevado a cabo estudios para determinar si los arbovirus se pueden transmitir a través de transfusiones sanguíneas, estos indican que existe un riesgo considerable de transmisión por esta vía [2]. Como bien se sabe Colombia es un país endémico y no cuenta con la información o reportes que determinen el gran riesgo al cual se expone la población receptora de hemocomponentes, la preocupación se centra en aquellos pacientes que llegan a ser asintomáticos o presentan síntomas leves y donan sangre sin saber que poseen una carga viral suficiente para infectar a un nuevo receptor.

En vista de lo planteado, se pretende plasmar documentación y generar concientización para este problema de salud pública, de tal manera para dar cumplimiento a nuestro objetivo se usaron unidades de glóbulos rojos y plaquetas suministradas por el banco de sangre, las cuales se infectaron con $2{,}5x10^3$ de virus Chikungunya para medir la carga viral a diferentes tiempos por medio de la técnica RT-qPCR. Los resultados obtenidos permitieron determinar que en la mayoría de los días la carga viral de Chikungunya decrecía, aunque en ciertos puntos de la cuantificación absoluta incrementaba, siendo una tendencia constante y acentuándose en los días 4 y 5 puesto que el análisis estadístico indicaba diferencias significativas exceptuando el día 6, ya que interrumpe la tendencia, pero evidenciando un valor similar al día 0, confirmando una posible replicación del genoma viral.

Palabras Clave:

Chikungunya, Carga viral, Glóbulos rojos, Plaquetas, Seguridad transfusional

Abstract

The Chikungunya virus is common in tropical and subtropical regions, and in recent decades its incidence has increased, highlighting its adaptation to urban environments, generating greater spread and therefore becoming a focus of attention for public health, leading to establish strategies to contain the expansion [1]. Adding to this concern is that studies have been carried out in different parts of the world to determine whether arboviruses can be transmitted through blood transfusions; these indicate that there is a considerable risk of transmission by this route [2]. As is well known, Colombia is an endemic country and does not have the information or reports that determine the great risk to which the population receiving blood components is exposed. The concern is focused on those patients who become asymptomatic or present mild symptoms and donate. blood without knowing that they have a sufficient viral load to infect a new recipient.

In view of the above, it is intended to document and generate awareness for this public health problem, in such a way to fulfill our objective, units of red blood cells and platelets supplied by the blood bank were used, which were infected with 2 .5x103 of Chikungunya virus to measure the viral load at different times using the RT-qPCR technique. The results obtained allowed us to determine that on most days the Chikungunya viral load decreased, although at certain points of the absolute quantification it increased, being a constant trend and accentuating on days 4 and 5 since the statistical analysis indicated significant differences except on day 6, since it interrupts the trend, but showing a value similar to day 0, confirming a possible replication of the viral genome.

Keywords:

Chikungunya, Viral load, Red blood cells, Platelets, Transfusion safety

1. Introducción

El virus Chikungunya es un arbovirus que se ha extendido durante los últimos años, se distingue por pertenecer al género alfavirus, dentro de los agentes responsables de transmisión se encuentra *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Este virus se caracteriza por causar fiebre, dolor muscular, cefalea y brote, aunque en mayor predominancia poliartralgias, siendo estas de gran preocupación puesto que llega a ser de gravedad en algunos casos, del mismo modo es importante recalcar la dificultad que conlleva el diagnostico entre los arbovirus ya que la mayoría de ellos suelen presentar síntomas iniciales similares causando un diagnóstico erróneo[3].

Ahora bien, como se menciona anteriormente los arbovirus se han extendido en los últimos años y traen consigo una gran preocupación en lo que compete a las transfusiones de sangre principalmente trasciende a aquellos donantes que son asintomáticos puesto que al no reconocer algún tipo de riesgo no se realiza control o hemovigilancia sobre el mismo, adicional a esto no se cuenta con información necesaria sobre la epidemiología de los diferentes agentes infecciosos y el impacto que llegan a tener, como un gran ejemplo se encuentra Colombia ya que no existen políticas de seguridad para este proceso, es así como se ha observado que hasta un 25% de donantes en zonas endémicas esta contagiado de algún arbovirus[4].

Luego de reconocer la importancia de controlar y obtener información de utilidad acerca del comportamiento de los arbovirus y específicamente del virus Chikungunya, el ensayo inicia con la obtención de los hemocomponentes en este caso una unidad de glóbulos rojos y una unidad de plaquetas, se procede a la infección de las unidades con CHIKV para poder realizar la respectiva detección, de modo que se logre determinar las variaciones de la carga viral del virus Chikungunya en los hemocomponentes almacenados en condiciones estándar de banco de sangre.[5]

2. Marco teórico

2.1 Arbovirus

Los arbovirus constituyen un grupo diverso de alrededor de 537 virus diferentes. Estos virus son principalmente transmitidos por artrópodos como mosquitos, garrapatas y moscas de la fruta, que se conocen como vectores virales. Estos vectores se caracterizan por su alimentación de tejido sanguíneo, por lo que se les denomina hematófagos Los arbovirus constituyen un grupo diverso de alrededor de 537 virus diferentes. Estos virus son principalmente transmitidos por artrópodos como mosquitos, garrapatas y moscas de la fruta, que se conocen como vectores virales. Estos vectores se caracterizan por su alimentación de tejido sanguíneo, por lo que se les denomina hematófagos [6], [7]

Los principales representantes de esta familia de virus incluyen el virus del Nilo Occidental, el Dengue, el Zika y el Chikungunya. Estos virus comparten una sintomatología inicial similar, lo que dificulta el diagnóstico adecuado, ya que presentan síntomas comunes como fiebre, erupción cutánea y cefalea

Con relación al virus Chikungunya, que es relevante para el propósito de este estudio, es importante destacar que el Chikungunya exhibe las características típicas de un arbovirus. Esto se debe a que su transmisión se lleva a cabo principalmente a través de las hembras de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. En Colombia, es especialmente común en las regiones de clima cálido, ya que estas áreas ofrecen las condiciones biológicas ideales para su propagación. Estas condiciones incluyen temperaturas elevadas, una presión atmosférica adecuada, un alto nivel de precipitaciones y una elevada humedad, factores que contribuyen significativamente a la proliferación del vector viral. [8]–[10]

2.2 Chikungunya

El virus Chikungunya, clasificado en la familia Togaviridae y en el género Alfavirus, se caracteriza por ser un virus de ARN monocatenario de sentido positivo. Su primera identificación se remonta a 1953, cuando se descubrió por primera vez en Tanzania.[11]

En cuanto a su estructura, el virus Chikungunya es un virus envuelto que presenta una simetría icosaédrica. Los viriones del virus tienen un diámetro de aproximadamente 70 nm y una masa

molecular de 5,2 × 106 Da. Están compuestos por glicoproteínas transmembranales E1 y E2 que forman parte de su estructura. La cápside viral está constituida por una bicapa lipídica que tiene su origen en el hospedero anterior. Además de todo lo mencionado, el virión contiene una única molécula de ARN.

El genoma del virus Chikungunya tiene una longitud aproximada de 12 kb y presenta dos marcos abiertos de lectura, uno de 7.424 nucleótidos y otro de 3.732 nucleótidos, separados por una región no codificante de 76 nucleótidos. Esta región no codificante se encarga de codificar las proteínas estructurales ubicadas en el extremo 3' del genoma, que incluyen la cápside, así como las proteínas de envoltura E1, E2 y E3. [12]

Por otro lado, en el extremo 5' del genoma se encuentran las proteínas no estructurales, denominadas nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. Además de esto, el genoma viral presenta una caperuza de metil-guanosina en su extremo 5' y una cola de poliadenina en el extremo 3'. [12]

En relación con las proteínas que facilitan la entrada del virus en la célula, E2 y E desempeñan un papel fundamental. Estas proteínas pertenecen al grupo de glicoproteínas transmembranales de tipo 1 y tienen la capacidad de formar heterodímeros, que a su vez se organizan en trímeros que recubren la superficie del virión. E2 juega un rol en el reconocimiento del receptor celular, mientras que E1 media la entrada del virus en la célula a través del proceso de endocitosis [12]–[14].

Mediante análisis filogenéticos de las proteínas presentes en el virus Chikungunya, se han identificado cuatro genotipos distintos de este virus: el genotipo de África oriental-central-meridional, el de África occidental, las estirpes del océano Índico y el genotipo asiático. Sin embargo, es importante señalar que la proliferación global del virus Chikungunya se atribuye principalmente a dos de estos genotipos: el genotipo asiático y el genotipo del océano Índico.

Estas cepas virales han desarrollado adaptaciones específicas que les permiten propagarse de manera más eficaz en los vectores disponibles. El virus del genotipo asiático ha demostrado una mejor adaptación al mosquito *Aedes aegypti*, mientras que el virus del genotipo del océano Índico presenta una mayor adaptación al mosquito *Aedes albopictus*. Estas adaptaciones son cruciales para entender la propagación y la dinámica de la enfermedad en diferentes regiones geográficas y para la formulación de estrategias de control y prevención. [6]

2.2.1 Células diana para la infección del Chikungunya

El virus Chikungunya presenta un amplio tropismo, lo que significa que tiene la capacidad de infectar una variedad considerable de tipos celulares. Esto se debe en gran parte a la versatilidad de la glicoproteína E2, que puede ser reconocida por múltiples receptores celulares. Entre los principales receptores que facilitan la infección se encuentran:

1. Prohibitina 1 (PHB1): Esta proteína receptora está presente en una amplia gama de tipos celulares, lo que le permite al virus Chikungunya infectar una variedad de células.

2. Molécula de adhesión celular Mxra8: Esta molécula es esencial para la entrada del virus en las células y se expresa en células epiteliales, mieloides y mesenquimales.

3. TIM-1 y miembros de la familia TIM: Los receptores TIM (T cell immunoglobulin and mucin domain) también juegan un papel importante en la entrada del virus Chikungunya en las células.

4. Glucosaminoglicanos (GAG), como el heparán sulfato: Estos componentes de la superficie celular también pueden servir como puntos de entrada para el virus.

Esta amplia gama de receptores permite al virus Chikungunya infectar una variedad de células en el cuerpo, lo que contribuye a su capacidad para causar enfermedades en diferentes tejidos y sistemas[15].

A través de la interacción con estos receptores, el virus Chikungunya es internalizado en la célula y se encuentra confinado en endosomas. Bajo el ambiente de pH ácido de los endosomas, el heterodímero E1-E2 se disocia, lo que da lugar a la exposición de la proteína de fusión E1. Esta exposición de E1 genera un poro de fusión que permite la liberación de la nucleocápside del virus en el citoplasma de la célula. Una vez en el citoplasma, la nucleocápside libera el ARN viral, iniciando así el proceso de replicación viral en la célula huésped. Este complejo proceso de internalización y liberación es fundamental para la infección del virus Chikungunya en las células hospedadoras[14], [16], [17].

2.2.2 Epidemiología

El virus Chikungunya es frecuente en regiones tropicales y subtropicales, y en las últimas décadas ha experimentado un aumento significativo en la incidencia de casos a nivel mundial. Este incremento se debe a la capacidad de los vectores responsables de la transmisión del Chikungunya, es decir, los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, para adaptarse a entornos urbanos. Además, el propio virus ha sufrido mutaciones que lo hacen más apto para infectar a estos vectores.[18]

Esta adaptación conjunta de los vectores y el virus ha desempeñado un papel crucial en la propagación del Chikungunya en áreas urbanas, lo que plantea un desafío significativo en términos de salud pública y enfatiza la necesidad de implementar estrategias efectivas de control y prevención para contener la expansión de la enfermedad.

El Chikungunya fue identificado por primera vez en Tanzania en 1952. Desde entonces, se han registrado varias epidemias a lo largo de los años, lo que ha facilitado su propagación a nivel mundial. En el contexto de América, el primer caso de Chikungunya se notificó en diciembre de 2013 en la parte francesa de la isla caribeña de San Martín. Posteriormente, en 2014, se registró el primer caso en Colombia, originado en el corregimiento de San Joaquín en Mahates, Bolívar. Estos eventos marcaron el inicio de la presencia del virus Chikungunya en la región y subrayaron la importancia de la vigilancia epidemiológica y el control de vectores para prevenir su propagación[19].

Desde entonces, en el contexto colombiano, el Chikungunya ha mostrado un comportamiento similar al del Dengue, ya que se establece en áreas geográficas similares. Esto se debe a la similitud en los vectores que transmiten ambos virus, lo que hace que sea común encontrar coinfecciones. Los departamentos más afectados por el virus suelen ser aquellos que se encuentran cerca de las costas, ya que estas áreas ofrecen las condiciones biológicas ideales para la proliferación de los vectores.

Según la Organización Mundial de la Salud, en la región de América se ha observado un preocupante aumento en los casos de Chikungunya. Entre el 1 de enero y el 4 de marzo de 2023, se notificaron un total de 113.447 casos junto con 51 fallecimientos, lo que representa un incremento de más de cuatro veces en comparación con el mismo período en 2022, cuando se reportaron 21.887 casos y 8 muertes.[20]

En el año 2022, el número de casos superó el promedio de los cuatro años anteriores (2018-2021), llegando a un total de 273.685 casos y 87 muertes en total, lo que significa el doble de casos y siete veces más fallecimientos que en 2021, cuando se registraron 137.025 casos y 12 muertes. Esta tendencia al alza subraya la importancia de abordar eficazmente la prevención y el control de esta enfermedad transmitida por vectores en la región[21]–[23].

2.2.3 Patogénesis

El nombre del virus Chikungunya, que significa 'caminar encorvado', proviene de las manifestaciones características de la enfermedad en los pacientes, quienes a menudo

experimentan síntomas artríticos incapacitantes que pueden persistir durante un período prolongado. Antes de que estos síntomas se manifiesten, el virus Chikungunya pasa por tres etapas distintas: la etapa intradérmica, la etapa sanguínea y la infección de los órganos susceptibles.

Cuando el vector, en este caso, el mosquito, realiza una picadura, los viriones del virus ingresan a las capas de la piel del paciente, dando lugar a una infección local. En esta fase, células como los fibroblastos, las células endoteliales y los macrófagos son propicias para la replicación del virus Chikungunya. Posteriormente, el virus se traslada a los nódulos linfáticos, desde donde accede a la circulación sistémica, alcanzando finalmente los órganos diana, que incluyen el hígado, los músculos, las articulaciones y el cerebro. Las articulaciones son los órganos más afectados en términos de salud del paciente, ya que el dolor y la inflamación pueden persistir incluso después de la fase aguda de la enfermedad. Además, existe la posibilidad de que la infección por el virus Chikungunya deje secuelas en forma de artralgia, que pueden durar desde meses hasta años. Estas características hacen que el virus Chikungunya sea una enfermedad de importancia clínica significativa y destaca la necesidad de una atención médica y un manejo adecuados para los pacientes afectados[24]

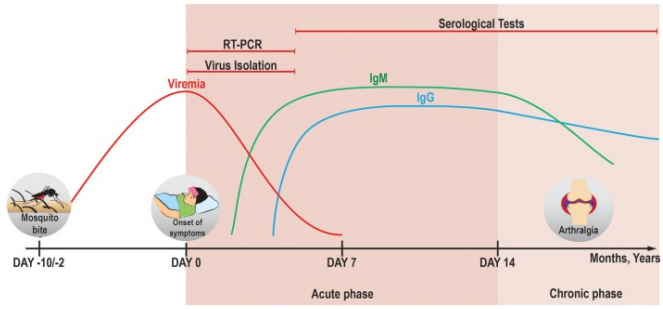


Figura 1 Fase aguda y crónica por infección de CHIKV [25]

2.3 Situación actual en bancos de sangre

Como bien se menciona, los centros de transfusión cuentan con un alto riesgo de trasmisión de arbovirus según lo reportado en diferentes regiones del mundo, teniendo en cuenta esto se determina que el virus dengue por medio de pruebas de anticuerpos IgG (Inmunoglobulina G) muestran una prevalencia general de 24,0%, aunque cuenta con mayor prevalencia en América ya que es casi de un 3,7%. Ahora bien, para el virus de Zika la prevalencia en América

nuevamente es alta con un valor de 7,4%, sin embargo, al hablar del virus Chikungunya que es el de interés en diversos estudios no se encuentra una prevalencia significativa, solo uno de ellos reporta un valor predominante de 5,5%[26].

Conforme a esto y sabiendo que la información sobre el virus Chikungunya en transfusiones de sangre es reducida, realmente hasta el momento no se ha reportado ningún caso de infección por CHIKV transmitida por transfusión, lo anterior puede llegar a presentarse por razones como la complejidad a la hora de discrepar la transmisión por transfusión y limitada hemovigilancia[27][28].

2.4 Seguridad transfusional

Las transfusiones de sangre son herramientas útiles para el tratamiento de diversas afecciones médicas, como la anemia, la trombocitopenia y las infecciones que pueden causar una disminución de los niveles de glóbulos rojos o plaquetas [29]. Su capacidad para salvar vidas y mejorar la salud de los pacientes es innegable. Sin embargo, es importante destacar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha alertado sobre la preocupante realidad de que una gran parte de la población no tiene acceso seguro y oportuno a transfusiones de sangre [29]Esta disparidad en el acceso a un recurso médico crucial subraya la necesidad apremiante de mejorar la disponibilidad y la distribución equitativa de las transfusiones sanguíneas en todo el mundo. En este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la implementación de actividades destinadas a garantizar la calidad y la seguridad en todas las etapas relacionadas con la sangre y sus componentes, incluyendo la recolección, el análisis, el procesamiento, el almacenamiento, la distribución y la administración de los hemocomponentes.

Dentro de estas actividades destinadas a asegurar la calidad de la sangre y sus derivados, se encuentra la detección de enfermedades infecciosas que pueden transmitirse a través de este medio. Entre las enfermedades comúnmente analizadas se incluyen el VIH, hepatitis B y C, sífilis, Chagas y Virus linfotrópico de células T humanas - HTLV. Estos procesos de detección son esenciales para garantizar la seguridad de las transfusiones de sangre y para prevenir la propagación de enfermedades infecciosas a través de este importante recurso médico [30]

En el ámbito local, en Colombia, el Decreto 1571 de 1993 establece las prácticas y los estándares que deben cumplir la Red Nacional de Bancos de Sangre para llevar a cabo el análisis de enfermedades infecciosas [31]. Sin embargo, es importante destacar que actualmente no se han establecido mecanismos o procedimientos para el tamizaje de arbovirus en este contexto.

2.5 Transfusiones y arbovirus

Se ha observado en diversos informes la identificación de infecciones por arbovirus a través de transfusiones sanguíneas. Esto se debe en parte al hecho de que un considerable número de pacientes, que pueden ser asintomáticos o presentar síntomas leves e indefinidos, donan sangre sin saber que poseen una carga viral lo suficientemente alta como para infectar a un nuevo paciente receptivo. Además, es importante señalar que no se ha establecido una correlación clara entre una viremia baja y la presencia de una infección asintomática. Se ha observado que tanto pacientes sintomáticos como asintomáticos pueden tener cargas virales significativamente elevadas, superando las $>10^8$ copias/mL. Este fenómeno se reportó durante la epidemia de Chikungunya en Puerto Rico en 2014. Estos hallazgos subrayan la importancia de mantener rigurosos estándares de seguridad en la donación y el procesamiento de sangre para prevenir la transmisión de arbovirus y otras enfermedades infecciosas a través de transfusiones[5]

Adicionalmente, se ha documentado que arbovirus como el dengue tienen la capacidad de persistir en los hemocomponentes y replicarse en ellos. Las principales hipótesis sugieren que en los hemocomponentes existen células que son aptas para que el virus persista en su interior [2], [32] Sin embargo, es importante destacar que no existen estudios concluyentes en cuanto a la capacidad de persistencia de otros arbovirus, como es el caso del Chikungunya.

Es relevante señalar que, aunque tanto el Dengue como el Chikungunya son arbovirus y comparten vectores de transmisión, pertenecen a géneros diferentes y, por lo tanto, a familias distintas. Esto sugiere que pueden tener comportamientos y características específicas en lo que respecta a su interacción con los hemocomponentes y su capacidad de persistencia en ellos.

3. Planteamiento del problema

Durante décadas, arbovirus como el Dengue, el Zika y el virus que es objeto de estudio en este trabajo, el Chikungunya, se han considerado enfermedades endémicas en ciertas regiones de Colombia debido al clima tropical propicio para la proliferación del vector del género Aedes [33]. Además, este virus puede ser transmitido por diversas vías, siendo las principales a través de los mosquitos vectores Aedes aegypti y Aedes albopictus.[14][34] Hasta la fecha, no se ha documentado transmisión vertical durante el embarazo, es decir, de la madre al feto, aunque existen informes en los que se ha registrado la transmisión del virus Chikungunya de la madre al recién nacido cuando la madre presenta fiebre unos días antes del parto. Por último, una vía adicional de transmisión es a través de transfusiones sanguíneas y sus hemocomponentes. Estas múltiples vías de transmisión subrayan la importancia de comprender y controlar la propagación de este virus en la población.[35], [36]

En Colombia, la falta de políticas de seguridad en las transfusiones sanguíneas que puedan prevenir la transmisión o vigilar la presencia del virus Chikungunya es motivo de preocupación. Esto plantea la posibilidad de que componentes sanguíneos infectados puedan ser transfundidos, como se evidenció en un estudio realizado por el Grupo de Virología de la Universidad El Bosque. Según este estudio, se encontró la presencia de arbovirus en hasta un 25% de las muestras obtenidas de donantes de sangre [2]. Además, se ha observado un aumento en los casos de Chikungunya en años anteriores, según diversos comunicados de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Esta situación pone de manifiesto la necesidad urgente de implementar medidas efectivas para garantizar la seguridad en las transfusiones sanguíneas y prevenir la propagación del virus Chikungunya en el país.[20]

Es importante destacar que, aunque las manifestaciones clínicas del Chikungunya no suelen ser letales, esto no implica que el virus no represente un problema significativo de salud pública. De hecho, esta enfermedad tiene la capacidad de afectar de manera considerable la calidad de vida de las personas que experimentan una viremia. Por esta razón, se lleva a cabo un análisis de la estabilidad del virus en unidades de glóbulos rojos y plaquetas, determinando el número de copias genómicas del virus presente en dichos hemocomponentes. Los datos resultantes proporcionarán información relevante sobre la cinética de la carga viral del Chikungunya, lo que contribuirá a mejorar la seguridad en el proceso de transfusiones sanguíneas.

4. Pregunta de investigación

Considerando el planteamiento del problema, surge la siguiente pregunta de investigación: **¿Cómo es la evolución de la carga viral del virus Chikungunya en los hemocomponentes?** Esta interrogante cobra relevancia debido a que el Chikungunya tiende a pasar desapercibido ante las entidades de control, ya que sus síntomas son similares a los de otras enfermedades y su tasa de mortalidad es baja. Además, existe la presencia de pacientes asintomáticos que pueden tener una viremia moderada, lo que dificulta la detección oportuna de posibles donantes infectados que podrían transmitir el virus.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general del Anteproyecto

- Evaluar posibles variaciones de la carga viral del virus Chicungunya en hemocomponentes almacenados en condiciones estándar de banco de sangre.

5.2 Objetivos específicos

- Analizar cambios en el tiempo de la carga viral del virus Chicungunya en glóbulos rojos obtenidos de donantes de sangre.
- Analizar cambios en el tiempo de la carga viral del virus Chicungunya en plaquetas obtenidas de donantes de sangre.

6. Metodología

6.1 Población y muestras

El estudio llevado a cabo en la elaboración de este proyecto se enmarca en la categoría de estudio observacional descriptivo. Para esta investigación, se utilizó una unidad de glóbulos rojos y una unidad de plaquetas, estas últimas obtenidas mediante el proceso de aféresis. La obtención de las unidades fue posible a través del convenio con el Banco de Sangre de la Cruz Roja (Código 130884467713, contrato 898-2019). Cabe destacar que la totalidad de los proyectos que surgieron a raíz de este convenio cuentan con la aprobación y el respaldo del comité de ética, como se evidencia en el Acta 003-2021, con fecha del 23 de febrero de 2021. Es esencial destacar que estas unidades, originarias de donantes de sangre sanos y suministrados por el Banco de Sangre de la Cruz Roja Colombiana, fueron enviadas al Grupo de Virología de la Universidad El Bosque, donde se llevaron a cabo los análisis y estudios necesarios para nuestra investigación. Es relevante subrayar que, durante todo este proceso, las unidades se mantuvieron en estrictas condiciones de almacenamiento, consistentes en 65 RPM (Revoluciones por minuto) y una temperatura controlada entre 20 y 26 grados Celsius.

Comentado [AVH1]:

Los donantes que participaron en el estudio cumplían con los criterios de salud establecidos en el capítulo III del Decreto 1571 de 1993 [31]. Estos criterios de salud son fundamentales para determinar si el donante es físicamente apto para someterse al procedimiento de extracción de tejido sanguíneo. La evaluación de la aptitud del donante incluye consideraciones como el peso corporal, la presión arterial y los niveles de saturación de oxígeno. Además, se analiza el perfil farmacológico del donante, es decir, se verifica qué medicamentos toma habitualmente, ya que esto podría tener implicaciones en el receptor de los hemocomponentes, potencialmente causando efectos adversos.

Adicionalmente, se lleva a cabo una evaluación para identificar cualquier patología que podría transmitirse a través de las transfusiones sanguíneas y que podría afectar al receptor de los hemocomponentes. Para ello, se realizan pruebas serológicas, conocidas como tamizajes, en las unidades de sangre extraídas. Estas pruebas están diseñadas principalmente para detectar la presencia de enfermedades como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la sífilis, la hepatitis B y la hepatitis C, con el fin de garantizar la seguridad y la salud de los pacientes receptores de los hemocomponentes. [37]

6.2 Infección de CHIKV en unidad de plaquetas y glóbulos rojos

Para iniciar la preparación del experimento, se utilizó una cosecha del virus Chikungunya (CHIKV) que tenía un título de $2.5x10^7$ UFP/mL. Dado que la cantidad de virus requerida para la alícuota era muy pequeña, fue necesario realizar una dilución intermedia, en medio Eagle modificado de Dulbecco, con suero fetal bovino(SFB) al 2% para obtener una concentración de $2.5x10^5$ UFP/mL que permitiera tomar volúmenes adecuados para infectar la unidad de plaquetas y glóbulos rojos. Luego, los hemocomponentes enviados por la Cruz Roja fueron recibidos y admitidos por el grupo de virología de la Universidad del Bosque. En este laboratorio, tanto las plaquetas como los glóbulos rojos se infectaron con el virus Chikungunya (CHIKV) a una concentración de 2.5×10^3 UFP/mL. Este proceso se explicará en detalle a continuación.

La infección de las plaquetas se llevó a cabo mediante un proceso que consistió en tomar un tubo Falcon de 50 mL, en el cual se depositaron 34.65 mL de plaquetas y se añadieron 0.35 mL de virus CHIKV con una concentración de $2.5x10^5$ UFP/mL. Este procedimiento se repitió una segunda vez para obtener un total de 70 mL de plaquetas infectadas con CHIKV, lo que generó una concentración final de $2.5x10^3$ UFP/mL.

Se tomaron los dos tubos falcon, cada uno de 35 mL de plaquetas infectadas y se agregaron 3mL de una alícuota de plaquetas infectadas con CHIKV $2,5x10^3$ UFP/mL en cada caja t12.5, en total se obtuvieron 21 cajas t12.5 con plaquetas infectadas. Estas cajas se almacenaron a temperatura ambiente con agitación constante a 60 RPM por un período de 7 días, en cada uno de los días de observación (desde el día de la infección hasta el día 6) se recolectaron 3 cajas t12.5 que contenían plaquetas infectadas (9 mL en total), las cuales fueron posteriormente almacenadas en los congeladores de virología a una temperatura de -80 °C [7].

Comentado [AVH2]: Contextualizar

Comentado [AVH3]:

En cuanto a los glóbulos rojos, el proceso comenzó con un título inicial de CHIKV de $2.5x10^7$UFP/mL. Se llevó a cabo una dilución intermedia mediante la toma de un tubo Falcon de 15 mL, en el cual se depositaron 7.92 mL de DMEM + SFB al 2%. Luego, se agregaron 0.08 mL (80 uL) de CHIKV con un título de $2.5x10^7$ UFP/mL, resultando en un título final de CHIKV de $2.5x10^5$UFP/mL, la cual fue nuestra dilución intermedia.

A continuación, se utilizó otro tubo Falcon de 50 mL, en el cual se depositaron 34.65 mL de glóbulos rojos y se añadieron 0.35 mL de la dilución de $2.5x10^5$UFP/mL CHIKV. Esto dio como resultado un volumen total de 35.00 mL. El procedimiento se repitió nuevamente para obtener un volumen final de 70 mL de glóbulos rojos infectados con CHIKV a un título de $2.5x10^3$ UFP/mL

Posteriormente se tomaron los tubos falcon con glóbulos rojos infectados con un título de $2.5x10^3$ UFP/mL, además se tomaron dos placas de 6 pozos, donde en cada uno de los pozos se adicionó una alícuota de 4 mL de glóbulos rojos infectados con CHIKV con un título de $2.5x10^3$ UFP/mL. En total se prepararon dos placas de 6 pozos, lo que resultó en 12 pozos infectados con CHIKV a una concentración de 2.5 $x10^3$ UFP/mL. Estas placas se colocaron en un refrigerador que mantuvo una temperatura de aproximadamente 4 grados Celsius durante 4 semanas. Semanalmente, se recolectaron las muestras de los pozos, que posteriormente se llevaron a congelación a -80 grados Celsius para su posterior almacenamiento.

6.3 Detección molecular de virus Chikungunya y β-Actina en plaquetas y glóbulos rojos infectados, provenientes de donantes de sangre sanos

Para comenzar el proceso de detección molecular, se descongelaron las alícuotas de las plaquetas y glóbulos rojos de los congeladores a -80℃, estas alícuotas provenían de las 3 réplicas que correspondían a cada uno de los 7 días de observación en el caso de las plaquetas y las dos replicas que correspondían de las 4 observaciones en el transcurso 21 días en los que se analizaron los glóbulos rojos. Para la extracción ácidos nucleicos que contenía la muestra, se empleó un kit de extracción de ARN viral de Qiagen[ ], siguiendo las especificaciones del fabricante, para esto se tomaron 140 µL de cada alícuota previamente descongelada. Al finalizar el proceso de extracción, se obtuvo un volumen final de elución 60 µL.

Comentado [AVH4]: Referencia

Para llevar a cabo la detección de virus CHIKV y β-Actina como gen de referencia, se utilizó una técnica de RT-qPCR de un solo paso. La RT-qPCR se realizó en un volumen final de 10 µL utilizando el sistema Luna Probe One-Step RT-qPCR. Se emplearon 5 µL de ARN de la muestra, con una concentración que osciló entre 60 y 80 ng/µL, además de una concentración de oligonucleótidos (Forward y Reverse) y sondas de 0,4 mM (tabla 1). El protocolo de amplificación constó de una etapa de transcripción a 55°C durante 15 minutos, seguida de una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos. Posteriormente, se realizaron 40 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, una unión de temperatura a 55°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C durante 30 segundos.

Cabe resaltar que los primers utilizados para detectar CHIKV, se seleccionó la región que codifica la glicoproteína E1 estructural con un amplicon esperado de 125 pares de bases (bp).[12][38] Se emplearon sondas de hidrólisis que contenían un fluorocromo acoplado, siendo el fluorocromo TEXAS RED el encargado de generar la señal detectable por el termociclador.

La construcción de la curva estándar, necesaria para la cuantificación absoluta de las copias genómicas de CHIKV, se llevó a cabo utilizando un plásmido estándar con una concentración conocida. En este caso, se empleó el plásmido CDZ para determinar el número de copias virales. Se realizaron varias diluciones del plásmido, abarcando un rango de concentraciones. La concentración más alta se encontraba en el CDZ-2, con una carga de $1.02x10^7$ copias genómicas por microlitro (µL), mientras que el CDZ-7 tenía $1.02x10^2$ copias genómicas/µL. Cada una de estas diluciones generó señales correspondientes en términos de valores de Cq (Ciclo Umbral). Una vez construida la curva estándar utilizando estas diluciones conocidas, se pudo interpolar y cuantificar los datos de CHIKV utilizando la ecuación lineal obtenida. Esto permitió realizar la cuantificación absoluta de las copias genómicas de CHIKV a través del software Excel.

Adicionalmente, también se realizó una cuantificación relativa como parte del estudio. Para ello, se utilizó la β-Actina utilizando sondas de hidrólisis acopladas con el fluorocromo HEX. Este enfoque nos permitió determinar la cantidad de células presentes en las alícuotas, ya que la β-Actina es una proteína que se encuentra exclusivamente en las células. Con los resultados obtenidos de la cuantificación de la β-Actina, se aplicó el método Livak, también conocido como el "método ΔΔCt". Este método es una herramienta analítica ampliamente utilizada en biología molecular para comparar los niveles de expresión génica entre muestras y condiciones experimentales diferentes, en este caso, para evaluar la cantidad relativa de células presentes en las muestras.[39]

Tabla 1 *Primers usados en la investigación*[40]

Primers							
Virus	**Forward** **5-´3**	**Reverse** **5´-3**	**Probe** **5´-3**	**Label** **5´**	**Quencher** **3´**	**Gene**	**Amplicon size** bp
[4]CHIKV	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC	AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG	TR	BHQ2	E1	125
hACT	GGATGCAGAAGGAGATCACTG	CGATCCACACGGAGTACTTG	CCCTGGCACCCAGCACAATG	HEX	BHQ1		90

Tabla 2 *Construcción de curva estándar*

Plásmido estándar	
CDZ-2	$1.02x10^{7}$ copias genómicas/µL
CDZ-3	$1.02x10^{6}$ copias genómicas/µL
CDZ-4	$1.02x10^{5}$ copias genómicas/µL
CDZ-5	$1.02x10^{4}$ copias genómicas/µL
CDZ-6	$1.02x10^{3}$ copias genómicas/µL
CDZ-7	$1.02x10^{2}$ copias genómicas/µL

6.4 Análisis estadístico

Con el objetivo de caracterizar la población de estudio, se utilizaron medidas de tendencia central, que incluyen promedio y desviación estándar (DE), lo anterior, basado en el estudio del supuesto de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Ahora bien, para evaluar si existían diferencias entre cada una de las observaciones de plaquetas (7 observaciones en un total de 7 días) y glóbulos rojos (4 observaciones en un total de 28 días), se utilizó la prueba de análisis de la varianza o ANOl con el objetivo de caracterizar la población de estudio, se utilizaron medidas de tendencia central, que incluyen promedio y desviación estándar (DE), lo anterior, basado en el estudio del supuesto de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Ahora bien, para evaluar si existían diferencias entre cada una de las observaciones de plaquetas (7 observaciones en un total de 7 días) y glóbulos rojos (4 observaciones en un total de 28 días), se utilizó la prueba de análisis de la varianza o ANOVA y el test de Kruskal-Wallis según fuera pertinente. Los análisis estadísticos serán realizados utilizando el paquete estadístico GraphPad versión 10.0.2.

7. Resultados y análisis de resultados

7.1 Generación de curvas estándar para la unidad de plaquetas y glóbulos rojos

Para comenzar, se crearon las curvas estándar correspondientes para determinar la carga viral del virus Chikungunya (CHIKV) tanto en las unidades de plaquetas como en las de glóbulos rojos. Estas curvas se basaron en un plásmido de referencia denominado CDZ, al cual se le realizaron diversas diluciones. Además, se emplearon una sonda de hidrólisis acoplado a un fluorocromo el cual es TEXAS RED, para capturar las señales necesarias y así generar las curvas de calibración. Durante este proceso, se logró obtener curvas estándar con coeficientes de determinación (R^2) adecuados.

Tabla 3. *Curva estándar CHIKV para cuantificación en plaquetas*

CURVA ESTANDAR PL TEXAS RED							
Well	Fluor	Target	Sample	Cq	Copias genómicas/µL	LOG copias genómicas/µL	Cq
B04	Texas Red	NSP4	CDZ-2	17,37	1,E+07	7,01	17,37
C04	Texas Red	NSP4	CDZ-3	21,79	1,E+06	6,01	21,79
D04	Texas Red	NSP4	CDZ-4	25,21	1,E+05	5,01	25,21
E04	Texas Red	NSP4	CDZ-5	28,91	1,E+04	4,01	28,91
F04	Texas Red	NSP4	CDZ-6	32,36	1,E+03	3,01	32,36
G04	Texas Red	NSP4	CDZ-7	36,64	1,E+02	2,01	36,64

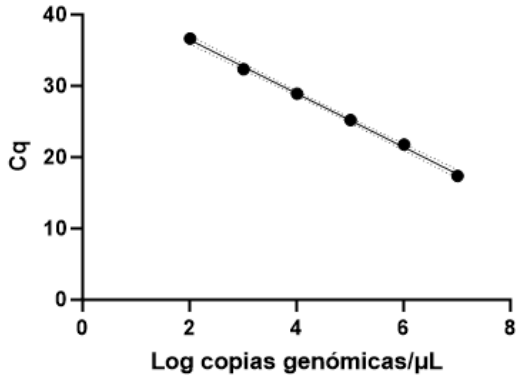


Figura 2 *Curva estándar TEXAS RED para cuantificación en plaquetas*

***Tabla 4**. Ecuación de la gráfica junto a la correlación R^2*

Datos	
Ecuación de la recta	y=-3,7648x+44,021
R^2	0,9985

Generación de curva estándar para la cuantificación de CHIKV en la unidad de glóbulos rojos

Tabla 5*: Curva estándar CHIKV para cuantificación en glóbulos rojos.*

CURVA ESTANDAR BC TEXAS RED						
Well	Fluor	Sample	Cq	copias genómicas/µL	Log copias genómicas/µL	Cq
B04	Texas Red	CDZ-1	15,17	1,E+08	8,0	15,17
A04	Texas Red	CDZ-2	18,12	1,E+07	7,0	18,12
D04	Texas Red	CDZ-4	21,44	1,E+06	6,0	21,44
E04	Texas Red	CDZ-5	25,46	1,E+05	5,0	25,46
F04	Texas Red	CDZ-6	28,37	1,E+04	4,0	28,37
G04	Texas Red	CDZ-7	32,28	1,E+03	3,0	32,28

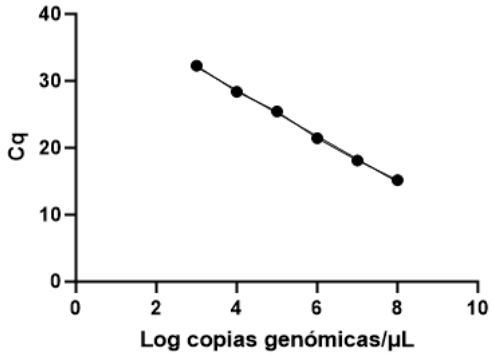


Figura 3 *Curva estándar TEXAS RED para cuantificación en glóbulos rojos.*

Tabla 7 *Ecuación de la gráfica junto a correlación R2*

Datos	
Ecuación de la recta	y=-3,4372x+42,41
R2	0,998

Cuantificación absoluta de copias genómicas de virus CHIKV en plaquetas

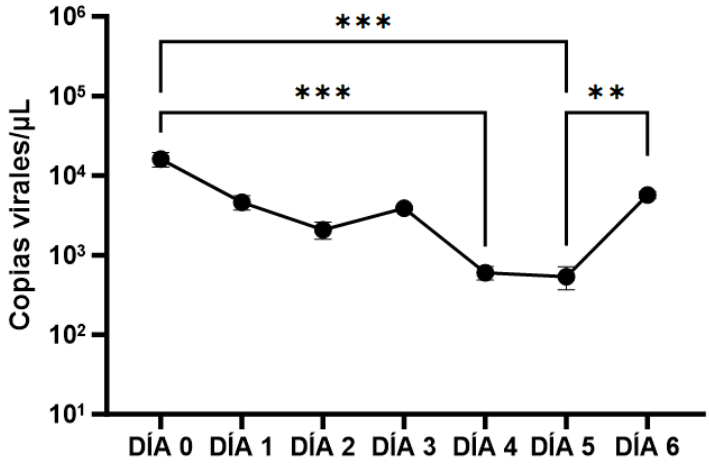


Figura 4 *Evolución de carga viral de CHIKV en plaquetas.*

Al inocular las células con CHIKV purificado, se determinó que el MOI (Multiplicity of infection) fue $6.52x10^{-6}$ es decir la cantidad de viriones que son agregados para la infección de las células, esto con el objetivo de simular las viremias asintomaticas que cursan algunos pacientes, cabe resaltar que en el CHIKV no se ha determinado una relación directa entre la carga viral que poseen los pacientes, y si presentan síntomas o no. [41]

Durante el seguimiento diario de las mediciones, se pudo observar que, en la mayoría de los días, la carga viral del CHIKV mostró una tendencia a la disminución. Aunque hubo pequeños incrementos en algunos momentos en la cuantificación absoluta, esta tendencia generalmente se mantuvo constante y se remarcó en los días 4 y 5, debido a que el análisis estadístico indico que las copias virales/µ eran significativamente diferentes con la excepción en el día 6, ya que interrumpió la tendencia, pero indicando que el CHIKV volvía a tener valor muy similar al día 0, lo que se confirma debido a que se expresa que el día 5 y día 6 son significativamente diferentes, es decir, se indica una posible replicación del genoma viral, se puede inferir que posible por la presencia de glóbulos blancos, ya que la familia de células inmunitarias son una de las principales células blanco del CHIKV como los macrófagos y las células dendríticas, además estas poseen la maquinaria celular para que exista la replicación viral. El Banco de Sangre de la Cruz Roja generó un reporte donde indicó que la concentración era de $0,1x10^3$ glóbulos blancos/µL. Por lo tanto, una mayor cantidad de glóbulos blancos podría contribuir a la replicación viral.

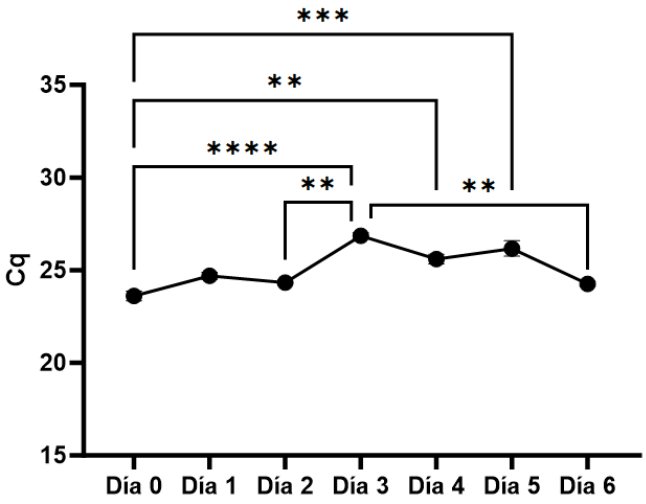


Figura 5 *Cq de β-Actina en el desarrollo experimental en plaquetas*

Dado los resultados obtenidos en la cuantificación absoluta del CHIKV, se procedió a realizar la cuantificación relativa. Sin embargo, antes de llevar a cabo esta cuantificación relativa, fue necesario determinar los valores de Cq (Cycle quantification) correspondientes a la β-Actina, que se utilizó como gen de referencia. La elección de la β-Actina como gen de referencia es importante, ya que nos permite relacionar su contenido con el número de células presentes en las muestras. Es importante tener en cuenta que las unidades de plaquetas son mezclas heterogéneas debido a la presencia de plaquetas y otras células, por lo que es muy probable que las alícuotas tomadas tengan diferentes concentraciones de células y, por lo tanto, de β-Actina. Estos valores de Cq de la β-Actina se utilizaron como referencia en la cuantificación relativa de CHIKV

Esto se puede observar claramente en la Figura #, donde se destaca que en el día 3 hay una diferencia significativa con respecto a los otros días. En este caso, el valor de Cq es elevado, lo que indica que hay una menor cantidad de células presentes en la muestra. Esta disminución en la cantidad de células afecta directamente el número de copias genómicas de CHIKV detectadas, ya que en este día el termociclador requirió más ciclos para detectar una señal de β-Actina que superara el umbral de detección establecido.

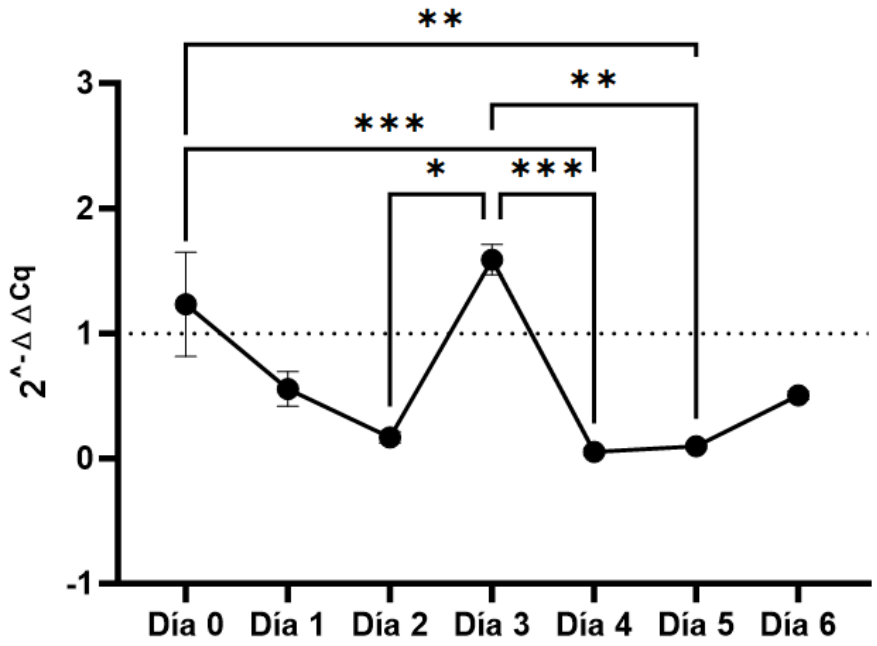


Figura 6 *Cuantificación relativa del CHIKV*

Visualizando la figura # que representa la cuantificación relativa con β-Actina, donde vemos un descenso significativo durante el transcurso de los días, hasta el día 3, donde se observa un aumento que es similar al día 0 existiendo un aumento de copias genómicas, es interesante que el día 3 en la cuantificación relativa es el que haya tenido la mayor concentración, debido a que en el día 3 fue donde la β-Actina tuvo un mayor Cq, es decir, según la cuantificación relativa este día tuvo la mayor concentración de copias genómicas/µL, para finalizar el día 6 vuelve a tener un nivel de copias genómicas no significativamente diferentes al día 0, siendo así un resultado coherente con la cuantificación absoluta.

Es importante realizar una aclaración fundamental. No se encontraron estudios previos disponibles que sean similares al análisis del virus Chikungunya (CHIKV) en plaquetas, por lo que se realizó una comparación con el virus del Dengue. A pesar de que estos dos virus comparten muchas similitudes en su estructura y patogenia, es crucial destacar que pertenecen a géneros y familias virales diferentes.

Comentado [AVH5]: Al final del analisis

Resultados glóbulos rojos

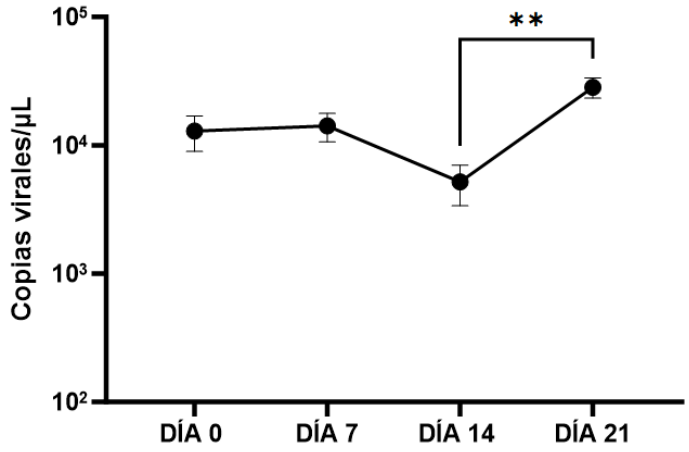


Figura 7 *Evolución absoluta de carga viral de CHIKV en glóbulos rojos*

En el caso de los glóbulos rojos se calculó con los datos suministrados por el Banco de Sangre de la Cruz roja, el resultado arrojado nos indica que la muestra de glóbulos rojos fue infectada con un MOI de $4.1x10^{-7}$ para el desarrollo de la investigación.

Posteriormente, se interpoló los datos de Cq de las muestras inoculadas con CHIKV, generando la figura 7 que describe el comportamiento del CHIKV en los glóbulos rojos a una temperatura de 2 grados Celsius, con relación a los resultados obtenidos en la parte experimental con glóbulos rojos, se pudo observar un comportamiento mucho más estable en comparación con las plaquetas. A lo largo del período de estudio, nunca se observó una concentración viral menor a 10^3 copias virales por microlitro (µL), y en el día 21 se evidenció un leve incremento en la carga viral a comparación del día 14 lo cual nos inducir que el genoma viral se replica.

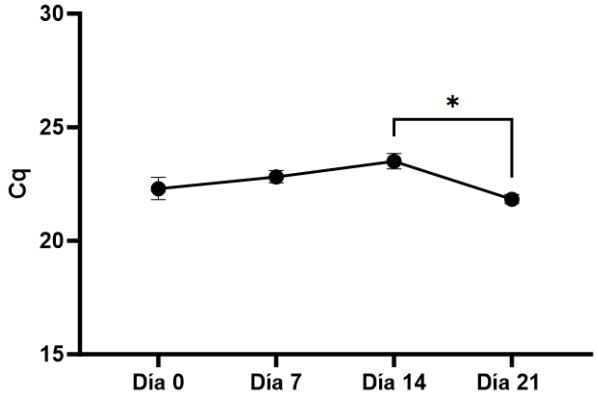


Figura 8 *Cq de β-Actina en el desarrollo experimental en glóbulos rojos*

En la cuantificación de β-Actina se obtuvo un comportamiento con menos oscilaciones, es decir, el rango de los Cq fue menor a comparación de la cuantificación llevada en plaquetas, siendo así los únicos datos significativamente diferentes los del día 14 y 21, lo cual es positivo, ya que, la cantidad de células se mantuvo similar entre los muestreos, es decir, la variación fue baja.

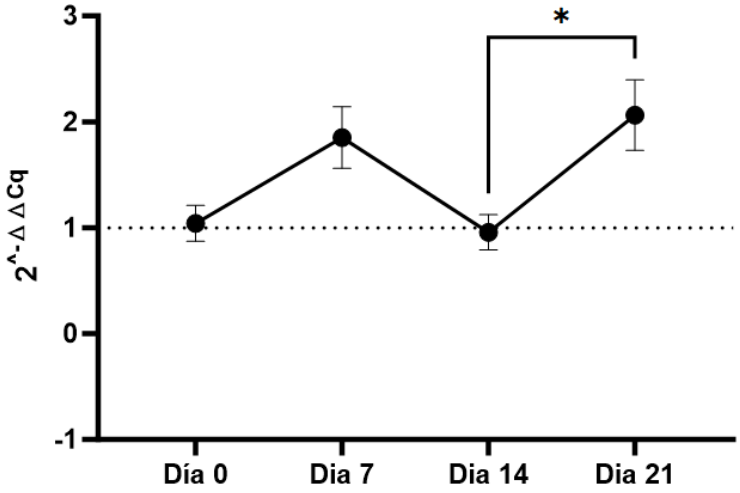


Figura *9* *Evolución relativa de carga viral del CHIKV con respecto a la β-Actina en glóbulos rojos.*

Para finalizar se desarrolló la cuantificación relativa, la cual, dio como resultado que el virus permanece estable los días ,7 y 14 con respecto al día 0, pero se confirma el leve aumento del genoma de CHIKV entre el día 14 y 21. Este hallazgo genera ciertas incertidumbres, ya que, según los datos proporcionados por la Cruz Roja, se indicaba que había un nivel cercano a cero de glóbulos blancos en las unidades de glóbulos rojos, cabe resaltar que la mayoría de las células susceptibles a la infección por el CHIKV son parte del sistema inmunológico, la situación actual es similar en otros virus como el Dengue, donde se genera la hipótesis estos virus pueden tener la capacidad de infectar otras células que no pertenezcan a su blanco principal de infección, junto a remanentes de células que sean aptas para la infección por parte del CHIKV[2]. Este comportamiento podría deberse a varios factores, como la temperatura de almacenamiento, que, aunque no es la óptima para el CHIKV, podría permitir su conservación, por la disminución de la cinética de degradación Esto concuerda con un estudio llevado a cabo en Marcella, Francia, donde el genoma del CHIKV tuvo la capacidad de permanecer por un tiempo prolongado en condiciones de 4°C en ausencia de luz, lo cual indicaría que, a pesar de ser un virus de ARN, el genoma de estos posee cierta estabilidad en el tiempo[42]. Estos resultados plantean interrogantes importantes que requieren una investigación más profunda para comprender completamente el comportamiento del virus en este contexto.

8. Consideraciones éticas

El desarrollo de este estudio experimental tuvo componente ético debido a que el suministro de hemocomponentes es limitado por el numero de donantes aptos, por ello aplicamos metodologias óptimas para disminuir el consumo de reactivos usados.[43]

CONSENTIMIENTO INFORMADO ESPECÍFICO

ESTUDIO

"DETECCIÓN DE VIRUS DENGUE Y OTROS ARBOVIRUS EN DONANTES DE SANGRE EN COLOMBIA: PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS VIRALES AISLADAS"
(Código 130884467713, contrato 898-2019)

Investigador Principal
Félix Giovanni Delgado Tiria, Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá D.C.

Apreciado (a) donante:

Usted está invitado(a) a participar en un estudio de investigación, debe decidir si quiere participar o no. Tome su tiempo para decidirlo. Lea cuidadosamente este documento y pregúntele al responsable del estudio cualquier inquietud que tenga. El estudio es realizado por el Grupo de Virología de la Universidad El Bosque y el Banco Nacional de Sangre de la Cruz Roja Colombiana.

¿Por qué se está haciendo este estudio?
Los virus dengue, Zika y Chikungunya son transmitidos a través de la picadura de mosquitos infectados. En Colombia, se presenta una elevada transmisión de estos virus en varias zonas del país. Algunas personas pueden tener algunos de estos virus en su sangre y no tener ningún síntoma o manifestación, pudiendo incluso donar sangre y transmitirlos al receptor de la transfusión, sin saberlo. En la actualidad, en Colombia no se realizan pruebas de laboratorio para la detección de estos virus en la sangre donada. El objetivo de este estudio es determinar la frecuencia con la cual estos virus se encuentran en la sangre de donantes voluntarios de sangre en Colombia.

¿Que tendré que hacer? ¿Cuáles son mis requerimientos?
Si usted acepta participar en este estudio, se le tomará una muestra adicional de sangre venosa del brazo en un tubo de 7 ml, la cual servirá para realizar las pruebas de detección de los virus dengue, Zika y Chikungunya. En caso de que usted resulte positivo para alguno de estos tres virus, será contactado telefónicamente por el banco de sangre, dos semanas después de la donación de sangre, para informarlo al respecto y para realizarle una encuesta relacionada con la posible exposición al (los) virus.

Acta 003-2021 del 23 de Febrero de 2021

Nadia Yadira Castaeda G.

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Comité Institucional de Ética en Investigación

En el caso específico de resultar positiva la prueba de detección de virus Zika, debido a que este virus también puede transmitirse por contacto sexual y cuando se produce infección en mujeres embarazadas existe el riesgo de malformaciones al feto, se tomarán las siguientes medidas adicionales:

1. Usted no podrá donar sangre dentro de los 120 días después de hallado el virus.
2. La sangre que usted donó será descartada.
3. Si alguno de los componentes de la sangre que usted donó fue transfundido, el servicio transfusional y el médico tratante que ordenó la transfusión serán contactados por parte del banco de sangre para informar del resultado positivo para virus Zika, para que se realice la respectiva investigación en el receptor de la transfusión, con especial énfasis en mujeres gestantes dado el riesgo de malformaciones graves en el feto.

¿Cuántas personas participarán en esta investigación?
Se escogerán aleatoriamente un total de 1200 donantes que asisten a los 6 bancos de sangre de la red de la Cruz Roja Colombiana.

¿Puedo retirarme de la investigación, de forma voluntaria, en cualquier momento?
Si, usted tiene el derecho de revocar este consentimiento informado en cualquier momento y de forma voluntaria, sin la necesidad de dar una razón especial. El retiro de esta investigación antes del tiempo programado, no le generará ninguna consecuencia negativa sobre su salud.

¿Cuáles son los riesgos o incomodidades asociados a esta investigación?
La toma de la muestra de sangre se realizará por parte de un(a) enfermero(a) con experiencia en el procedimiento y siguiendo todas las precauciones para conservar su integridad. Los riesgos más frecuentes de este procedimiento son dolor, inflamación y hematomas en la zona de la punción. Estos son los mismos riesgos que se tienen con el procedimiento de la donación de sangre y para este estudio sólo se necesitará un tubo de sangre adicional.

¿Obtendré algún beneficio al participar en esta investigación?
No habrá ningún beneficio económico directo para usted, pero en caso de que resulten positivas las pruebas de detección de los virus dengue, Zika o Chikungunya en su muestra, le será informada esta situación y no tendrá ningún costo para usted.

¿Cómo se va a garantizar la privacidad y confidencialidad de mis datos personales?
Toda su información personal y clínica será tratada bajo estricta confidencialidad. Sólo personal autorizado por el investigador principal del estudio podrá tener acceso a sus datos personales. En caso de resultar positivo para alguno de los virus estudiados, este resultado será notificado al Sistema Nacional de Hemovigilancia SIHEVI, como parte de los procedimientos estándares para bancos de sangre vigentes en Colombia.

¿Qué hago si tengo alguna pregunta o problema?
Si tiene alguna inquietud sobre el estudio o si previa aceptación de ingreso al estudio decide retirarse, puede contactarse con los investigadores del estudio:

1. Felix Giovanni Delgado Tiria.
   Investigador principal. Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá D.C.
   Teléfono: 6489000 extensión 1209. Correo: fdelgadot@unbosque.edu.co
2. Adriana del Pilar Urbina B.
   Coinvestigadora. Banco Nacional de Sangre, Cruz Roja Colombiana, Bogotá D.C.
   Teléfono: 6607913. Correo: adriana.urbina@cruzrojacolombiana.org

INFORMACIÓN DE CONTACTO DEL COMITÉ DE ÉTICA

Comité Institucional de Ética en Investigación, Universidad El Bosque, Bogotá D.C.
Teléfono: 6489000 extensión 1520. Correo: comiteetica@unbosque.edu.co

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio **"DETECCIÓN DE VIRUS DENGUE Y OTROS ARBOVIRUS EN DONANTES DE SANGRE EN COLOMBIA: PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS VIRALES AISLADAS" (Código 130884467713, contrato 898-2019).**

Si usted autoriza su participación, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.

Yo, _____, mayor de edad, residente en _____. Identificado (a) con CC No. _____, declaro que me han informado detalladamente y he comprendido los propósitos, procedimientos, riesgos y beneficios relacionados con el estudio, y que tuve la oportunidad de que mis dudas fueran aclaradas.

_____ Acepto voluntariamente mi participación en este estudio.

_____ Acepto que mi información personal, clínica y socio-demográfica, los resultados de las pruebas realizadas y mi muestra de sangre, sean almacenadas y utilizadas en un futuro para la realización de pruebas adicionales en investigaciones relacionadas con virus dengue, Zika, Chikungunya u otros arbovirus.

_____

Firma de la persona que otorga el consentimiento.

Cédula de ciudadanía. No. _____

Fecha: Día (_____) Mes (_____) Año: (_____)

Nombre completo del profesional que obtuvo el consentimiento:

_____

Firma del profesional que obtuvo el consentimiento:

_____

C.C. No. _____

Testigo 1 (puede ser otro donante de sangre presentes en la jornada de donación):

Nombre: _____

C.C. No. _____

Firma: _____

Testigo 2 (puede ser otro donante de sangre presentes en la jornada de donación):

Nombre: _____

C.C. No. _____

Firma: _____

9. Conclusiones

- Basándonos en los resultados obtenidos en la investigación, podemos concluir que el genoma viral del Chikungunya tiene la capacidad de persistir a lo largo del tiempo, experimentando cambios leves en su concentración tanto al aumentar como al disminuir en condiciones de almacenamiento de bancos de sangre, tanto en plaquetas como en glóbulos rojos.
- Gracias a la revisión bibliográfica, concluimos que la información acerca de los riesgos de transmisión del Chikungunya en transfusiones sanguíneas es limitada. Además, se desconoce la estabilidad de este en los tiempos de almacenamiento, por ende, es pertinente impulsar la investigación en el contexto colombiano por nuestra condición de país endémico, con la búsqueda de tomar acciones preventivas efectivas que eviten la afectación de la calidad de vida de los pacientes receptores de los hemocomponentes.

10. Recomendaciones

- En futuras investigaciones podemos recomendar el uso de bolsas pediátricas, con el objetivo de tener condiciones similares a las que se encuentran estandarizadas en el Banco de Sangre de la Cruz Roja. Este enfoque podría ofrecer varias ventajas significativas en el contexto de la investigación sobre la transmisión del Chikungunya.
- Solo si la situación de los Bancos de Sangre es adecuada y se tiene un alto nivel de reservas de hemocomponentes que no afecte al suministro hacia los donantes, se podrían realizar más replicas en los experimentos para tener una mayor robustez estadística.
- Por la naturaleza del estudio, nosotros solo pudimos identificar la presencia del ARN viral de Chikungunya en las muestras, lo cual no nos permite concluir si el virus se mantiene con la capacidad de infectar nuevas células, para ello es necesario utilizar metodologías como el paqueo en posteriores investigaciones.

11. Anexos

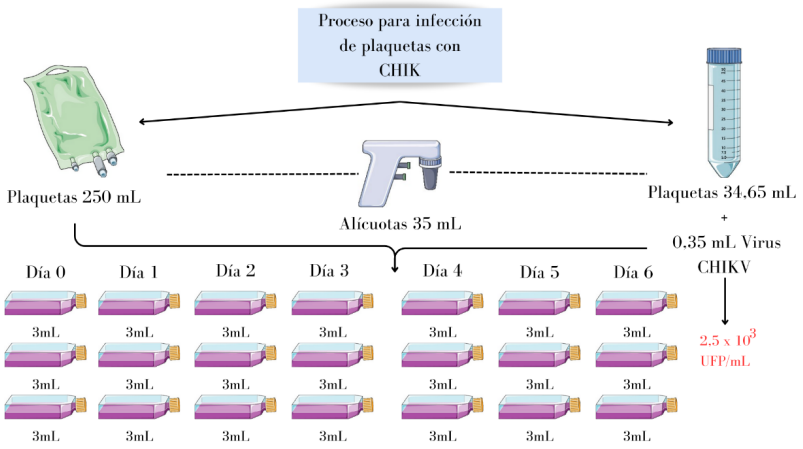


Figura 10 *Proceso para la infección de plaquetas con CHIKV*

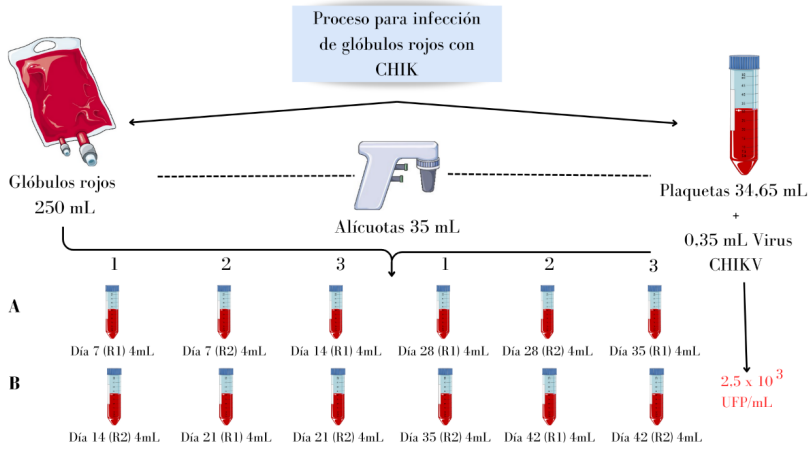


Figura 11 *Proceso para la infección de glóbulos rojos con CHIKV*

Rótulos e información de unidad de plaquetas recibida por parte de la Cruz Roja Colombiana

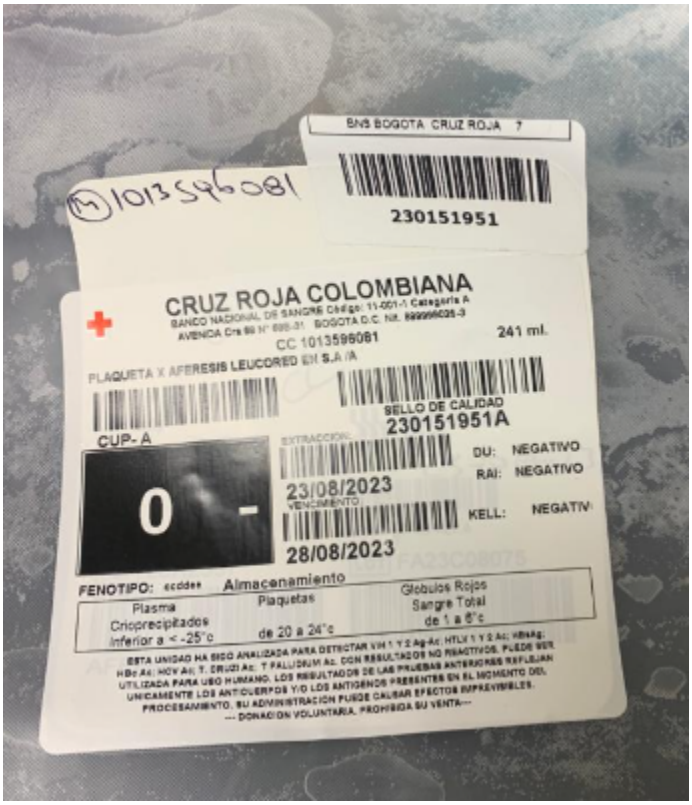
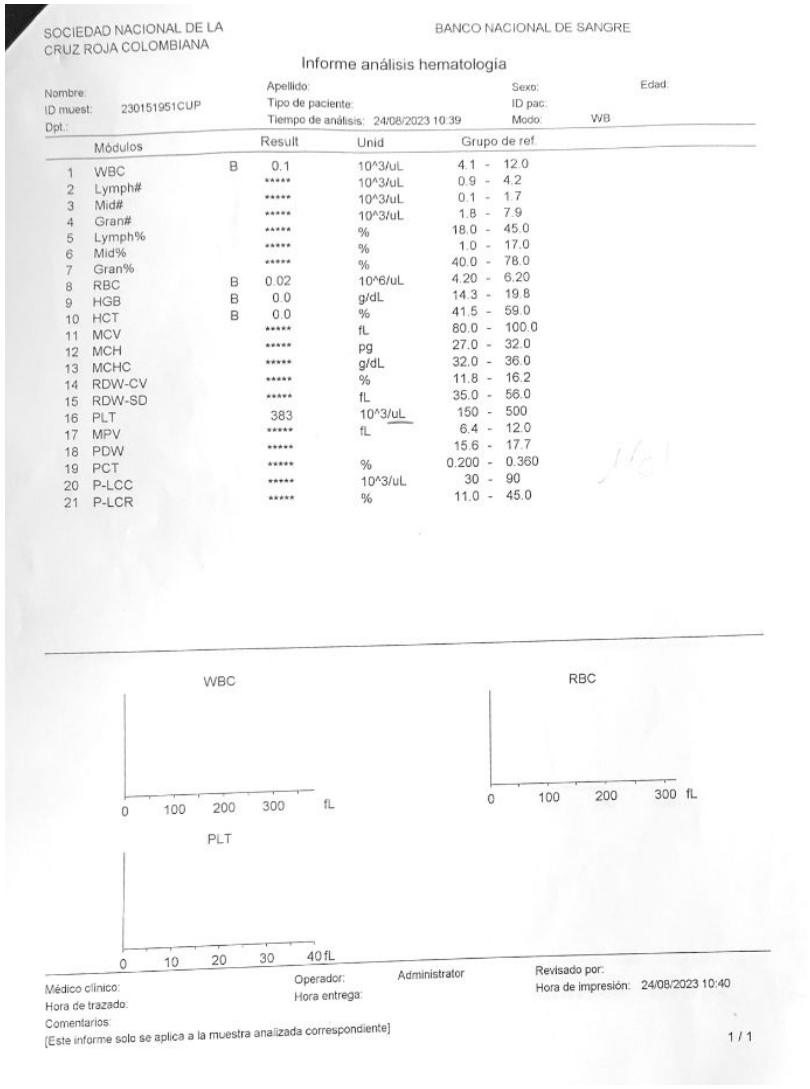


Figura 12 *Rotulo de unidad de plaquetas*



SOCIEDAD NACIONAL DE LA CRUZ ROJA COLOMBIANA

BANCO NACIONAL DE SANGRE

Informe análisis hematologia

Nombre:
ID muest: 230151951CUP
Dpt.:

Apellido:
Tipo de paciente:
Tiempo de análisis: 24/08/2023 10:39

Sexo:
ID pac:
Modo: WB

Edad:

	Módulos		Result	Unid	Grupo de ref.
1	WBC	B	0.1	10^3/uL	4.1 - 12.0
2	Lymph#		*****	10^3/uL	0.9 - 4.2
3	Mid#		*****	10^3/uL	0.1 - 1.7
4	Gran#		*****	10^3/uL	1.8 - 7.9
5	Lymph%		*****	%	18.0 - 45.0
6	Mid%		*****	%	1.0 - 17.0
7	Gran%		*****	%	40.0 - 78.0
8	RBC	B	0.02	10^6/uL	4.20 - 6.20
9	HGB	B	0.0	g/dL	14.3 - 19.8
10	HCT	B	0.0	%	41.5 - 59.0
11	MCV		*****	fL	80.0 - 100.0
12	MCH		*****	pg	27.0 - 32.0
13	MCHC		*****	g/dL	32.0 - 36.0
14	RDW-CV		*****	%	11.8 - 16.2
15	RDW-SD		*****	fL	35.0 - 56.0
16	PLT		383	10^3/uL	150 - 500
17	MPV		*****	fL	6.4 - 12.0
18	PDW		*****		15.6 - 17.7
19	PCT		*****	%	0.200 - 0.360
20	P-LCC		*****	10^3/uL	30 - 90
21	P-LCR		*****	%	11.0 - 45.0

Médico clínico:
Hora de trazado:
Comentarios:
[Este informe solo se aplica a la muestra analizada correspondiente]

Operador: Administrator
Hora entrega:

Revisado por:
Hora de impresión: 24/08/2023 10:40

1 / 1

Figura 13 *Parámetros hematológicos de la unidad de plaquetas recibida*

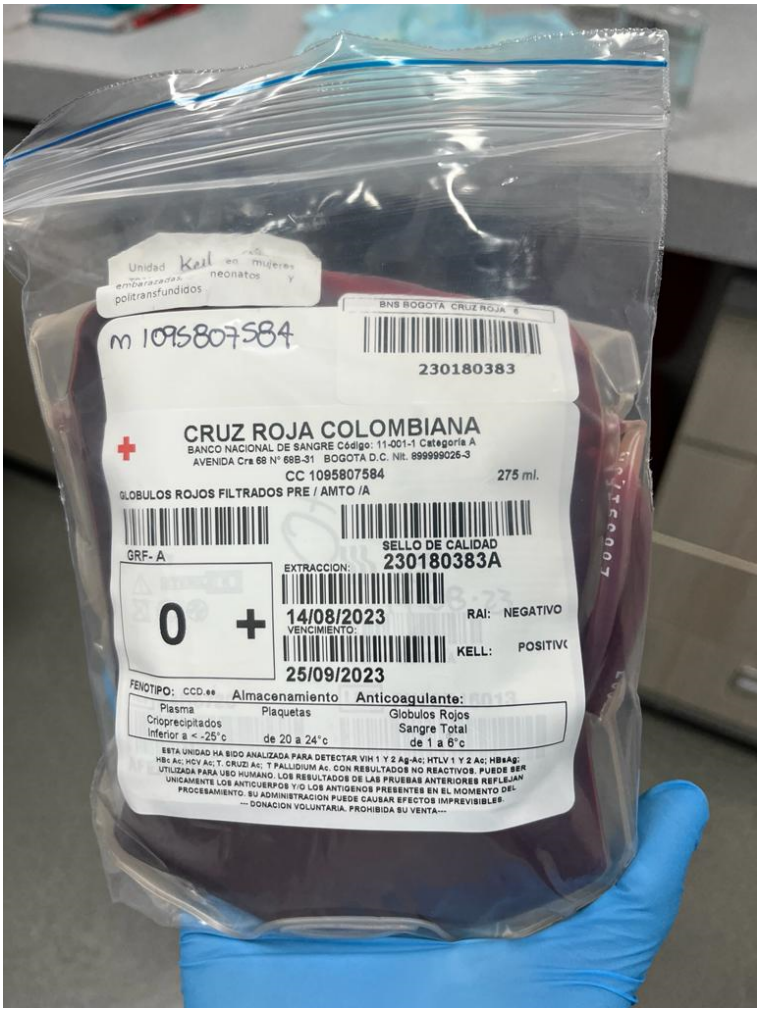
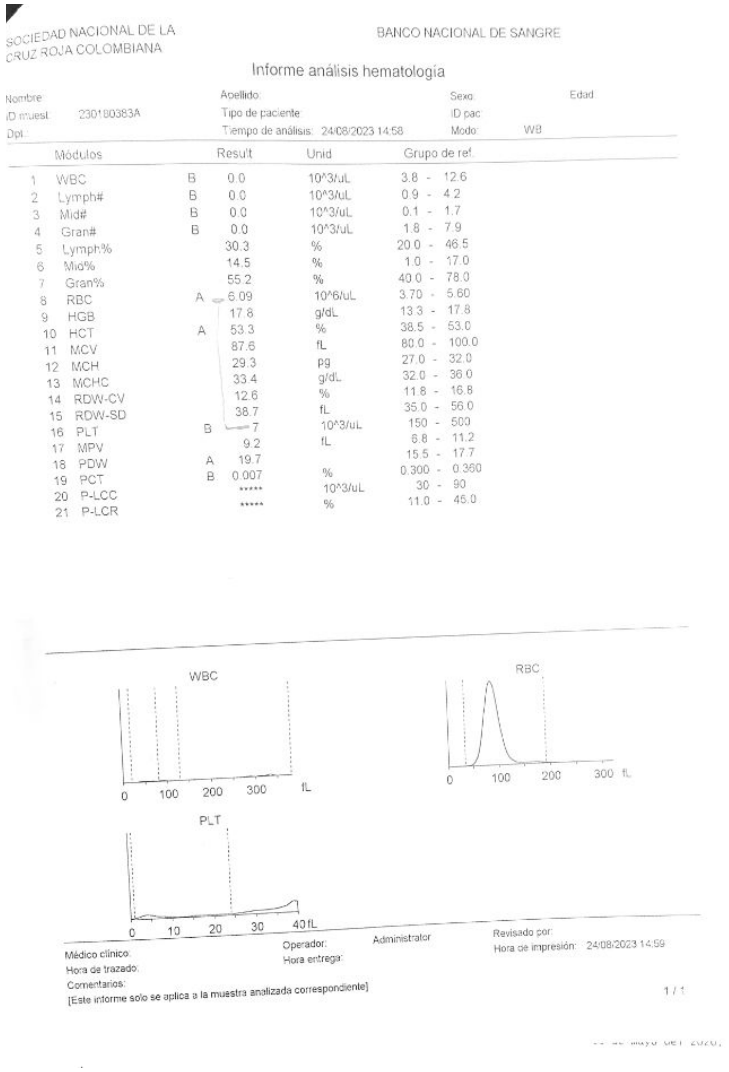


Figura 14 *Rótulos e información de unidad de plaquetas recibida por parte de la Cruz Roja Colombiana*



SOCIEDAD NACIONAL DE LA CRUZ ROJA COLOMBIANA

BANCO NACIONAL DE SANGRE

Informe análisis hematología

Nombre:
ID muest: 230180383A
Dpt.:

Apellido:
Tipo de paciente:
Tiempo de análisis: 24/08/2023 14:58

Sexo:
ID pac:
Modo: WB

Edad:

	Módulos		Result	Unid	Grupo de ref.
1	WBC	B	0.0	10^3/uL	3.8 - 12.6
2	Lymph#	B	0.0	10^3/uL	0.9 - 4.2
3	Mid#	B	0.0	10^3/uL	0.1 - 1.7
4	Gran#	B	0.0	10^3/uL	1.8 - 7.9
5	Lymph%		30.3	%	20.0 - 46.5
6	Mid%		14.5	%	1.0 - 17.0
7	Gran%		55.2	%	40.0 - 78.0
8	RBC	A	6.09	10^6/uL	3.70 - 5.60
9	HGB		17.8	g/dL	13.3 - 17.8
10	HCT	A	53.3	%	38.5 - 53.0
11	MCV		87.6	fL	80.0 - 100.0
12	MCH		29.3	pg	27.0 - 32.0
13	MCHC		33.4	g/dL	32.0 - 36.0
14	RDW-CV		12.6	%	11.8 - 16.8
15	RDW-SD		38.7	fL	35.0 - 56.0
16	PLT	B	7	10^3/uL	150 - 500
17	MPV		9.2	fL	6.8 - 11.2
18	PDW	A	19.7		15.5 - 17.7
19	PCT	B	0.007	%	0.300 - 0.360
20	P-LCC		*****	10^3/uL	30 - 90
21	P-LCR		*****	%	11.0 - 45.0

Médico clínico:
Hora de trazado:
Comentarios:
[Este informe solo se aplica a la muestra analizada correspondiente]

Operador:
Hora entrega:

Administrator

Revisado por:
Hora de impresión: 24/08/2023 14:59

1 / 1

Figura 15 *Parámetros hematológicos de la unidad de plaquetas recibida*

Tabla 6 *Cuantificación absoluta de CHIKV en plaquetas*

Carga viral Plaquetas							
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	LOG copias genómicas/µL	copias genómicas/µL
A03	Texas Red	E1	Unkn	CHIKV Día 0 PLT	27,63	4,35	2,E+04
B03	Texas Red	E1	Unkn	CHIKV Día 0 PLT	28,74	4,06	1,E+04
C03	Texas Red	E1	Unkn	CHIKV Día 0 PLT	28,36	4,16	1,E+04
A01	Texas Red	E1	Unkn	Día 1 R1	32,60	3,04	1,E+03
B01	Texas Red	E1	Unkn	Día 1 R1	31,19	3,41	3,E+03
C01	Texas Red	E1	Unkn	Día 1 R2	29,81	3,78	6,E+03
D01	Texas Red	E1	Unkn	Día 1 R2	30,02	3,72	5,E+03
E01	Texas Red	E1	Unkn	Día 1 R3	29,51	3,86	7,E+03
F01	Texas Red	E1	Unkn	Día 1 R3	29,88	3,76	6,E+03
A01	Texas Red	E1	Unkn	Día 2 R1	31,67	3,28	2,E+03
B01	Texas Red	E1	Unkn	Día 2 R1	32,22	3,14	1,E+03
C01	Texas Red	E1	Unkn	Día 2 R2	32,21	3,14	1,E+03
D01	Texas Red	E1	Unkn	Día 2 R2	30,24	3,66	5,E+03
E01	Texas Red	E1	Unkn	Día 2 R3	32,05	3,18	2,E+03
F01	Texas Red	E1	Unkn	Día 2 R3	31,78	3,25	2,E+03
G01	Texas Red	E1	Unkn	Día 3 R1	30,39	3,62	4,E+03
H01	Texas Red	E1	Unkn	Día 3 R1	30,80	3,51	3,E+03
A02	Texas Red	E1	Unkn-2	Día 3 R2	30,56	3,58	4,E+03
B02	Texas Red	E1	Unkn	Día 3 R2	30,35	3,63	4,E+03
C02	Texas Red	E1	Unkn	Día 3 R3	30,53	3,58	4,E+03
D02	Texas Red	E1	Unkn	Día 3 R3	30,42	3,61	4,E+03
C03	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R1	33,59	2,77	6,E+02
D03	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R1	35,58	2,24	2,E+02
A02	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R1	34,51	2,53	3,E+02
B02	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R1	34,54	2,52	3,E+02
E03	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R2	36,00	2,13	1,E+02
F03	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R2	35,83	2,18	1,E+02
C02	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R2	33,44	2,81	6,E+02
D02	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R2	33,37	2,83	7,E+02
G03	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R3	32,23	3,13	1,E+03
H03	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R3	32,86	2,97	9,E+02
E02	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R3	33,33	2,84	7,E+02
F02	Texas Red	E1	Unkn	Día 4 R3	32,38	3,09	1,E+03
A03	Texas Red	E1	Unkn	Día 5 R1	32,37	3,10	1,E+03
B03	Texas Red	E1	Unkn	Día 5 R1	34,03	2,65	5,E+02
C03	Texas Red	E1	Unkn	Día 5 R2	36,22	2,07	1,E+02
D03	Texas Red	E1	Unkn	Día 5 R2	36,23	2,07	1,E+02
E03	Texas Red	E1	Unkn	Día 5 R3	33,21	2,87	7,E+02
F03	Texas Red	E1	Unkn	Día 5 R3	33,68	2,75	6,E+02
E02	Texas Red	E1	Unkn	Día 6 R1	30,34	3,63	4,E+03
F02	Texas Red	E1	Unkn	Día 6 R1	29,91	3,75	6,E+03
G02	Texas Red	E1	Unkn	Día 6 R2	29,41	3,88	8,E+03
H02	Texas Red	E1	Unkn	Día 6 R2	29,52	3,85	7,E+03
A03	Texas Red	E1	Unkn	Día 6 R3	30,28	3,65	4,E+03
B03	Texas Red	E1	Unkn	Día 6 R3	30,00	3,72	5,E+03

Tabla 7 *Cuantificación relativa en plaquetas*

CUANTIFICACIÓN RELATIVA PL							
N°	**Dias Vs Replica**	**Cq Virus**	**Cq Beta Actina**	**ΔCq**	**ΔΔCq**	**2^-ΔΔCq**	**Promedio Dia 0**
1	DÍA 0 R1	27,63	24,69	2,94	-1,70	3,24	
2	DÍA 0 R1	28,74	24,06	4,68	0,05	0,97	
3	DÍA 0 R2	28,36	23,28	5,09	0,45	0,73	
4	DÍA 0 R2	27,63	23,36	4,27	-0,37	1,29	
5	DÍA 0 R3	28,74	23,14	5,60	0,97	0,51	
6	DÍA 0 R3	28,36	23,13	5,24	0,60	0,66	
7	DÍA 1 R1	32,60	24,78	7,82	3,18	0,11	
8	DÍA 1 R1	31,19	25,12	6,07	1,43	0,37	
9	DÍA 1 R2	29,81	24,77	5,04	0,40	0,76	
10	DÍA 1 R2	30,02	23,81	6,21	1,58	0,34	
11	DÍA 1 R3	29,51	24,90	4,61	-0,03	1,02	
12	DÍA 1 R3	29,88	24,80	5,08	0,44	0,74	
13	DÍA 2 R1	31,67	24,19	7,48	2,85	0,14	
14	DÍA 2 R1	32,22	24,38	7,84	3,20	0,11	
15	DÍA 2 R2	32,21	24,27	7,94	3,31	0,10	
16	DÍA 2 R2	30,24	24,26	5,98	1,34	0,39	
17	DÍA 2 R3	32,05	24,55	7,50	2,86	0,14	
18	DÍA 2 R3	31,78	24,33	7,45	2,82	0,14	
19	DÍA 3 R1	30,39	26,19	4,20	-0,44	1,35	
20	DÍA 3 R1	30,80	26,94	3,86	-0,77	1,71	
21	DÍA 3 R2	30,56	26,69	3,87	-0,77	1,71	4,64
22	DÍA 3 R2	30,35	26,86	3,49	-1,14	2,21	
23	DÍA 3 R3	30,53	27,34	3,20	-1,44	2,72	
24	DÍA 3 R3	30,42	27,12	3,30	-1,34	2,53	
25	DÍA 4 R1	33,59	26,44	7,15	2,51	0,18	
26	DÍA 4 R1	35,58	26,32	9,26	4,62	0,04	
27	DÍA 4 R2	34,51	24,92	9,59	4,95	0,03	
28	DÍA 4 R2	34,54	25,18	9,36	4,73	0,04	
29	DÍA 4 R3	36,00	25,50	10,50	5,86	0,02	
30	DÍA 4 R3	35,83	25,25	10,58	5,95	0,02	
31	DÍA 5 R1	32,37	25,24	7,13	2,49	0,18	
32	DÍA 5 R1	34,03	26,18	7,85	3,21	0,11	
33	DÍA 5 R2	36,22	27,37	8,85	4,21	0,05	
34	DÍA 5 R2	36,23	27,47	8,76	4,12	0,06	
35	DÍA 5 R3	33,21	25,19	8,02	3,38	0,10	
36	DÍA 5 R3	33,68	25,61	8,07	3,43	0,09	
37	DÍA 6 R1	30,34	24,33	6,01	1,37	0,39	
38	DÍA 6 R1	29,91	24,09	5,81	1,17	0,44	
39	DÍA 6 R2	29,41	24,02	5,38	0,75	0,60	
40	DÍA 6 R2	29,52	24,02	5,50	0,86	0,55	
41	DÍA 6 R3	30,28	24,62	5,66	1,02	0,49	

42	DÍA 6 R3	30,00	24,53	5,47	0,83	0,56	

Tabla 8 *Cuantificación absoluta de CHIKV en glóbulos rojos*

Well	Fluor	Content	Sample	Cq	Log Copias virales	Copias virales/µL
A01	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 0 R1	27,84	4,24	17311,45
B01	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 0 R1	27,57	4,32	20689,13
C01	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 0 R2	30,61	3,43	2714,65
D01	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 0 R2	28,51	4,04	11040,32
F01	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 7 R1	29,61	3,72	5303,95
E01	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 7 R1	28,22	4,13	13440,29
G01	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 7 R2	27,44	4,35	22564,43
H01	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 7 R2	28,00	4,19	15576,95
A02	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 14 R1	30,75	3,39	2460,17
B02	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 14 R1	31,21	3,26	1806,44
C02	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 14 R2	29,12	3,87	7348,37
D02	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 14 R2	28,79	3,96	9136,87
E02	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 21 R1	26,59	4,60	39960,64
F02	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 21 R1	26,86	4,52	33320,92
G02	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 21 R2	27,47	4,35	22196,23
H02	Texas Red	Unkn	CHIKV DÍA 21 R2	27,79	4,25	17905,06

Tabla 9 *Cuantificación relativa en glóbulos rojos*

CUANTIFICACIÓN RELATIVA GLÓBULOS ROJOS							
N°	**Dias Vs Replica**	**Cq Virus**	**Cq Beta Actina**	**ΔCq**	**ΔΔCq**	**2^-ΔΔCq**	**Promedio Dia 0**
1	DÍA 0 R1	27,84	21,44	6,40	0,07	0,95	6,33
2	DÍA 0 R1	27,57	21,82	5,75	-0,58	1,49	
3	DÍA 0 R2	30,61	23,69	6,91	0,58	0,67	
4	DÍA 0 R2	28,51	22,26	6,25	-0,08	1,06	
5	DÍA 7 R1	28,22	22,84	5,38	-0,95	1,93	
6	DÍA 7 R1	29,61	23,57	6,03	-0,30	1,23	
7	DÍA 7 R2	27,44	22,50	4,95	-1,38	2,61	
8	DÍA 7 R2	28,00	22,38	5,61	-0,72	1,64	
9	DÍA 14 R1	30,75	23,94	6,81	0,48	0,72	
10	DÍA 14 R1	31,21	24,23	6,98	0,65	0,64	
11	DÍA 14 R2	29,12	22,97	6,15	-0,18	1,13	
12	DÍA 14 R2	28,79	22,88	5,91	-0,42	1,34	
13	DÍA 21 R1	26,59	21,40	5,19	-1,14	2,20	
14	DÍA 21 R1	26,86	22,09	4,77	-1,56	2,94	
15	DÍA 21 R2	27,47	21,64	5,83	-0,50	1,42	
16	DÍA 21 R2	27,79	22,22	5,57	-0,76	1,70	

12. Referencias bibliográficas

[1] J. C. Castrillón, J. C. Castaño, and S. Urcuqui, “Dengue en Colombia: diez años de evolución,” *Rev. Chil. infectología*, vol. 32, no. 2, pp. 142–149, Apr. 2015, doi: 10.4067/S0716-10182015000300002.

[2] M. R. Sutherland, A. Y. Simon, K. Serrano, P. Schubert, J. P. Acker, and E. L. G. Pryzdial, “Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units,” *Transfusion*, vol. 56, no. 5, pp. 1129–1137, May 2016, doi: 10.1111/trf.13454.

[3] B. N. Instituto de Ciencias de la Salud (Colombia). Facultad de Medicina., *C.E.S. medicina : órgano oficial de difusión de la Facultad de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud.*, vol. 28, no. 2. Instituto de Ciencias de la Salud, 2014.

[4] F. N. Raharimalala *et al.*, “Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera, Culicidae), in Madagascar,” *Parasites and Vectors*, vol. 5, no. 1, 2012, doi: 10.1186/1756-3305-5-56.

[5] D. DE Provenientes La Red Nacional De Bancos De Sangre De La Cruz Roja Colombiana Brian Alejandro Cáceres Munar, “ANÁLISIS DE LA PREVALENCIA DE DENGUE, ZIKA Y CHIKUNGUNYA EN.”

[6] R. Hasbun, D. van de Beek, M. C. Brouwer, and A. R. Tunkel, “Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica - ClinicalKey.” https://www.clinicalkey.es/#!/browse/book/3-s2.0-C20140042335 (accessed Sep. 30, 2023).

[7] A. Higuera and J. D. Ramírez, “Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update,” *Acta Tropica*, vol. 190. Elsevier B.V., pp. 99–111, Feb. 01, 2019, doi: 10.1016/j.actatropica.2018.11.010.

[8] National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), “Ciclos de la vida de los mosquitos de la especie Aedes | Mosquitos | CDC.” https://www.cdc.gov/mosquitoes/es/about/life-cycles/aedes.html (accessed Sep. 30, 2023).

[9] M. Benitez, M. Cortes, M. Eg, G. Vh, M. Díaz, and B. 3 Biólogo, “MEDICINA Sobre los autores.”

[10] P. M. de A. Zanotto and L. C. de C. Leite, “The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., Aug. 28, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01964.

[11] J. . Trilla García, A.; Arribas López, J.R.; Martínez Yoldi, M.J.; Gómez Dantés, H.; Echevarría Mayo, “Infecciones víricas emergentes: fiebre amarilla, dengue, chikungunya, zika, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, enfermedad por el virus del Ébola y otras virosis. Rabia - Farreras Rozman. Medicina Interna - ClinicalKey Student,” in *Farreras Rozman. Medicina Interna*, 2020, p. 2932.

[12] E. P. Calvo, E. D. Archila, Lady López, and J. E. Castellanos, “Reconociendo el virus del chikunguña,” *Biomédica*, vol. 41, no. 2, pp. 353–373, Jun. 2021, doi: 10.7705/BIOMEDICA.5797.

[13] K. A. Galán-Huerta, A. M. Rivas-Estilla, I. Fernández-Salas, J. A. Farfan-Ale, and J. Ramos-Jiménez, “Chikungunya virus: A general overview,” *Med. Univ.*, vol. 17, no. 68, pp. 175–183, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.rmu.2015.06.001.

[14] S. Khongwichit, J. Chansaenroj, C. Chirathaworn, and Y. Poovorawan, “Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries,” *Journal of Biomedical Science*, vol. 28, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2021, doi: 10.1186/s12929-021-00778-8.

[15] G. Matusali *et al.*, “Tropism of the chikungunya virus,” *Viruses*, vol. 11, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.3390/v11020175.

[16] L. Markoff, “Alfavirus (chikungunya, encefalitis equina oriental) - Mandell, Douglas, Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica - ClinicalKey Student.” https://www-clinicalkey-com.ezproxy.unbosque.edu.co/student/content/book/3-s2.0-B978849113499200151X#hl0000530 (accessed Sep. 30, 2023).

[17] O. Schwartz and M. L. Albert, “Biology and pathogenesis of chikungunya virus,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 7. pp. 491–500, Jun. 2010, doi: 10.1038/nrmicro2368.

[18] O. Bennett, R. Dolin, and M. Blaser, *Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*, 9th ed., vol. 2. Elsevier, 2020.

[19] S. N. Ferreira Barijhó, V. M. Gómez Bareiro, and H. Rodríguez González, “Guía para el manejo clínico de la enfermedad producida por el virus del Chikungunya,” *Pediatría*

(Asunción), vol. 42, no. 1, pp. 54–69, Apr. 2015, doi: 10.18004/ped.2015.abril.54-69.

[20] Ops/Oms, “Alerta Epidemiológica: Aumento de casos y defunciones por chikunguña en la Región de las Américas,” *Ops/Oms*, pp. 1–7, 2023.

[21] OPS, “Actualización Epidemiológica - Dengue, chikunguña y Zika - 10 de junio de 2023 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.” https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-dengue-chikungunа-zika-10-junio-2023 (accessed Sep. 30, 2023).

[22] A. A. Bettis *et al.*, “The global epidemiology of chikungunya from 1999 to 2020: A systematic literature review to inform the development and introduction of vaccines,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 16, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0010069.

[23] M. A. Espinal *et al.*, “Emerging and reemerging aedes-transmitted arbovirus infections in the region of the americas: Implications for health policy,” *Am. J. Public Health*, vol. 109, no. 3, pp. 387–392, 2019, doi: 10.2105/AJPH.2018.304849.

[24] L. Martinez and P. Torrado, “Fiebre Chikungunya.” http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232015000100008 (accessed Sep. 30, 2023).

[25] I. S. B. Tanabe *et al.*, “Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 8. Frontiers Media S.A., Oct. 10, 2018, doi: 10.3389/fcimb.2018.00345.

[26] A. Gimenez-Richarte *et al.*, “Prevalence of Chikungunya, Dengue and Zika viruses in blood donors: a systematic literature review and meta-analysis,” *Blood Transfusion*, vol. 20, no. 4. Edizioni SIMTI, pp. 267–280, Jul. 01, 2022, doi: 10.2450/2021.0106-21.

[27] H. Appassakij, K. Silpapojakul, C. Promwong, and P. Rujirojindakul, “The Potential Impact of Chikungunya Virus Outbreaks on Blood Transfusion,” *Transfus. Med. Rev.*, vol. 34, no. 1, pp. 23–28, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.TMRV.2019.06.002.

[28] G. Venturi *et al.*, “Lack of Evidence of Chikungunya Virus Infection among Blood Donors during the Chikungunya Outbreak in Lazio Region, Italy, 2017,” *Viruses*, vol. 14, no. 3, 2022, doi: 10.3390/v14030619.

[29] OMS, “Disponibilidad y seguridad de la sangre.” https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability (accessed Sep. 30, 2023).

[30] Instituto Nacional de Salud, “manual-de-hemovigilancia-2010.”

[31] Ministerio de Salud y Protecciòn Social, “decreto-1571-de-1993.”

[32] G. Simmons *et al.*, “High incidence of chikungunya virus and frequency of viremic blood donations during epidemic, Puerto Rico, USA, 2014,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 22, no. 7, pp. 1221–1228, Jul. 2016, doi: 10.3201/eid2207.160116.

[33] Grupo de Vigilancia y Control de enfermedades transmisibles endoepidémicas y relacionadas con salud sexual, “Protocolo de Vigilancia deChikungunya (217),” pp. 1–21, 2022, [Online]. Available: http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/SitePages/Evento.aspx?Event=2.

[34] P. Reiter, D. Fontenille, and C. Paupy, “Aedes albopictus as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem?,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 6, no. 8, pp. 463–464, Aug. 2006, doi: 10.1016/S1473-3099(06)70531-X.

[35] OPS/OMS, “Chikungunya - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.” https://www.paho.org/es/temas/chikungunya (accessed Oct. 01, 2023).

[36] F. Simon *et al.*, “French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014,” *Med. Mal. Infect.*, vol. 45, no. 7, pp. 243–263, 2015, doi: 10.1016/j.medmal.2015.05.007.

[37] B. E. Red Distrital de Sangre, “Boletín Red Distrital de Sangre 2020,” *Boletín Red Dist. Sangre*, vol. 9, 2022, doi: 10.56085/26656663.578.

[38] E. P. Calvo, F. Sánchez-Quete, S. Durán, I. Sandoval, and J. E. Castellanos, “Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and zika viruses in febrile patients,” *Acta Trop.*, vol. 163, pp. 32–37, 2016, doi: 10.1016/j.actatropica.2016.07.021.

[39] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

[40] R. S. Lanciotti *et al.*, “Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006 - Volume 13, Number 5—May 2007 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 5, pp. 764–767, 2007, doi: 10.3201/EID1305.070015.

[41] H. Appassakij, P. Khuntikij, M. Kemapunmanus, R. Wutthanarungsan, and K. Silpapojakul,

"Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: A blood transfusion threat?," *Transfusion*, vol. 53, no. 10 PART 2, pp. 2567–2574, 2013, doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03960.x.

[42] L. Pezzi *et al.*, "Long-Term Infectivity of Chikungunya Virus Stored in the Dark at 4°C," *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 21, no. 12, pp. 989–993, 2021, doi: 10.1089/vbz.2021.0061.

[43] M. Bermudez, "Servicios De Transfusión Instituto Nacional De Salud," pp. 1–46, 2020, [Online]. Available: https://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DonacionSangre/AreasEstrategicas/informe-ejecutivo-servicios-de-transfusión-colombia-2018.pdf.

ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN Y CARGA VIRAL QUE TIENE EL VIRUS ZIKA EN GLÓBULOS ROJOS Y PLAQUETAS EN MUESTRAS DE SANGRE DE DONANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA COLOMBIANA.

Laura Catalina González Torres

Laura Valentina López Sarmiento

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica

Bogotá DC. – Octubre 2023

ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN Y CARGA VIRAL QUE TIENE EL VIRUS ZIKA EN GLÓBULOS ROJOS Y PLAQUETAS EN MUESTRAS DE SANGRE DE DONANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA COLOMBIANA.

Laura Catalina González Torres

Laura Valentina López Sarmiento

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Químico Farmacéutico

Modalidad de trabajo de grado

Director(a) - Felix Giovanni Delgado Tiria

Director(a) - Sandra Johanna Morantes Medina

Línea de investigación

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica

Bogotá DC. – Octubre 2023

Hoja de identificación

Título:	Análisis de la replicación y carga viral que tiene el virus Zika en glóbulos rojos y plaquetas en muestras de sangre de donantes y su importancia en la salud pública Colombiana.
Grupo de investigación:	Virología
Línea de Investigación:	Patogénesis viral
Institución (es) Participante (s):	Facultad de ciencias - programa de química farmacéutica
Tipo de Investigación:	Investigación aplicada
Estudiantes:	Laura Catalina González Torres Laura Valentina López Sarmiento
Director:	Felix Giovanni Delgado Tiria
Codirector:	Sandra Johanna Morantes Medina
Asesor:	N/A

Dedicatoria o lema

Dedicamos con todo nuestro amor este trabajo a nuestras familias, quienes acompañaron nuestro proceso, pues sin su apoyo incondicional y entusiasmo, no hubiera sido posible este logro. Este proyecto no fue fácil y ellos fueron motivo de inspiración para salir adelante y culminar con éxito nuestra tan anhelada carrera profesional.

Agradecimientos

Estimados padres, hermanas, hermanos y familiares, queridos amigos, tutores, jurados, y todas las personas que han sido parte fundamental en este emocionante camino hacia la culminación de nuestra tesis. Nos dirigimos a cada uno de ustedes para expresar nuestra más sincera y profunda gratitud.

En primer lugar, queremos agradecer a Dios por haber guiado nuestros pasos y haber iluminado nuestro camino durante este difícil proceso.

A nuestros padres, el pilar fundamental de nuestras vidas, les agradecemos por haber creído en nosotras desde el principio y por haber sido nuestra mayor motivación en los momentos de agotamiento y desánimo. Su dedicación y sacrificio han sido el motor que nos ha impulsado a esforzarnos sin descanso.

A nuestras hermanas, hermanos y familiares, quienes han sido nuestro sostén y confidentes, les agradecemos por brindarnos su aliento y ánimo en todo momento. Su respaldo brindado nos ha dado fuerzas para seguir adelante y no desfallecer ante los desafíos.

Nuestro agradecimiento también se extiende a nuestro tutor y Co-tutora, quienes nos guiaron con sabiduría y paciencia a lo largo de este proyecto. Su dedicación y compromiso con nuestro crecimiento académico han sido fundamentales para el desarrollo de nuestra tesis.

Asimismo, deseamos expresar nuestro agradecimiento al programa de laboratorio de investigación por brindarnos la oportunidad de crecer como investigadoras y adquirir habilidades que han sido vitales en nuestro desarrollo profesional.

Por último, pero no menos importante, agradecemos a nuestras juradas, cuyas valiosas críticas constructivas nos ayudaron a mejorar y perfeccionar nuestra investigación. Su experiencia y retroalimentación fueron fundamentales para enriquecer nuestro trabajo.

Nuestra tesis no solo es el resultado de nuestro esfuerzo, sino también de la dedicación y el apoyo incondicional que hemos recibido de todos ustedes. Este logro académico es tan suyo como nuestro.

Con amor y gratitud,

Laura Catalina González Torres y Laura Valentina López Sarmiento.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Arbovirus que circulan en Colombia

2.1.1. Virus del Dengue

2.1.2. Virus del Chicunguya

2.1.3. Virus del Zika

2.2 Métodos de transmisión del virus Zika

2.2.1 Transmisión vectorial

2.2.2 Transmisión vertical

2.2.3 Transmisión Sexual

2.2.4 Transfusiones a través de transfusiones sanguíneas

2.3 Distribución geográfica del virus Zika

2.4 Manifestaciones clínicas del virus Zika

2.5 Diagnóstico del virus Zika

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

5.2 Objetivos Específicos

6. METODOLOGÍA

6.1 Tipo de estudio

6.2 Población y muestra

6.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

9. CONCLUSIONES

10. RECOMENDACIONES

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. ANEXOS

Listado de tablas

N° Tabla	Nombre de Tabla	Pág.
Tabla 1	Datos Muestra Estándar Plaquetas.	18
Tabla 2	Muestra de Datos Promedio para Plaquetas del día 0 al día 6.	19
Tabla 3	Valores cuantificación relativa promedio por el método delta delta Ct (ΔΔCt) Plaquetas.	23
Tabla 4	Datos Muestra Estándar Glóbulos rojos.	24
Tabla 5	Muestra de Datos Promedio de glóbulos del día 0, 7, 14 y 21.	25
Tabla 6	Valores cuantificación relativa por el método delta delta Ct (ΔΔCt) Glóbulos Rojos.	27

Listado de figuras

N° Figura	Nombre Figura	Pág.
Figura 1	Curva estándar para el Virus Zika.	19
Figura 2	Variación de las copias virales/µL del ZIKV a lo largo del tiempo en Plaquetas.	20
Figura 3	Cuantificación relativa β-actina a lo largo del tiempo en Plaquetas.	22
Figura 4	Cuantificación relativa corregida β-actina a lo largo del tiempo en Plaquetas.	23
Figura 5	Curva Estándar Glóbulos rojos.	25
Figura 6	Variación de las copias virales/µL del ZIKV a lo largo del tiempo en glóbulos rojos.	26
Figura 7	Cuantificación relativa β-actina a lo largo del tiempo en glóbulos rojos.	26
Figura 8	Cuantificación relativa corregida de β-actina a lo largo del tiempo en glóbulos rojos.	27

Lista de Símbolos y abreviaturas

- BES: Boletín epidemiológico semanal
- CHIKV: Virus Chikungunya
- Ct=Cq: (umbral del ciclo)
- DENV: Virus Dengue
- MOI: Multiplicidad de infección
- PLT: Plaquetas
- qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa cuantitativa
- RBC: Glóbulos rojos
- UFP: Unidades formadoras de placas
- ZIKV: Virus Zika

Resumen

Los arbovirus son aquellos virus transmitidos por artrópodos como los mosquitos, causando una serie de sintomatologías que pueden llegar a ser graves dentro de la población colombiana convirtiéndose en un problema de Salud Pública. Uno de estos arbovirus presentes en el país es el virus Zika. Este se puede transmitir con facilidad por la picadura directa de este vector, mediante contacto sexual, transmisión de madre a feto y transfusiones sanguíneas. Es por esto que, el objetivo de este proyecto fue evaluar y analizar la estabilidad de ZIKV en componentes sanguíneos de donantes de sangre provenientes del banco de sangre Cruz Roja Colombiana de la ciudad de Bogotá, D.C.

Para esto, se tomaron muestras de donantes de sangre del banco de sangre de la Cruz Roja Colombiana teniendo en cuenta los diferentes componentes sanguíneos como plaquetas y glóbulos rojos, a los cuales se les realizó el respectivo análisis de la replicación y carga viral del virus Zika, teniendo en cuenta, las condiciones óptimas de almacenamiento de cada uno de estos componentes sanguíneos, establecidos por el banco de sangre. De este modo, se llevó a cabo la inoculación de las distintas unidades de sangre, ya sean glóbulos rojos o plaquetas, utilizando una concentración de $4,6 \times 10^3$ UFP/mL del virus Zika. Dependiendo de la unidad de componente que estaba siendo analizada a través del tiempo, se tomaron muestras con el fin de cuantificar y realizar detección del ARN viral.

Para llevar a cabo este proceso, se empleó la técnica RT-qPCR. En el caso de las plaquetas, el período de seguimiento fue de 7 días, mientras que, en el caso de los glóbulos rojos, se realizó un seguimiento durante un período de 3 semanas. Este enfoque permitió evaluar de manera precisa la replicación viral y la carga viral en cada uno de los componentes sanguíneos.

Los resultados obtenidos durante el proyecto demuestran que el genoma de ZIKV es estable en plaquetas bajo las condiciones de almacenamiento de banco de sangre y que las copias genómicas de virus Zika disminuyen con el tiempo en glóbulos rojos bajo las condiciones de almacenamiento del banco de sangre de la Cruz Roja Colombiana.

Teniendo en cuenta lo anterior, se resalta la importancia de gestionar de manera adecuada manejo de la viremia en los componentes sanguíneos y su relevancia en la salud pública colombiana, lo cual es significativo dado que, Colombia es un país con zonas endémicas, propicias para la circulación, infección y afectación de la población por este tipo de virus.

Frente a esta problemática, se recomienda adoptar medidas preventivas con el fin de fortalecer la seguridad transfusional y asegurar la calidad de los hemocomponentes. Esto

incluye la implementación de estrategias que eviten la transfusión de unidades sanguíneas que puedan contener arbovirus, como el ZIKV. Para alcanzar este objetivo, se pueden implementar tratamiento con el aumento de pruebas de detección, el uso de azul de metileno o tratamiento con UV, permitiendo tener un control más riguroso, especialmente en zonas endémicas, con el fin de llevar a cabo una evaluación detallada de las donaciones. Este enfoque permitiría mantener una vigilancia epidemiológica específica en las zonas de alto riesgo, contribuyendo a la seguridad y calidad de los componentes sanguíneos.

Palabras Clave: Virus Zika, Carga viral, Replicación, Salud Pública, RT-qPCR, Plaquetas, Glóbulos rojos, Seguridad Transfusional.

Abstract

Arboviruses are those viruses transmitted by arthropods such as mosquitoes, causing a series of symptoms that can become serious within the Colombian population, becoming a public health problem. One of these arboviruses present in the country is the Zika virus. This can be easily transmitted by the direct bite of this vector, through sexual contact, mother to fetus transmission and blood transfusions. Therefore, the objective of this project was to evaluate and analyze the stability of ZIKV in blood components of blood donors from the Colombian Red Cross blood bank in the city of Bogota, DC.

For this purpose, samples were taken from blood donors of the Colombian Red Cross blood bank, taking into account the different blood components such as platelets and red blood cells, to which the respective analysis of the replication and viral load of the Zika virus was performed, taking into account the optimal storage conditions of each of these blood components, established by the blood bank. Thus, the inoculation of the different blood units, either red blood cells or platelets, was carried out using a concentration of 4.6 x 103 PFU/mL of Zika virus. Depending on the component unit that was being tested over time, samples were taken in order to quantify and perform viral RNA detection.

To carry out this process, the RT-qPCR technique was used. In the case of platelets, the follow-up period was 7 days, whereas, in the case of red blood cells, follow-up was performed for a period of 3 weeks. This approach allowed accurate assessment of viral replication and viral load in each of the blood components.

The results obtained during the project demonstrate that the ZIKV genome is stable in platelets under blood bank storage conditions and that genomic copies of Zika virus decrease over time in red blood cells under Colombian Red Cross blood bank storage conditions.

Considering the above, it is important to adequately manage viraemia in blood components and its relevance in Colombian public health, which is significant given that Colombia is a country with endemic areas, conducive to the circulation, infection and affectation of the population by this type of virus.

In view of this problem, it is recommended that preventive measures be adopted to strengthen transfusion safety and ensure the quality of blood components. This includes the implementation of strategies to avoid transfusion of blood units that may contain arboviruses, such as ZIKV. To achieve this goal, treatment with increased screening tests, the use of methylene blue or UV treatment can be implemented, allowing for more rigorous control, especially in endemic areas, in order to carry out a detailed evaluation of donations. This

approach would allow specific epidemiological surveillance to be maintained in high-risk areas, contributing to the safety and quality of blood components.

Keywords: Zika virus, Viral load, Replication, Public health, RT-qPCR, Platelets, Red blood cells, Transfusion safety.

1. Introducción

Los arbovirus son virus transmitidos por artrópodos hematófagos como insectos y arácnidos, a humanos y otros vertebrados. (Luis Arredondo García, 2016). En Colombia existen 3 principales arbovirus, entre ellos el ZIKV. Estos arbovirus comparten síntomas similares como fiebre, dolor de cabeza y musculares, lo cual dificulta su diagnóstico y manejo adecuado.

El ZIKV se transmite principalmente a través de mosquitos del género Aedes aegypti, pertenece a la familia *Flaviviridae* y su genoma consiste en una sola cadena de ARN. Tiene diferentes focos de contagio como picaduras, transfusiones sanguíneas, de madre a feto y contacto sexual (Luis Arredondo García, 2016) y (OMS, 2022). El diagnóstico de ZIKV se basa en la detección directa de ARN viral en muestras de sangre por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) o aislamiento viral, el cual implica cultivar y aislar el virus Zika en un entorno que se pueda controlar. Aunque actualmente no existen equipos comerciales para detectar anticuerpos relacionados al virus Zika. (Luis Arredondo García, 2016).

Para este virus no existe una vacuna, por lo cual el tratamiento suele ser sintomático, realizando una vigilancia estrecha a los pacientes por el riesgo elevado de síndromes neurológicos como Guillain-Barré, especialmente a las embarazadas debido a que, el ZIKV ha sido estrechamente asociado a malformaciones fetales (Luis Arredondo García, 2016). En la semana epidemiológica 11 de 2023, en Colombia se ha informado un total de 68 casos notificados, destacando que EL 3% de estos, corresponden a madres gestantes. (BES, 2023).

Cabe resaltar que los reportes realizados en Colombia se realizan con base a los casos detectados por la transmisión del virus ZIKV a través de picaduras que se detectan de manera sintomática, en donde no existe una supervisión de otras fuentes de contagio como lo son las transfusiones sanguíneas. Una desventaja frente al tema en el país es que las fuentes de información son muy limitadas.

Considerando la susceptibilidad de la población a contraer el virus debido a la continua circulación del virus en muchas zonas geográficas del país, este proyecto se propuso evaluar y analizar la estabilidad del virus Zika en componentes sanguíneos de donantes de sangre provenientes del banco de sangre de la Cruz Roja Colombiana en la ciudad de Bogotá, D.C. mediante la técnica RT-qPCR. El objetivo es proporcionar información valiosa para la investigación a nivel nacional.

Los resultados de este estudio evidencian que el genoma del ZIKV mantiene su estabilidad en plaquetas bajo las condiciones de almacenamiento del banco de sangre. Por otro lado, se

observa que las copias genómicas de ZIKV disminuyen progresivamente con el tiempo en glóbulos rojos. Estos resultados resaltan la importancia de asegurar la calidad de los hemocomponentes, recalcando la necesidad de vigilar y controlar la propagación del virus debido al impacto que este pueda tener en la salud pública colombiana.

2. Marco teórico

2.1 Arbovirus que circula en Colombia

En Colombia desde aproximadamente 1989 se tenía conocimiento del virus Dengue, el cual se le atribuía a los pacientes febriles, pero desde finales del 2013 y 2014 se dio la introducción y conocimiento a dos arbovirus nuevos como el Zika y Chikungunya, la permanencia de estos arbovirus, se les atribuye a los cambios climáticos, los viajes entre diferentes territorios y las zonas climáticas tropicales (Dra & Aldighieri & otros 2016). En este sentido, Colombia se convierte en un hábitat propicio para la permanencia de estos arbovirus, principalmente debido a la presencia de mosquitos vectores en el país. Aunque el Zika y el Chikungunya comparten similitudes en términos de sintomatología y origen, es crucial destacar que el enfoque principal de este proyecto recae en el virus Zika.

2.1.1. Virus Dengue

El Dengue es una infección viral transmitida por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*. Este virus consta de cuatro serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) que circulan a lo largo de las Américas, y en algunos casos simultáneamente. Este virus es más frecuente en regiones de climas tropicales y subtropicales, como Colombia. La transmisión por dengue tiene 3,1 millones de casos notificados, de los cuales más de 25,000 han sido casos clasificados como graves. La infección inicial por un serotipo y la posterior infección con otro serotipo diferente a la inicial, aumentan el riesgo de que una persona pueda desarrollar dengue grave e incluso de fallecer. Sin embargo, es importante señalar no presentan síntomas. Este fenómeno complica la identificación temprana de la enfermedad y subraya la importancia de las medidas preventivas, especialmente en regiones donde el mosquito transmisor es endémico (OPS. 2018) y (OMS. 2023).

2.1.2. Virus Chikungunya

El Chikungunya es una enfermedad vírica transmitida por la picadura de un mosquito de la familia *Aedes aegypti* y el *Aedes albopictus*. Actualmente se ha detectado la presencia del virus chikungunya en más de 110 países y actualmente se ha identificado en Asia, África, Europa y, desde finales de 2013, en las Américas. Las complicaciones graves son poco frecuentes, pero en las personas mayores, la enfermedad puede contribuir a la causa de la muerte (OPS. 2018) y (OMS, 2020).

2.1.3 Virus Zika

El Zika es una enfermedad viral transmitida por la picadura de un mosquito del género *Aedes aegypti*. Fue aislado por primera vez en 1947 en el bosque de Zika, en Uganda (África). Desde entonces, se ha encontrado principalmente en África y ha generado brotes pequeños y esporádicos también en Asia. En mayo de 2015, las autoridades de salud pública de Brasil confirmaron la transmisión de ZIKV en el noreste del país, y en julio del mismo año se detectó en ese país su asociación al síndrome de Guillain-Barré y en octubre se detectó la asociación entre la infección y malformaciones del sistema nervioso central al nacer, incluyendo la microcefalia.

La mayoría de las personas infectadas por el ZIKV son asintomáticas, entre quienes presentan síntomas, éstos suelen comenzar entre 3 y 14 días después de la infección, son generalmente leves, por ejemplo, erupciones cutáneas, fiebre, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestar general y cefaleas, y suelen durar entre 2 y 7 días. Estos síntomas son comunes a otras enfermedades arbovirales y no arbovirales, por lo que el diagnóstico de infección por el virus Zika requiere confirmación de laboratorio. Desde octubre de 2015 hasta la fecha, otros países y territorios de las Américas han reportado la presencia del virus Zika, incluyendo Colombia. Hasta la fecha, un total de 89 países y territorios han notificado casos de infección por el virus Zika transmitida por mosquitos; sin embargo, la vigilancia sigue siendo escasa a nivel mundial (OPS. 2018) y (OMS. 2022).

2.2 Métodos de transmisión del Virus Zika

Los métodos de transmisión de virus pueden estar mediados por diferentes fuentes de contagio y generalmente cuando se habla de virus, se entiende por un microorganismo infeccioso, el cual solo se puede replicar a través de la célula de diferentes organismos. El virus Zika se conoce que comúnmente es transmitido por una especie de mosquito hembra del género *Aedes aegypti,* sin embargo, esta no es la única fuente de contagio de este tipo de virus, de hecho, podemos encontrar cuatro métodos de transmisión del ZIKV.

2.2.1 Transmisión Vectorial

Cuando hablamos del método de transmisión del ZIKV por medio directo de un vector, nos referimos a que un mosquito (vector) es la principal fuente de contagio, el cual sigue una cadena de contagio hasta llegar a su huésped. Se propaga dentro de un ciclo enzoótico entre primates (no humanos) por mosquitos en un hábitat selvático. Estos mosquitos vectores infectados, por lo tanto, infectan a los humanos en un ciclo epidémico (Pielnaa et al., 2020).

El escenario se da a través de un mosquito *Aedes aegypti* el cual contenga el virus en su interior y contagia con su picadura a una persona no contagiada del virus.

La adquisición del ZIKV por parte de un mosquito ocurre cuando no está infectado y se alimenta de la sangre de una persona o un primate no humano que ya tiene el patógeno circulando en el torrente sanguíneo. Este proceso revela el ciclo de contagio que se desencadena a través del vector. Una vez el mosquito adquiere el virus, se replica durante varios días en su organismo, alcanzando finalmente las glándulas salivales. Es desde estas glándulas que el virus puede transmitirse a un nuevo huésped cuando el mosquito pica. En la persona recién infectada, el virus comienza a replicarse nuevamente hasta alcanzar concentraciones significativas en la sangre, momento en el cual puede infectar a nuevos mosquitos, perpetuando así el ciclo de transmisión. (Gregory et al., 2017).

2.2.2 Transmisión Vertical

Cuando se habla de una transmisión de madre a hijo, hace referencia a que una mujer en estado de gestación también puede ser una fuente de contagio hacia el feto e inclusive en el momento del parto. Estudios en humanos y animales indican que la placenta y el feto están en riesgo de infección a través de la transmisión transplacentaria. La placenta juega un papel importante en la prevención de la transmisión de patógenos, actuando como una barrera física y a través de la respuesta inmunitaria materna innata y adaptativa. Sin embargo, estas características protectoras no evitan que todas las infecciones lleguen al feto. El virus se ha aislado del líquido amniótico, cerebro fetal y en el suero de bebés 4 días después, además el virus Zika se ha encontrado en la leche materna, demostrando que existe fuente de contagio entre madre e hijo, pero no se ha confirmado la transmisión de ZIKV a través de la leche materna. Una vez en la placenta, se ha demostrado que el ZIKV se replica en varios tipos de células, incluidos los macrófagos y las células endoteliales fetales. (CDC, 2019),(Gregory et al., 2017) y (Pielnaa et al., 2020).

2.2.3 Transmisión Sexual

La transmisión sexual es uno de los métodos de transmisión más comunes en virus como la Hepatitis B, VIH, entre otros, sin embargo, pocos conocen que el virus Zika también tiene esta fuente de contagio. La transmisión de ZIKV mediante relaciones sexuales plantea una preocupación sustancial, dado que incluso en ausencia de síntomas en la persona infectada en ese momento o después de la desaparición de los síntomas, persiste el riesgo de contagio.

La posible transmisión sexual de ZIKV se informó inicialmente en 2008. A principios del curso del brote en las Américas, las experiencias con viajeros que regresaban de áreas de

transmisión activa a América del Norte y Europa confirmaron el contacto sexual como un modo de transmisión. Se ha detectado ARN de ZIKV en el semen de pacientes infectados con ZIKV. La presencia de ZIKV potencialmente infeccioso en semen humano ha sido evaluada de 2 maneras: por la presencia de ZIKV ARN detectable por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y por la demostración del virus por amplificación de pases en cultivo. En una investigación realizada por Christopher J Gregory, se observó que más de 30 casos de transmisión sexual fueron de hombre a mujer, un caso de hombre a hombre y también se ha informado un caso de mujer a hombre, por lo que el virus puede transmitirse entre ambos sexos, sin embargo, la mayor frecuencia de transmisión es de hombre a mujer (Gregory et al., 2017) y (Pielnaa et al., 2020).

Actualmente se siguen realizando estudios para averiguar cuánto tiempo permanece el Zika en el semen y los fluidos vaginales de las personas que tienen ZIKV, y cuánto tiempo se puede transmitir a las parejas sexuales. Sabemos que el ZIKV puede permanecer en el semen por más tiempo que en otros fluidos corporales, incluidos los fluidos vaginales, la orina y la sangre (CDC, 2019).

2.2.4 Transmisión a través de Transfusiones Sanguíneas

Las transfusiones sanguíneas suelen ser utilizadas para transferir algún componente de la sangre o en su totalidad toda la unidad, ya sea por deficiencia de esta, para prevenir o controlar alguna patología e incluso en cirugías para la transfusión de órganos. Sin embargo, este método conlleva riesgos para la salud humana, debido a que existe la posibilidad de contraer un virus o alguna infección no deseada durante el tratamiento. Entre los riesgos asociados, se destaca que las transfusiones sanguíneas pueden servir como medio de contagio de transmisión de enfermedades. Este hallazgo se evidenció durante un brote en la Polinesia Francesa, donde el 2,8 % de los donantes de sangre dieron positivo para ZIKV. En brotes anteriores, se encontró el virus en los donantes de sangre. Además, en Brasil, se han reportado múltiples casos de posibles casos de transmisión por transfusiones sanguíneas. (CDC, 2019).

Las donaciones de sangre asintomáticas pueden transmitir fácilmente el ZIKV a los receptores de sangre y sus diferentes componentes, pues se ha detectado en plaquetas, plasma y glóbulos rojos. De acuerdo con una investigación realizada por Lustig y Mendelson, alrededor del 3% de las donaciones de sangre dieron positivo para el virus Zika en Brasil (Pielnaa et al., 2020). La situación se agrava aún más por el hecho de que el ZIKV puede conservarse en sangre entera de personas infectadas durante cerca de dos meses. (Pielnaa et al., 2020). La prevención de la transmisión de ZIKV requiere la reducción de patógenos en los hemoderivados o la identificación de hemoderivados potencialmente infecciosos mediante

análisis de laboratorio y la eliminación de esos productos de la distribución. (Gregory et al., 2017).

2.3 Distribución geográfica del Virus Zika

Hasta 2007, las infecciones por ZIKV se consideraron principalmente como una infección de distribución geográfica limitada; sin embargo, brotes posteriores de infección en las islas del Pacífico y América del Sur, asociados con informes de que el virus podría causar anomalías en el sistema nervioso de los recién nacidos, atrajeron la atención de una amplia gama de personas de la comunidad científica. La situación alcanzó su punto máximo en 2015 cuando ocurrió un aumento sorprendente en los informes de infecciones por el virus Zika en Brasil. Luego, el brote se extendió a otros países de América del Sur, Central y del Norte. (Noorbakhsh et al., 2019).

Aunque los casos de enfermedad por ZIKV disminuyeron a partir de 2017 en todo el mundo, la transmisión del virus persiste a niveles bajos en varios países de las Américas y otras regiones endémicas. Además, en 2019 se notificaron los primeros casos locales de enfermedad por el virus de Zika transmitida por mosquitos en Europa y en 2021 se detectaron brotes epidémicos en la India. Hasta la fecha, un total de 89 países y territorios han notificado casos de infección por el virus de Zika transmitida por mosquitos; sin embargo, la vigilancia sigue siendo escasa a nivel mundial (OMS. 2022).

Sin embargo, pese a los diferentes países donde puede distribuirse este vector, el país de interés de este proyecto como se ha venido mencionando es Colombia. País en donde la literatura e información es muy escasa y limitada frente a la temática. Se conoce que Colombia inició la vigilancia del ZIKV a partir del 2015. De acuerdo con un informe preliminar divulgado en 2020 por Pacheco, O, et al. reportaron que los casos de ZIKV están ampliamente distribuidos en Colombia, con al menos un caso confirmado por laboratorio en 35 de las 37 áreas de notificación (Pacheco et al., 2020). Diecisiete áreas de notificación tenían más de 1000 casos; donde se notificaron 59.585 casos (91%). La mayor incidencia de ZIKV (1342 por 100.000 habitantes) se registró en San Andrés y Providencia, islas del Mar Caribe, seguida de una incidencia de 655 por 100.000 en Norte de Santander, departamento del noreste del país adyacente hasta la frontera con Venezuela, y una incidencia de 517 por 100.000 en el departamento del Huila. Para las mujeres embarazadas, la mayor incidencia de ZIKV se reportó en Norte de Santander (621 por 100 000 mujeres en edad fértil), la ciudad de Barranquilla (342 por 100 000) y el departamento de Huila (333 por 100 000) (Pacheco et al., 2020).

En la actualidad se han implementado reportes epidemiológicos del virus, en donde se evidencia una gran distribución geográfica del ZIKV en Colombia. Según lo reportado por el BES a semana epidemiológica 11 de 2023, se han notificado 68 casos en el país, en donde las entidades territoriales que mayor número de casos presentaron fueron; Bogotá (26 casos), Cali (20 casos), Cundinamarca (9 casos) y Meta (6 (casos), aportando el 60 % del total de los casos notificados. Sin embargo, las entidades territoriales de Cali y Cundinamarca presentaron disminución en la notificación de casos según lo esperado (BES, 2023)

2.4 Manifestaciones clínicas del Virus Zika

Se estima que cuatro de cada cinco pacientes son asintomáticos. Los síntomas aparecen entre 3 a 12 días después de la picadura del mosquito y los más comunes son fiebre leve, exantema, conjuntivitis no purulenta y artritis, principalmente en pies y manos. Otros síntomas incluyen mialgias, artralgias, cefalea, dolor retro-ocular, edema de miembros inferiores, vértigo, dolor abdominal y vómito. Algunos de estos síntomas son comunes a otras enfermedades arbovirales y no arbovirales, por lo que el diagnóstico de infección por el ZIKV requiere confirmación de laboratorio. La enfermedad generalmente es leve y autolimitada con duración de 2 a 7 días. Sin embargo, se han descrito complicaciones neurológicas y autoinmunitarias, así como malformaciones congénitas como la microcefalia. Todos los pacientes presentan exantema y la mayoría prurito. La fiebre ocurre en el 75% de los pacientes, pero sólo en 25% es mayor de 39°C de 1 a 8 días. Ocurre linfadenopatía submandibular o cervical en 35.5%. Otro punto de comparación del ZIKV es que generalmente es más frecuente el edema de extremidades y la conjuntivitis no purulenta, lo que no ocurre en fiebre chikungunya ni en dengue (OMS. 2022) y (Luis Arredondo García, 2016).

2.5 Diagnóstico y tratamiento de Virus Zika

El diagnóstico para evaluar un virus es de vital importancia para tomar acción con el tratamiento y prevenir que los efectos negativos sean severos para la salud. Esto dependerá del tipo de diagnóstico que sea utilizado y su finalidad. Los arbovirus como el ZIKV se han presentado durante varios años y hasta la actualidad son un problema de salud pública, debido a que la sintomatología principal de algunos de los arbovirus (Zika, Dengue y Chikungunya) es muy similar, por lo cual no se puede saber claramente el diagnóstico de una persona con esta sintomatología (fiebre, dolor de cabeza, erupción cutánea, dolor muscular y articular), es por esto que se pueden presentar casos de mal diagnóstico o por lo menos cuando se realiza un diagnóstico clínico. Sin embargo, podemos encontrar otros tipos de diagnóstico como el inmunodiagnóstico y el diagnóstico molecular.

Teniendo en cuenta lo anterior, la identificación óptima de los diferentes síntomas de estos virus se presenta cuando se tiene una fase aguda. El problema radica en que, la mayoría de los pacientes es asintomático y que son menos de la mitad de las personas que presentan una fase aguda de estos arbovirus. Por otro lado, en relación con el virus Zika y Dengue se tiene otra dificultad, como la reacción cruzada de los anticuerpos IgM/IgG, complicando la confirmación por laboratorio y comprometiendo de esta manera la vigilancia epidemiológica. Esta reacción cruzada se debe a que la proteína E del Zika y del DENV2 comparten aproximadamente un 54% de similitud en la secuencia de aminoácidos y el 55,6% con los demás serotipos. Al tratarse de un diagnóstico serológico la limitación que se tiene en esta prueba es que tiene una baja especificidad y con una sensibilidad muy limitada. (Chan et al., 2022). Es por esto que, se ha vuelto un problema de salud pública debido a la dificultad de un manejo apropiado del diagnóstico clínico del virus Zika, terminando en ocasiones en casos fatales (OPS, 2016).

3. Planteamiento del problema

En los últimos años se ha conocido que la transmisión del ZIKV se presenta por la picadura del mosquito del género Aedes, pero se ha demostrado que este también puede ser transmitido por diferentes fuentes de transmisión por medio de transfusiones de sangre, de madre a feto y por contacto sexual, el cual tiene un periodo más extenso en hombres.

Se ha evidenciado que la mayoría de los casos de ZIKV son asintomáticos, lo que genera mayor preocupación debido a que, estas personas pueden transmitir fácilmente el virus, afectando a poblaciones vulnerables, como mujeres embarazadas, provocando problemas congénitos a los bebés. La importancia de la investigación del virus del ZIKV está asociada a trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barre y los problemas congénitos que se han demostrado en mujeres embarazadas y que se transmiten de la madre al feto. Por otro lado, la población con la patología de anemia falciforme puede presentar una caída drástica en el recuento de plaquetas (trombocitopenia), anemia microcítica y un desenlace fatal. (Cao-Lormeau et al., 2016).

Durante el 2017 se presentaron 90 casos con síndromes neurológicos, entre esos los que se nombraron anteriormente con antecedente de enfermedad febril compatible con la infección de ZIKV, de los cuales el 48,9% eran de sexo femenino y el 51,1% de sexo masculino (Rodríguez, A. 2018). Otro aspecto importante de la investigación de la replicación de ZIKV y de la carga viral que tiene este virus está relacionado a que, actualmente no existen estudios que demuestran que el ZIKV persiste en componentes sanguíneos como: glóbulos rojos y plaquetas en condiciones de almacenamiento, por lo tanto, no se tiene claridad de la importancia y amenaza que tiene el ZIKV en los hemoderivados.

Asimismo, se ha evidenciado que en los últimos años se han incrementado los factores de riesgo como la distribución geográfica de los arbovirus debido al calentamiento global, la urbanización, los viajes internacionales o nacionales, factores ambientales, crecimiento de las poblaciones, el crecimiento de las enfermedades endémicas, entre otros. Estos factores han permitido la propagación del patógeno y la incidencia de infección del virus Zika, con una circulación en 86 países y territorios. (Sutherland et al., 2016)

En cuanto a las implicaciones del virus Zika, es fundamental considerar la presencia zonas endémicas y no endémicas como se evidencia en un estudio realizado en el 2019 en la Red de Bancos de Sangre de la Cruz Roja Colombiana. Los resultados indicaron que un 64% de las muestras de sangre provenían de zonas endémicas y el 35,7% de zonas no endémicas para el ZIKV, entre otros arbovirus (Hernández, M. 2021). La distribución de muestras de sangre provenientes de zonas endémicas como no endémicas destaca la necesidad urgente

de un mayor control en los procesos de donación, implementación de pruebas y seguridad transfusional.

Además de la falta de investigaciones nacionales, también se destaca un aspecto importante como lo son los métodos de detección que a nivel internacional son empleados para detectar este tipo de patógenos en las muestras de sangre de los bancos de sangre. Entre este tipo de métodos está la exclusión de donantes con síntomas, el problema en este caso es que el virus Zika presenta entre un 70% y 80% de casos asintomáticos. (B. H. Song et al., 2017).

Por otra parte, la importancia de realizar esta investigación de ZIKV en glóbulos rojos y plaquetas es debido a que, las transfusiones de sangre son catalogadas como un medicamento, en procedimientos quirúrgicos y también en enfermedades potenciales que requieren de transfusión sanguínea para la prevención y tratamiento de algunas patologías. Finalmente, la recolección de este tipo de información arrojada por la investigación permitiría tener un conocimiento más amplio de la importancia del cuidado de este tipo de hemocomponentes y así aplicar medidas a nivel nacional en la política de bancos de sangre, junto a la recopilación de datos e información útil del arbovirus Zika en Colombia.

4. Pregunta de investigación

Teniendo en cuenta el planteamiento problema anteriormente mencionado, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la capacidad replicativa del virus Zika en componentes sanguíneos en condiciones de almacenamiento?

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Evaluar y analizar la estabilidad del virus Zika en componentes sanguíneos de donantes de sangre provenientes del banco de sangre cruz roja de la ciudad de Bogotá, D.C.

5.2 Objetivos Específicos

- Analizar la replicación del virus Zika en componentes sanguíneos como plaquetas y glóbulos rojos.
- Analizar en el tiempo la carga viral del virus Zika en los componentes sanguíneos como glóbulos rojos y plaquetas.
- Determinar la importancia del virus Zika en la salud pública colombiana.

6. Metodología

Población y muestras

En el marco de un estudio observacional descriptivo se recolectó una unidad de plaquetas (obtenidas por aféresis) y una unidad de glóbulos rojos, estas, provenientes de donantes sanos que acudieron al Banco Nacional De Sangre Cruz Roja Colombiana. Estos hemocomponentes, fueron enviados al grupo de virología de la Universidad El Bosque a través del Convenio de cooperación científica, bajo la convocatoria pacto para la generación de nuevo conocimiento a través de proyectos de investigación científica en ciencias médicas y de la salud con No.844-2019, con código 130884467713 (ver anexo 9 y 10). A lo largo de todo el proceso, se garantizaron las condiciones de almacenamiento estándar de Banco Nacional De Sangre Cruz Roja Colombiana. En el caso de las plaquetas, se mantuvieron en constante agitación a 65 rpm a una temperatura entre 20°C - 26°C, mientras que los glóbulos rojos se conservaron a 4°C.

Infección de plaquetas y glóbulos rojos con un aislado de virus ZIKV

Posterior a la entrega de los hemocomponentes al grupo de virología de la Universidad El Bosque, se llevó a cabo la infección con ZIKV en plaquetas y glóbulos rojos. Para el caso de las plaquetas, se ajustó a una concentración final de ZIKV de $4,6 \times 10^3$ UFP/mL de plaquetas, para esto, en dos falcón de 50mL, se alicuotaron volúmenes de plaquetas de 34,65 mL, a los que posteriormente se les adiciono 0,35 mL de un aislado de ZIKV obtenido en el grupo de virología de la Universidad El Bosque, a un título de $4,6 \times 10^5$ UFP/mL. Luego de esta infección, los volúmenes contenidos en cada uno de los dos tubos falcon de 50 mL (35 mL de plaquetas a una concentración de $4,6 \times 10^3$ UFP/mL de ZIKV) fueron alicuotados en un total de 21 cajas (3 réplicas por cada día de observación) de cultivo celular T12.5, cada una de las cajas contenía una alícuota de 3 mL de plaquetas infectadas, estas alícuotas se almacenaron a condiciones estándar (65 rpm a 26°C) durante 6 días. Desde el día de la infección (día 0) hasta el día 6, se recolectaron alícuotas diarias de 3mL, que estaban contenidas en 3 cajas de cultivo celular T12.5 infectadas con ZIKV como se describió previamente.

En el caso de los glóbulos rojos, el objetivo era infectar a una concentración final de virus ZIKV de $4,6 \times 10^3$ UFP/mL. Con este fin, se llevaron a cabo las siguientes acciones, en un falcon de 50mL, se tomó 34,65 mL de glóbulos rojos junto con 0,35 mL de virus ZIKV a un título de $4,6 \times 10^5$ UFP/mL. Luego de esto, se realizó la infección, en la cual se incubaron 4mL de estos glóbulos rojos previamente infectados en placas de 6 pozos. Después de la

infección de los glóbulos rojos con el virus del Zika (ZIKV), se procedió a almacenarlos a una temperatura de 1 a 4°C. El objetivo fue tomar alícuotas diarias a lo largo de un periodo de tres semanas. Cada muestra se tomó por duplicado y posteriormente fue congelada a -80°C para su almacenamiento previo.

Detección molecular de ZIKV en Plaquetas y Glóbulos rojos provenientes de donantes sanos de la Cruz Roja Colombiana

Una vez se obtuvieron alícuotas, provenientes de las 3 réplicas que se recolectaron durante cada día de los 7 días de observación (desde el día 0 hasta el día 6) en el caso de plaquetas y, alícuotas provenientes de las 2 réplicas que se recolectaron cada 7 días de observación (hasta los 21 días) en el caso de glóbulos rojos, fueron utilizados 140 µL de cada una de las alícuotas para purificar RNA viral, para esto se realizó la extracción de RNA utilizando un kit comercial (Qiagen ref: 52906) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El RNA viral purificado se utilizó para la detección molecular de ZIKV y β-Actina, utilizando un enfoque de RT-qPCR de un solo paso, previamente estandarizada en el grupo de virología de la Universidad El Bosque, brevemente la amplificación fue llevada a cabo en un volumen final de 10 µL, utilizando el sistema Luna Probe One-Step RT-qPCR NEB, 5 µL de plantilla (60 - 80 ng/µL) y una concentración de oligos (Forward y Reverse) y sondas a una concentración de 0,4mM, bajo el siguiente protocolo de amplificación; retrotranscripción a 55ºC por 15 min; denaturación inicial a 95ºC por 3 min y 40 ciclos de amplificación así 95ºC por 15 seg, 55ºC por 30 seg y 72ºC por 30 seg. Cabe resaltar que los oligos utilizados amplifican una región del genoma de ZIKV, ubicada entre el gen codificante para la proteína C y la región 5’ no traducida o UTR (Y. Song et al., 2019).

La prueba de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se ha convertido en una herramienta de uso común en los laboratorios dedicados al diagnóstico e investigación. Su aplicabilidad abarca diversas áreas, desde la detección de mutaciones y patógenos hasta la investigación forense, siendo incluso la base esencial para la secuenciación del genoma humano (Prada-Arismendy & Castellanos, 2011). Una variante importante de esta técnica es la PCR en tiempo real, también conocida como PCR cuantitativa (qPCR), la cual sobresale por su capacidad para cuantificar ácidos nucleicos con una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad mejoradas.

En el contexto de la cuantificación de secuencias diana mediante PCR en tiempo real, se fundamenta en la detección y medición de productos amplificados, conocidos como amplicones, en cada ciclo de la reacción de amplificación. La clave de este proceso radica en la detección continua y la medición del aumento de la señal de fluorescencia a lo largo de la

reacción. Esta señal de fluorescencia se correlaciona directamente con la cantidad de ADN presente en cada momento de la reacción, proporcionando así una evaluación cuantitativa precisa de las secuencias diana. Este enfoque innovador no solo mejora la sensibilidad del análisis, sino que también contribuye a la especificidad y reproducibilidad de los resultados, consolidando la PCR en tiempo real como una técnica invaluable en el campo de la investigación molecular (Prada-Arismendy & Castellanos, 2011). Los dispositivos de PCR en tiempo real que he desarrollado posibilitan la identificación del número de productos amplificados generados en cada ciclo de la fase logarítmica de amplificación. En consecuencia, esta técnica ha suprimido la necesidad de manipulación de muestras, permitiendo la completa automatización de los sistemas de amplificación y detección. Este avance contribuye a minimizar los riesgos de contaminación.

Existen dos enfoques principales para la cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. La cuantificación absoluta implica expresar la cantidad inicial del producto objetivo, en este caso el virus del Zika (ZIKV), mediante un valor absoluto, que se expresa como Copias Virales/µl del virus Zika. Por otro lado, la cuantificación relativa describe cambios en la cantidad del virus Zika en relación con un gen de referencia, en este caso, la β-actina. Además de esto se implementa el método ΔΔct el cual compara la variación de la expresión (ΔCt) del gen ZIKV con la del gen de β-actina, y lo hace primero en condiciones experimentales y, por otra parte, en controles positivos. Tomando como referencia la siguiente ecuación: $\Delta \mathrm{Ct}_{\,\mathrm{muestra}} = \mathrm{Ct}_{\mathrm{ZIKV}} - \mathrm{Ct}_{\beta-\mathrm{actina}}$. Considerando lo expuesto anteriormente, se procede a comparar las disparidades entre las muestras que contienen el ZIKV y las del control positivo (Labster Theory. s.f).

En este análisis, se utiliza como punto de referencia el promedio de las mediciones tomadas en el día 0. Este enfoque permite evaluar y destacar las variaciones significativas en la presencia y expresión del ZIKV en comparación con las condiciones de control establecidas desde el inicio del experimento. $\Delta\Delta \mathrm{Ct} = \Delta \mathrm{Ct}_{\mathrm{ZIKV}} - \Delta \mathrm{Ct}_{\mathrm{promedio\ día\ 0}}$. Se procedió al cálculo de las variaciones relativas en la expresión génica entre las dos secuencias comparadas utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta \mathrm{Ct}}$, donde el valor 2 representa la eficiencia, estandarizada en un 100%. Este método de análisis posibilita la cuantificación precisa de los cambios relativos en la expresión génica, siendo particularmente útil para evaluar la dinámica de la replicación viral. La utilización de esta fórmula brinda una herramienta efectiva para comprender y medir la magnitud de las alteraciones en la expresión génica en el contexto del estudio de la replicación del virus en cuestión (Labster Theory. s.f).

Análisis estadístico

Con el objetivo de caracterizar la población de estudio, se utilizaron medidas de tendencia central, que incluyen promedio y desviación estándar (DE), lo anterior, basado en el estudio del supuesto de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Ahora bien, para evaluar si existían diferencias entre cada una de las observaciones de plaquetas (7 observaciones en un total de 7 días) y glóbulos rojos (4 observaciones en un total de 28 días), se utilizó la prueba de análisis de la varianza o ANOl con el objetivo de caracterizar la población de estudio, se utilizaron medidas de tendencia central, que incluyen promedio y desviación estándar (DE), lo anterior, basado en el estudio del supuesto de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Ahora bien, para evaluar si existían diferencias entre cada una de las observaciones de plaquetas (7 observaciones en un total de 7 días) y glóbulos rojos (4 observaciones en un total de 28 días), se utilizó la prueba de análisis de la varianza o ANOVA y el test de Kruskal-Wallis según fuera pertinente. Los análisis estadísticos serán realizados utilizando el paquete estadístico GraphPad versión 10.0.2.

La multiplicidad de infección o MOI representa la relación entre el número de partículas virales y el número de células huésped en un medio de infección determinado. Un valor de MOI = 1 implica que, en promedio, hay una única célula huésped para una sola partícula de fago. Sin embargo, en realidad puede haber múltiples partículas adsorbidas en una sola célula huésped, mientras que algunas de las células huésped pueden permanecer no infectadas. (Abedon, S. T., & Bartom, E. 2013).

7. Resultados y Análisis de Resultados

El genoma de virus Zika es estable en plaquetas bajo las condiciones de almacenamiento de banco de sangre

Se inocularon unidades de Plaquetas con ZIKV purificado a un MOI de $2{,}61x10^{-6}$, que es intermedia en el amplio rango notificado para la viremia asintomática. Durante el transcurso del almacenamiento en condiciones de banco de sangre, cada una de las mediciones de RNA viral de ZIKV, desde el día 0 hasta el día 7 se identificó que el genoma viral tiene una disminución logarítmica de la carga viral con tendencia a la estabilidad en el tiempo (Figura 2).

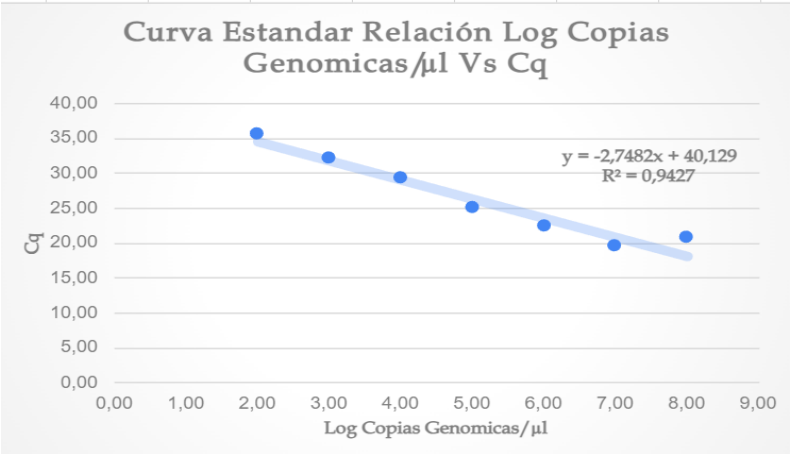
Esto se llevó a cabo por la técnica RT-qPCR de un solo paso, previamente estandarizada en el grupo de virología de la Universidad El Bosque. Inicialmente se realizó la cuantificación absoluta, en donde se amplifico simultáneamente un estándar externo, en la que se amplifican cantidades crecientes conocidas del estándar (plásmido CDZ) inicialmente con $1{,}02x10^{2}$ copias genómicas/µl hasta llegar a $1{,}02x10^{8}$ copias genómicas/µl para un total de 7 muestras estándar en plaquetas; posteriormente se obtuvo un Cq para cada una de ellas con la técnica PCR, evidenciada en la siguiente tabla.

Tabla 1. Datos Muestra Estándar Plaquetas.

DATOS MUESTRA ESTANDAR PLAQUETAS					
N°	Fluoróforo	Plásmido	Copias Genomicas/µl	Log Copias Genomicas/µl	Cq
1	HEX	CDZ-1	1,02E+08	8,01	20,69
2	HEX	CDZ-2	1,02E+07	7,01	19,44
3	HEX	CDZ-3	1,02E+06	6,01	22,41
4	HEX	CDZ-4	1,02E+05	5,01	25,06
5	HEX	CDZ-5	1,02E+04	4,01	29,19
6	HEX	CDZ-6	1,02E+03	3,01	32,18
7	HEX	CDZ-7	1,02E+02	2,01	35,58

Con estos datos contemplados en la Tabla 1, se realizó la gráfica de regresión lineal como se puede evidenciar en la Figura 1, en donde se obtiene la ecuación de la recta, la cual se utiliza para extrapolar los datos de cada una de las muestras problema (plaquetas con ZIKV), con esta información se conoce el número de copias virales en la muestra inicial antes de la amplificación.

Figura 1. Curva Estándar Plaquetas.



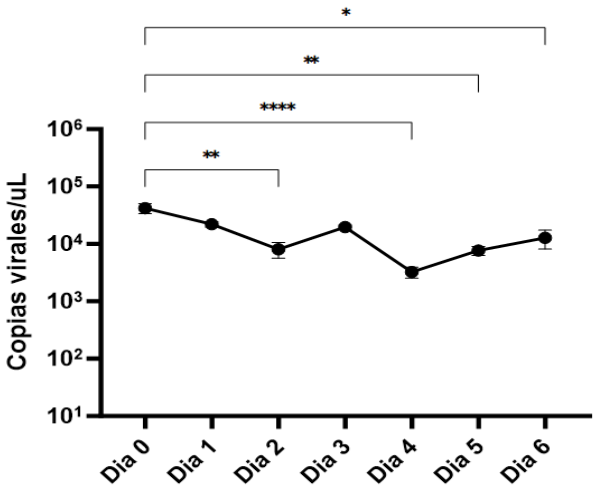
Una vez obtenida la curva estándar, se tuvieron en cuenta las 7 muestras de plaquetas analizadas durante los 6 días partiendo del día 0 con sus respectivas réplicas (Anexo 5). Estos datos fueron tratados de tal manera que se calculara un promedio entre los valores obtenidos; de allí se obtiene la tabla 2, para evidenciar el comportamiento de la carga viral del ZIKV en las plaquetas.

Tabla 2. Muestra de Datos Promedio para Plaquetas del día 0 al día 6.

MUESTRAS DE DATOS PROMEDIO PLAQUETAS					
N°	Fluoróforo	Dias	Cq Promedio	Log Copias Virales/µl	Copias virales/µl
1	HEX	DÍA 0	27,52	4,59E+00	3,86E+04
2	HEX	DÍA 1	28,23	4,33E+00	2,14E+04
3	HEX	DÍA 2	29,71	3,79E+00	6,19E+03
4	HEX	DÍA 3	28,35	4,28E+00	1,93E+04
5	HEX	DÍA 4	30,66	3,44E+00	2,78E+03
6	HEX	DÍA 5	29,59	3,84E+00	6,86E+03
7	HEX	DÍA 6	29,33	3,93E+00	8,52E+03

De acuerdo con la tabla anterior encontramos que los valores detectados oscilan entre los 2780 a 38600 copias virales/µl durante los días analizados. En donde podemos ver que del día 0 al día 6 hay una disminución en la carga viral de las muestras. Sin embargo, cuando se observa el día 3, vemos un aumento de las copias virales/µl presentes en las muestras, pero a partir del día 4 tiende nuevamente a caer, dando una perspectiva de que tiende a degradarse a través del tiempo. Para apreciar este comportamiento de carga viral del ZIKV, se realizó la siguiente Figura.

Figura 2. Variación de las copias virales/µL del ZIKV a lo largo del tiempo en Plaquetas.



Este gráfico representa el comportamiento de las Plaquetas con ZIKV a través del tiempo, la cual fue medida cuantificando el genoma viral, desde una perspectiva independiente del número de células que hayan podido estar disponibles día a día para su posible replicación, la cual fue tratada y realizada con estadística no paramétrica comparando todos los datos, usando la prueba de Kruskal- Wallis con un post hoc de dunn con ayuda del Software GraphPad Prism. Cabe resaltar que cada una de las gráficas aquí presentadas, utilizaron y se rigieron bajo la misma estadística y programa.

Este análisis se presenta desde la perspectiva de partida del experimento, es decir tomando de referencia el día 0, en donde se evidencia que los valores en la figura 2 van disminuyendo a medida que transcurre el tiempo. En un principio, después de las primeras 24h se ve como disminuye la carga viral del ZIKV, al igual que lo reflejado en el número de copias virales/µl de la tabla 3. La figura nos muestra de manera gráfica el comportamiento del ZIKV, en donde el día 3, es el dato que muestra un aumento de la carga viral después de un descenso, sin embargo, el valor de este día no es considerado estadísticamente significativo frente al día 0, a diferencia de los días 2,4,5 y 6, en donde su nivel de diferencia significativa se representa a través de los asteriscos (Un asterisco hace referencia a que el valor es menor a 0,05, 2 asteriscos menor a 0,01, tres asterisco menor 0,001, y cuatro asteriscos es de 0,0001, siendo valores muy pequeños con diferencias significativa), entre mayor sea la presencia de ellos la diferencia frente al día 0 será mayor, como en el caso del día 4.

No obstante, estos resultados no superan la cantidad de carga viral presente o inoculada en relación con el día 0. Por tanto, podríamos considerar la posibilidad de que, del día 2 a 3 se pudiera presentar una replicación del ZIKV, ocurriendo lo mismo a partir del día 4 al día 5 y 6, a pesar de que la tendencia es a degradarse y no se siga un patrón lineal. Este

comportamiento es similar de acuerdo con el trabajo de (Sutherland et al., 2016) el cual mostró que el genoma de DENV2 aumentó aproximadamente 3 veces durante el período de almacenamiento de 7 días en unidades de plaquetas, teniendo en cuenta que esta comparación se hace en relación con que estos virus provienen de la misma familia de mosquitos.

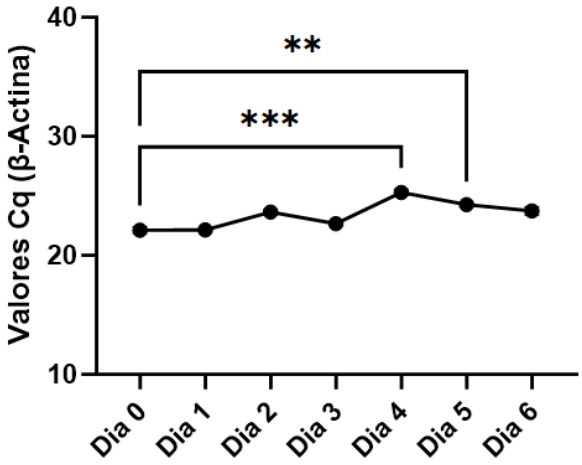
Sin embargo se podría decir que no necesariamente ese comportamiento de aumento del ZIKV, de los días 3 y 5 y 6 , que son los que aumentan después de un descenso, se deba a la replicación, si no a que al ser la tasa de degradación mayor a la tasa de replicación en caso de que ésta exista, da indicios de que el virus esté intentando mantenerse en el tiempo, puesto que si hubiera más frecuencia en la replicación, probablemente se elevaría el valor de las copias virales/µl, en comparación a las del día 0.

Aquí es donde surge la duda, en cuanto al contenido de la muestra, en donde en este punto no es certero si esa degradación también se deba a una disminución de la cantidad de células presentes en la muestra, y por tanto hay menor cantidad de RNA viral en el día 6 en comparación con el día 0. De allí parte la realización de la cuantificación relativa, con el propósito de verificar si a lo largo del tiempo pudo existir cambios en el número de células presentes en el ensayo, y si esto afectó en la cuantificación del número de copias virales, entonces se procedió a realizar una cuantificación relativa.

Esta cuantificación relativa nos permite ver los cambios en la cantidad relativa del ZIKV en comparación con el gen de la β-actina presente en las células (Figura 4). Para ello se tuvo en cuenta el método delta delta Ct (ΔΔCt), el cual parte de una suposición importante respecto a la PCR, en donde las eficiencias de amplificación del gen de referencia (β-actina) y del gen de interés ZIKV) deben ser aproximadamente iguales.

Sin embargo, antes de aplicar este método, se optó por graficar los valores obtenidos de Cq para la β-actina como se aprecia en la Figura 3, siendo el primer paso para establecer si el número de células se mantuvo estable a lo largo del tiempo, dado a que este gen, hace parte de las células, siendo una proteína comprendida dentro de la estructura celular. Por tanto, su presencia nos permite verificar la presencia o ausencia de células en la muestra.

Figura 3. Cuantificación relativa β-actina a lo largo del tiempo en Plaquetas.



Esta figura que contiene los valores de Cq de β-actina, tienden a ser valores más o menos homogéneos en el tiempo. A pesar de ello, se evidencia que los días 4 y 5 tienen valores Cq mayores y significativamente diferentes en relación con el día 0, que nos sugiere un número menor de molde de DNA, que probablemente proviene de un número menor de células, sugiriendo que en estos últimos días el contenido celular es menor al finalizar el ensayo.

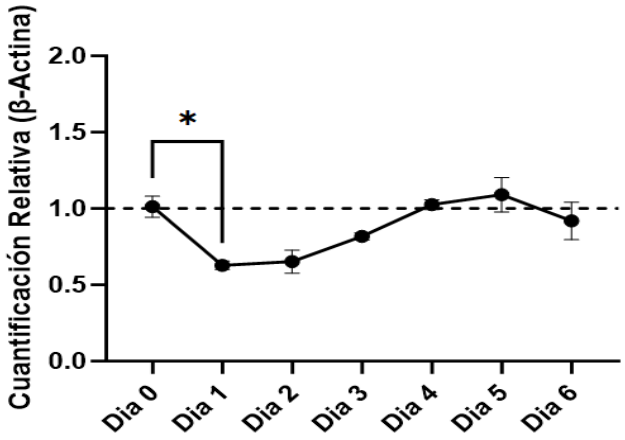
A pesar de que la figura no muestra que el valor del día 6 sea significativamente diferente al día 0, para que exista una correlación en que los últimos días existan menos células, tuvimos en cuenta el valor de P (Probabilidad) para este día, siendo de 0,0598, siendo muy cercano al límite de significancia. Confirmando que efectivamente al finalizar el ensayo este número de células pudo haber disminuido.

Basado en lo anterior, al evidenciar un valor Cq más alto, es decir, que hay menos DNA que provienen de menos células y menos plantilla que amplificar, al realizar la corrección relativa al número de células, permitió que la cuantificación relativa refleje en sí, el comportamiento del genoma viral corregido, frente al número de células. Para ello se empleó el método delta delta Ct mencionado anteriormente, calculando las variaciones relativas de la expresión génica entre las dos secuencias. La totalidad de datos se pueden evidenciar en el Anexo 6. Sin embargo, se realizó un promedio de estos datos para evidenciar su relación (Tabla 3), y así poder graficar los valores como se observa en la Figura 4.

Tabla 3. Valores cuantificación relativa promedio por el método delta delta Ct (ΔΔCt) Plaquetas.

CUANTIFICACIÓN RELATIVA PROMEDIO						
N°	Dias	Cq Promedio Virus	Cq promedio Beta Actina	ΔCq	ΔΔCq	2^-ΔΔCq
1	DÍA 0	27,52	22,12	5,40	0,00	1,00
2	DÍA 1	28,23	22,15	6,08	0,68	0,62
3	DÍA 2	29,71	23,64	6,07	0,67	0,63
4	DÍA 3	28,35	22,65	5,70	0,30	0,81
5	DÍA 4	30,66	25,29	5,37	-0,03	1,02
6	DÍA 5	29,59	24,27	5,32	-0,08	1,06
7	DÍA 6	29,33	23,74	5,59	0,19	0,88

Figura 4. Cuantificación relativa corregida β-actina a lo largo del tiempo en Plaquetas.



Este enfoque implica considerar que, en el inicio del estudio día 0, existe una cantidad estándar establecida que se toma como punto de referencia. Posteriormente, se monitorea cómo varía esta cantidad en función del tiempo.

La figura 4 nos sugiere que a partir de los dos primeros días hay una caída en el número de copias virales, en donde se ve la degradación del ZIKV, pero a partir del día 3 se evidencia un aumento acercándose a 1, inclusive el valor del día 4 y 5 alcanza dicho valor, pero a partir del día 6 este nuevamente disminuye, pero no es significativamente diferente frente al día 0. Si se observa el gráfico en términos generales, podemos decir que, al corregir por el número de células, los valores son progresivos y tiende a mantenerse en el tiempo. La tendencia que sigue la curva nos sugiere que el virus puede probablemente replicarse en estas células, para mantener un nivel estable en el número de copias en el cultivo, interpretándose como una lucha por mantenerse estable.

Por tanto, si nos basamos en el comportamiento de la cuantificación absoluta y relativa presentes en las figuras 2 y 4, tomando como referencia el primer y último día del ensayo, deducimos que a pesar de que, si hay una disminución en el número de copias virales del ZIKV los primeros días, el virus después del tercer día vuelve a restablecerse intentando mantenerse en el tiempo como en el día 0. Inclusive, podemos decir, que esta disminución de carga viral que se presenta se relaciona a la cantidad de células viables presentes en la muestra para que este pueda replicarse. Este hallazgo sugiere que la replicación y carga viral del virus ZIKV en plaquetas tiende a permanecer estable en condiciones de almacenamiento en banco de sangre.

Las copias genéticas de ZIKV disminuyen con el tiempo en glóbulos rojos bajo las condiciones de almacenamiento de banco de sangre

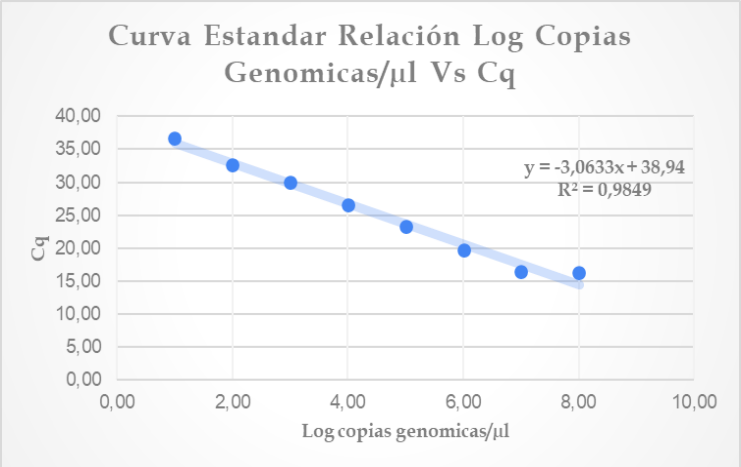
Otro de los hemocomponentes analizados durante el ensayo fueron los glóbulos rojos. A diferencia de las plaquetas, el análisis de glóbulos rojos se llevó a cabo durante un período de 21 días (3 semanas), en los cuales se recopilaron datos cada 7 días. Se inocularon unidades de Glóbulos Rojos con ZIKV purificado a una proporción de células primarias de $1{,}64x10^{-7}$ MOI que es intermedia en el amplio rango notificado para la viremia asintomática. Durante el transcurso del almacenamiento en condiciones de banco de sangre, cada una de las mediciones de RNA viral de ZIKV, desde el día 7 hasta el día 21 se identificó que el genoma viral tiene una disminución logarítmica (Figura 5).

La cuantificación en los glóbulos rojos se realizó siguiendo el mismo procedimiento que se mencionó anteriormente para las plaquetas. Es importante resaltar que, para el plásmido CDZ, en este caso se trabajó con una concentración estándar inicial de $1{,}02x10^{1}$ copias genómicas/µl, que se incrementó gradualmente hasta alcanzar $1{,}02x10^{8}$ copias genómicas/µl (Tabla 4). Esto se hizo con el propósito de generar una curva estándar específica para los glóbulos rojos, como se muestra en la Figura 5.

Tabla 4. Datos Muestra Estándar Glóbulos rojos.

DATOS MUESTRA ESTANDAR GLOBULOS ROJOS					
N°	Fluoróforo	Plásmido	Copias Genomicas/ µl	Log Copias Genomicas/ µl	Cq
1	HEX	CDZ-1	1,02E+08	8,01	16,24
2	HEX	CDZ-2	1,02E+07	7,01	16,40
3	HEX	CDZ-3	1,02E+06	6,01	19,66
4	HEX	CDZ-4	1,02E+05	5,01	23,21
5	HEX	CDZ-5	1,02E+04	4,01	26,45
6	HEX	CDZ-6	1,02E+03	3,01	29,91
7	HEX	CDZ-7	1,02E+02	2,01	32,59
8	HEX	CDZ-8	1,00E+01	1,00	36,60

Figura 5. Curva Estándar Glóbulos rojos.



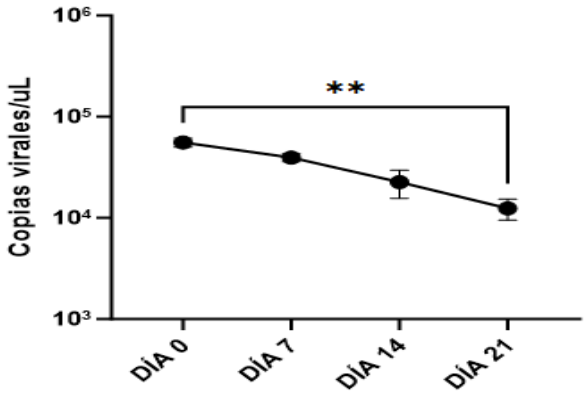
Una vez obtenida la curva estándar se procedió a analizar las 4 muestras de glóbulos rojos obtenidas durante los 21 días (3 semanas), teniendo en cuenta el día 0, junto con sus respectivas réplicas, cada una realizada por duplicado (Anexo 7). En la tabla 5 se observa el promedio del comportamiento de la carga viral del virus ZIKV en glóbulos rojos a lo largo del tiempo.

Tabla 5. Muestra de Datos Promedio de glóbulos del día 0, 7, 14 y 21.

MUESTRA DE DATOS PROMEDIO GLOBULOS ROJOS					
N°	Fluoróforo	DÍAS	CQ $\bar{X}$	Log copias virales/µl	Copias virales/µl
1	HEX	DÍA 0	24,42	4,74	5,49E+04
2	HEX	DÍA 7	24,87	4,59	3,90E+04
3	HEX	DÍA 14	25,83	4,28	1,90E+04
4	HEX	DÍA 21	26,51	4,06	1,14E+04

De acuerdo con la tabla anterior se puede observar que los valores detectados oscilan entre los 11400 a 54900 copias virales/µl durante los días analizados, en donde podemos ver que del día 0 al día 7 hay una disminución en la carga viral de manera progresiva en cada una de las muestras, es decir que, se aprecia que la cantidad del genoma viral del ZIKV disminuye a través del tiempo. Para apreciar este comportamiento de carga viral del ZIKV, se realizó la siguiente figura.

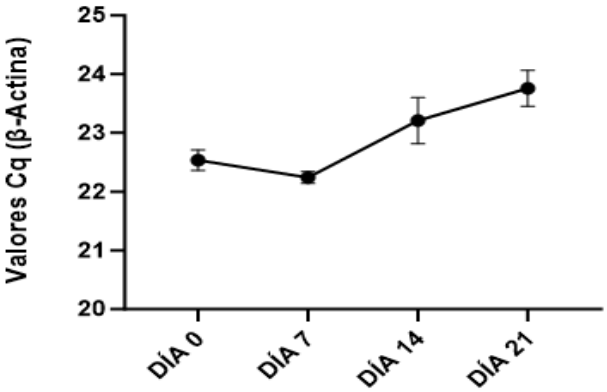
Figura 6. Variación de las copias virales/µL del ZIKV a lo largo del tiempo en glóbulos rojos.



En la figura 6, se puede evidenciar que a medida que transcurre el tiempo, el número de copias virales experimenta una disminución constante, sugiriendo una posible degradación del virus. Si observamos el día 21 en relación con el día 0, es el único valor que se considera estadísticamente significativo, mientras que, el cambio presentado entre los otros días no presentó una diferencia estadísticamente significativa. Este hallazgo sugiere que la carga viral del virus ZIKV en los glóbulos rojos tiende a disminuir bajo condiciones de almacenamiento del banco de sangre. Además, podría considerarse que no hay replicación del ZIKV en este hemocomponente, sin embargo, para tener mayor robustez en la información se procedió a realizar la cuantificación relativa.

Para los glóbulos rojos se siguió el mismo fundamento de cuantificación relativa utilizado para plaquetas, con el fin de ver los cambios en la cantidad relativa del ZIKV en comparación con el gen de la β-actina, se tuvo en cuenta el método delta delta Ct (ΔΔCt). Antes de aplicar este método, se analizaron los valores obtenidos de Cq para la β-actina como se aprecia en la Figura 7, siendo el primer paso para establecer si el número de células se mantuvo estable a lo largo del tiempo. La presencia de β-actina nos permitió verificar la presencia o ausencia de células en la muestra.

Figura 7. Cuantificación relativa β-actina a lo largo del tiempo en glóbulos rojos.



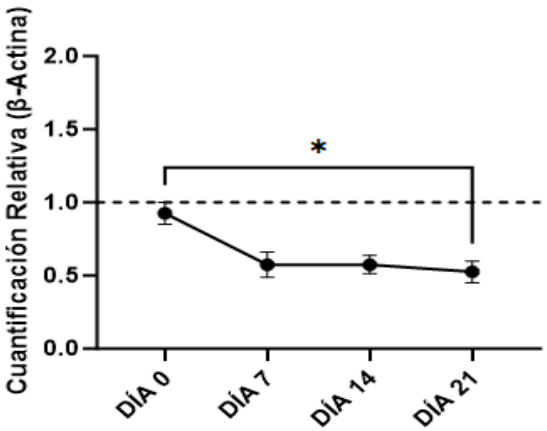
De acuerdo con la figura anterior, podemos deducir que a medida que pasa el tiempo el número de células que se encuentran presentes en la muestra van disminuyendo, dado a que, después del día 7 se evidencia un aumento en el valor de Cq, lo cual indica que la prueba PCR, se tardó más tiempo en detectar molde de DNA, que probablemente la causa sea que existe menor contenido celular y exista muerte de las células. Además, hay que tener en cuenta que estas muestras permanecieron a una temperatura de 4°C en reposo, lo cual pudo ser un factor que permitiera que hubiera una lisis celular por el cambio de temperatura en el momento de realizar la prueba.

Otro factor que se puede observar en el gráfico es que pasados los 7 días hay un aumento del Cq de β-actina, sin embargo, este no es un valor estadísticamente significativo, por tanto, se interpreta como un valor equivalente o similar al del día 0. Para verificar esta información se lleva a cabo la corrección relativa de β-actina y así verificar el valor del día 7 que es el que resalta o sale un poco de la tendencia del gráfico. Esto se llevó a cabo de la misma manera que en el caso de las plaquetas, por medio del método delta delta Ct (ΔΔCt). La totalidad de datos se pueden evidenciar en el Anexo 8. Para esto, se realizó un promedio de los datos para evidenciar la relación entre sí (Tabla 6), y así poder graficar los valores como se observa en la Figura 8.

Tabla 6. Valores cuantificación relativa por el método delta delta Ct (ΔΔCt) Glóbulos Rojos.

CUANTIFICACIÓN RELATIVA PROMEDIO GLOBULOS ROJOS						
N°	**Dias**	**Cq Promedio Virus**	**Cq promedio Beta Actina**	**ΔCq**	**ΔΔCq**	**2^-ΔΔCq**
1	DÍA 0	24,42	22,54	1,884	0,079	0,947
2	DÍA 7	24,87	22,24	2,635	0,830	0,562
3	DÍA 14	25,83	23,21	2,624	0,819	0,567
4	DÍA 21	26,51	23,76	2,753	0,948	0,518

Figura 8. Cuantificación relativa corregida de β-actina a lo largo del tiempo en glóbulos rojos.



En la figura 8, se puede apreciar la corrección realizada en la cuantificación relativa. Esta corrección se llevó a cabo para verificar la posible replicación del virus del ZIKV, analizando el comportamiento de las copias virales a lo largo del tiempo en comparación con un punto de referencia específico, que en este caso corresponde al "día 0".

Esta estrategia de normalización con un valor inicial de 1 permite visualizar claramente las tendencias de aumento o disminución en relación con el punto de partida, facilitando así la evaluación de la dinámica de replicación viral a lo largo del período estudiado. En la figura 8, se observa que el comportamiento de la replicación del ZIKV en glóbulos rojos disminuye a lo largo del tiempo durante un periodo de 3 semanas, en la cual se da una reducción significativa entre el día 0 y el día 21. La falta de replicación del material genético viral en los glóbulos rojos puede atribuirse a la ausencia de núcleo celular, lo que impide tanto la transcripción como la replicación del material genético. Además, la limitada presencia de ribosomas en estos glóbulos rojos no es suficiente para mantener el proceso de replicación viral. En un estudio llevado a cabo con el virus del DENV, un arbovirus perteneciente a la misma familia que el virus del ZIKV, se observa que los glóbulos rojos, al no tener orgánulos intracelulares, no tienen la capacidad necesaria para replicar el ARN del DENV. (Sutherland et al., 2016). Este hallazgo sugiere que el ZIKV podría haber exhibido un comportamiento similar en relación con la replicación viral en glóbulos rojos.

Por tanto, si nos basamos en el comportamiento de la cuantificación absoluta y relativa presentes en las figuras 6 y 8, tomando como referencia el primer y último día del ensayo, deducimos que si hay una disminución evidente en el número de copias virales del ZIKV y no existe una replicación durante el periodo de tiempo del ensayo. Como se mencionó anteriormente un factor que permite la disminución de carga viral, puede estar relacionado a la cantidad de células que no se encuentran viables en la muestra para que el ZIKV pueda replicarse. Se deduce que, si el tiempo del ensayo hubiera sido por más tiempo, se podría confirmar si se llega a un punto, donde no hay suficiente molde para amplificar y no sea posible detectar el ZIKV en este tipo de hemocomponente. Este hallazgo sugiere que a través del tiempo la carga viral del ZIKV en glóbulos rojos tiende a degradarse en condiciones del banco de sangre.

Importancia del Virus Zika en la Salud Pública Colombiana

En base a la información de la replicación y carga viral en plaquetas y glóbulos rojos, evaluamos el impacto que tiene el ZIKV en la salud pública colombiana, puesto que, se puede evidenciar que es de vital importancia tomar medidas para identificar el ZIKV y mitigar posibles problemáticas relacionadas a la salud pública. En la literatura se muestra que el ZIKV

este asociado con diferentes patologías como microcefalia, síndrome de Guillain-Barré y transmisión sexual como vía alternativa de infección. Aunque los casos de enfermedad por el ZIKV disminuyeron a partir de 2017 en todo el mundo, la transmisión del virus persiste a niveles bajos en varios países de las Américas y otras regiones endémicas, incluyendo a Colombia, que es parte del total de 89 países y territorios que han notificado casos de infección por el virus Zika transmitida por mosquitos.

Este virus tiene la capacidad de manifestarse de forma asintomática en la mayoría de los casos, especialmente en individuos que han sido infectados por el vector directamente o a través de transfusiones sanguíneas. Esta característica presenta un desafío significativo para su identificación, ya que la ausencia de síntomas distintivos dificulta la diferenciación de la sintomatología asociada al virus. Las transfusiones sanguíneas, especialmente los hemocomponentes como plaquetas y glóbulos rojos, suelen ser utilizados para pacientes con leucemia, cáncer, que requieren trasplantes, intervenciones quirúrgicas y para otras patologías. Por tanto, el componente sanguíneo se considera un medicamento y la transfusión sanguínea se puede ver como un tratamiento. De tal manera si se presenta un factor que pueda alterar la estabilidad o la calidad de los componentes esto presentaría un riesgo para los pacientes.

Un ejemplo claro de esta situación, que probablemente se presenta a diario, ocurre en el escenario en el que un donante voluntario se presenta al banco de sangre para donar sus componentes sanguíneos, siendo una persona asintomática que porta el ZIKV. La unidad de sangre donada se almacena antes de ser distribuida a un receptor. Una vez que esta unidad es transfundida, el virus se encuentra presente en el nuevo receptor. Este fue el escenario que se procuró simular durante el ensayo, como se mencionó anteriormente, en el cual los hemocomponentes estudiados, como plaquetas y glóbulos rojos, fueron almacenados según las condiciones establecidas por el banco de sangre de la Cruz Roja Colombiana.

Los resultados obtenidos durante el ensayo destacan la importancia crucial de verificar la presencia de este tipo de virus en los componentes sanguíneos. Desde la perspectiva de un hemocomponente como las plaquetas, es de gran relevancia asegurarse de que no haya presencia de virus en las transfusiones sanguíneas, dado a que como se evidencio en la cuantificación absoluta y relativa, se observa que si un donante contiene el virus en su sangre y dona sangre (día 0), mientras que se espera a un receptor para transfundir los hemocomponentes y esto llega a ocurrir en el día 3, según los resultados obtenidos se puede evidenciar que el virus sigue siendo detectable, sin embargo, no se tiene certeza de que este sea infeccioso. Por otro lado, en los glóbulos rojos se evidencia que a pesar de que el virus se degrada o no haya replicación el genoma viral sigue siendo detectable.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que este genoma viral que se evidenció, por medio de la amplificación detectó un fragmento del RNA, no el RNA completo, de hecho, puede existir la posibilidad en que el RNA puede estar roto, fragmentado, o que justo coincida lo que se está amplificando, en una porción de ese RNA que se rompió y se puede considerar e interpretar que ese genoma del virus está completo y resulta que se encuentra degradado. Por eso este no es un último dato confirmatorio, es un indicio de que ahí está el RNA viral, faltaría confirmar si realmente, si lo encontrado hace parte de partículas que infectan, pero la manera de evidenciarlo es con un ensayo de plaqueo.

Por tanto, se debe considerar tomar medidas para contrarrestar los casos de contagio, especialmente en Colombia, dado a que se cataloga como un país endémico por su ubicación geográfica, lo cual lo hace ser un lugar habitable e ideal para este tipo de artrópodo transportador del virus. Teniendo en cuenta que este virus comparte la misma o similar sintomatología que con los otros arbovirus presentes en el país, como el dengue y el chikungunya, es esencial tener controles específicos para identificar esta problemática, especialmente en lugares como bancos de sangre que requieren controles rigurosos para poder utilizar posteriormente la sangre.

La falta de supervisión ante este tipo de arbovirus puede convertirse en un problema de salud pública, especialmente en pacientes que reciben transfusiones sanguíneas y ya tienen patologías preexistentes que requieren de estas alternativas. Esto puede saturar el sistema de salud por complicaciones médicas por el contagio ocasionado.

A nivel nacional, los controles actuales en la identificación de arbovirus son casi inexistentes, lo que evidencia la necesidad de tomar medidas para prevenir y controlar la propagación del virus Zika en Colombia, teniendo en cuenta que el componente sanguíneo haces las veces de medicamento, siendo agente terapéutico, para aquellas patologías anteriormente mencionadas.

Con esto se busca que exista un control de calidad del componente sanguíneo, para este tipo de arbovirus, a pesar de que por rutina en el banco de sangre si detectan la presencia de virus como virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros, pero se dejan por fuera este tipo de virus, y resulta que hay antecedentes de transmisión de este virus por transfusión sanguínea en otros países, y aquí en Colombia aún no se ha realizado nada referente al tema, en donde no hay datos ni controles de rutina. Por tanto, podemos decir que nosotros somos los primeros en tratar de mostrar en Colombia, un aporte a mejorar la calidad de estos hemocomponentes, para aumentar la seguridad en su uso, cuando un receptor de este componente lo reciba.

8. Consideraciones éticas

Ver anexo 9 y 10 los cuales contienen el consentimiento informado especifico del macroproyecto en investigación de arbovirus y el aval ético con número de acta 011-2019 para poder realizar el poryecto de investigación.

9. Conclusiones

1. Tras el análisis, el virus Zika en el componente sanguíneo plaquetas tiene un comportamiento de disminución de la carga viral al inicio del experimento, sin embargo, pasados 2 días, tiende a un posible proceso de replicación viral, sin superar la carga viral inoculada el día 0, en donde el virus intenta mantener estable la cantidad de virus en el componente sanguíneo, pero no superior al día 0, evidenciando que la tendencia de tasa de degradación es mayor a la de replicación. Esto se evidencio a través de la cuantificación absoluta y soportado en la cuantificación relativa. Se esperaría detectar por medio de otras técnicas si el virus del día 6 sigue siendo infeccioso.

2. Como se ha podido observar el comportamiento de glóbulos rojos es opuesto al de plaquetas, pues la tendencia del virus Zika en este componente sanguíneo es completamente a degradarse, en donde el día 21 tiene menos contenido de RNA viral comparado con el día 7. Este hemocomponente no tiene aumento de carga viral ni hay replicación, por tanto, existen menos partículas virales, comparados a las inoculadas al inicio del experimento. Se esperaría ver que en el día 21 el contenido de virus restante no sea infeccioso, sin embargo, esta investigación no tuvo ese alcance, lo cual se podría llevar a cabo en un próximo experimento.

3. Gracias a todo lo anterior, podemos concluir que es importante aportar en el mejoramiento de la seguridad transfusional, adoptando medidas de detección de arbovirus como el Zika, que son endémicos en nuestro país y tienen antecedentes de transmisión por esta vía transfusional, para mejorar la calidad del componente sanguíneo y mitigar posibles problemas de salud pública en Colombia.

10. Recomendaciones

Una vez culminado el trabajo, y después de haber expuesto los resultados, discutirlos y dar respuesta a los objetivos planteados, podemos encontrar algunas recomendaciones, las cuales deben tenerse en cuenta, para su futura implementación. Tanto para el ensayo como para la toma de medidas para mitigar lo discutido en la importancia en la salud pública colombiana.

En cuanto a las recomendaciones, para fortalecer la investigación realizada, se debe tener en cuenta aspectos individuales para cada uno de los componentes sanguíneos aquí estudiados, los cuales se consideran pertinentes para asegurar la información y en medida de los acontecimientos que surgieron del ensayo.

En primer lugar, para el ensayo de plaquetas, en relación con la cuantificación absoluta, evidenciamos que el dato más atípico presentado en la figura 2 es el del día 3, en donde tendría que aumentarse el número de réplicas en cada muestra, para tener más información, puesto que, entre más datos se tenga frente a cada día, más sólido se vuelve el valor. Esta recomendación también puede ser aplicada en el caso de glóbulos rojos para tener una mayor certeza y robustez de la información.

En segundo lugar, para el ensayo de glóbulos rojos, se debe considerar utilizar otro tipo de recipiente que permita garantizar la viabilidad de las células para corroborar que los resultados acá descritos sigan la misma tendencia. Debido a que se plantea la hipótesis de que esta tendencia de disminución gradual a lo largo del tiempo de glóbulos rojos puede haber sido influenciada por las condiciones de almacenamiento en las placas de cultivo de 6 pozos, las cuales podrían no haber sido las óptimas. Específicamente, la falta de movimiento y la posibilidad de que pequeñas partículas quedaran atrapadas en los bordes de las placas, podrían haber contribuido a este comportamiento.

Una alternativa que se propone es llevar a cabo el estudio de los glóbulos rojos utilizando bolsas pediátricas. Esto permitiría mitigar posibles pérdidas y mejorar la precisión de los resultados, ya que las bolsas pediátricas proporcionan un entorno de almacenamiento más adecuado y controlado para este tipo de investigaciones. Este manejo también puede aplicarse a plaquetas, teniendo en cuenta que estas deben estar bajo agitación.

Otro factor que se puede incluir dentro del ensayo para hacer más confiables los datos es la centrifugación de los Microtubos, para recuperar el sobrenadante y descartar las células; dado a que el interés es recuperar los virus viables que se encuentren en la muestra, que es el que

contiene el virus infeccioso. Esto asegura que la muestra tomada que se encuentra en el sobrenadante sean partículas virales infecciosas, lo demás quedaría en el pellet, siendo los restos celulares y esto permitirá limpiar un poco más la muestra. Además, podría llegarse a implementar la prueba de plaqueo para obtener un dato confiable acerca de la capacidad infecciosa del virus Zika.

Por otro lado, de acuerdo a lo discutido de la seguridad transfusional en cuanto a los arbovirus presentes en Colombia como lo es el ZIKV, se sugiere implementar en los bancos de sangre un sistema robusto de hemovigilancia para el manejo de la transmisión de este tipo de virus, en donde se implementen métodos de detección molecular, un ejemplo de esto, es implementar la prueba de ácidos nucleicos (NAT), teniendo en cuenta que es una estrategía útil, utilizada en Estados Unidos, como nos cuentan (Giménez-Richarte, A y otros. 2022,) para abarcar la problemática de salud pública con el arbovirus del Nilo Occidental, teniendo impacto positivo en la detección de estos.

Sin embargo, incluir este tipo de métodos implica un costo elevado, lo que puede llegar a ser una limitante en países de bajos recursos como Colombia. Además, que este tipo de pruebas de ácidos nucleicos requiere recursos humanos y logísticos que no están disponibles en las diferentes regiones del país. No obstante, como alternativa, se podrían emplear las técnicas para la inactivación de patógenos como el azul de metileno y la luz UV, las cuales son técnicas efectivas y de bajo costo que podrían ser implementadas para la seguridad transfusional de los hemocomponentes (Giménez-Richarte, A. et al. 2022). Pues se ha demostrado que la tecnología de reducción de patógenos (PRT) es eficaz en la inactivación del ZIKV tanto para las plaquetas como para el plasma y los componentes de los glóbulos rojos; sin embargo, la PRT actualmente solo está aprobada por la administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) para plasma y plaquetas de aaféresis. (hagyashri D Navalkele. 2021).

Finalmente sería importante que se tenga en cuenta realizar más investigaciones en Colombia, en relación a este tipo de arbovirus como el virus Zika, el cual se encuentra presente en el país, puesto a que actualmente no hay datos, ni evidencia científica, que demuestren que el virus Zika tiende a mantener estable su carga viral y a replicarse a través del tiempo en plaquetas y que exista degradación del ZIKV en glóbulos rojos; así como existe evidencia para el virus Dengue, siendo el arbovirus más estudiado y el que mayormente se encuentra información, lo más próximo que se puede relacionar al virus Zika es la información que nos brinda (Sutherland et al., 2016); acerca del dengue, siendo el punto de comparación dentro de este ensayo, teniendo en cuenta que estos dos arbovirus son de la misma familia de mosquito, por tal motivo se considera de gran importancia realizar el estudio, siendo un precursor en la investigación del arbovirus ZIKV.

11. Referencias bibliográficas

1. Abedon, S. T., & Bartom, E. (2013). Multiplicity of Infection. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), Brenner's Encyclopedia of Genetics (pp. 509–510). Elsevier.
2. Bhagyashri D Navalkele. (2021). Zika Virus. Recuperado de: https://emedicine.medscape.com/article/2500035-overview
3. BES, (2023). Comportamiento epidemiológico de las arbovirosis en Colombia. Recuperado de: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2023_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_12.pdf
4. Cao-Lormeau, V. M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A. L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S. K., Willison, H. J., Musset, L., Manuguerra, J. C., Despres, P., Fournier, E., … Ghawché, F. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. The Lancet, 387(10027), 1531–1539. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6
5. CDC, (2019). Zika Transmission. Recuperado de: https://www.cdc.gov/zika/prevention/transmission-methods.html#:~:text=Zika%20virus%20is%20transmitted%20to,spread%20dengue%20and%20chikungunya%20viruses
6. Chan, K. R., Ismail, A. A., Thergarajan, G., Raju, C. S., Yam, H. C., Rishya, M., & Sekaran, S. D. (2022). Serological cross-reactivity among common flaviviruses. In Frontiers in Cellular and Infection Microbiology (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.975398
7. Chan, K. R., Ismail, A. A., Thergarajan, G., Raju, C. S., Yam, H. C., Rishya, M., & Sekaran, S. D. (2022). Serological cross-reactivity among common flaviviruses. In Frontiers in Cellular and Infection Microbiology (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.975398
8. DELTA DELTA CT : Método delta delta Ct - Labster Theory. (s.f). Labster.com. Retrieved September 30, 2023, from https://theory.labster.com/delta-delta-ct-es/_info/Giménez-Richarte, Á., Ortiz de Salazar, M. I., Giménez-Richarte, M. P., Collado, M., Fernández, P. L., Clavijo, C., Navarro, L., Arbona, C., Marco, P., & Ramos-Rincon, J. M. (2022). Transfusion-transmitted arboviruses: Update and systematic review. PLoS neglected tropical diseases, 16(10), e0010843.
9. Dra & Aldighieri, los & Owen, Liliana & Castellanos, Luis & Franco, Leticia & Gutiérrez, Gamaliel & Bezerra, Haroldo & Leone, Mariana & Méndez-Rico, Jairo & Mendoza, Roy & Ramon-Pardo, Pilar & Martín, José & Postigo. (2016). Instrumento para el

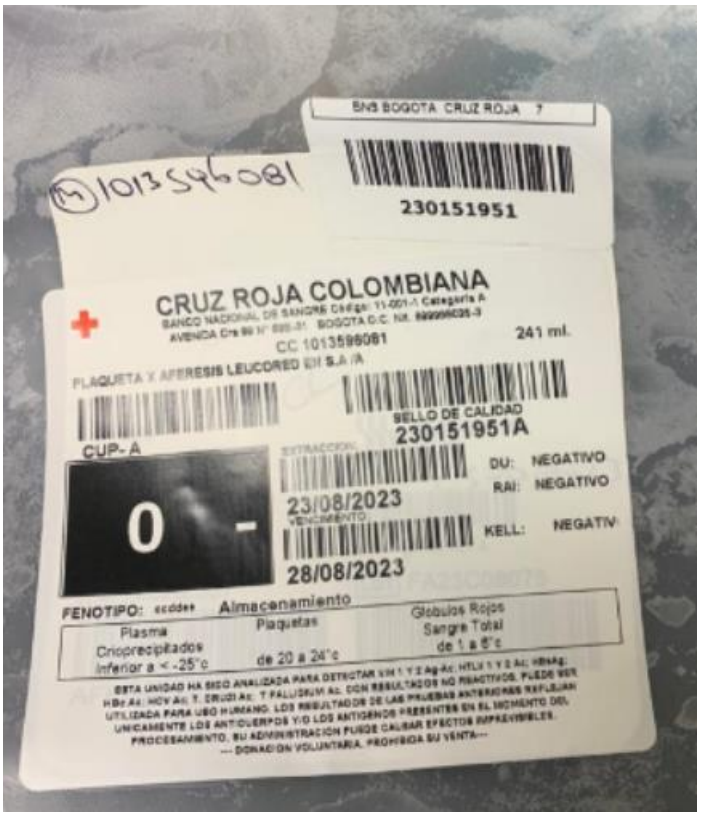
diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirosis. OPS. Gamaliel Gutiérrez, Pilar Ramón-PardoISBN: 978-92-75-31936-9. Obtenido de: https://www.researchgate.net/publication/312393208_Instrumento_para_el_diagnostico_y_la_atencion_a_pacientes_con_sospecha_de_arbovirosis

10. Gregory, C. J., Oduyebo, T., Brault, A. C., Brooks, J. T., Chung, K. W., Hills, S., Kuehnert, M. J., Mead, P., Meaney-Delman, D., Rabe, I., Staples, E., & Petersen, L. R. (2017). Modes of Transmission of Zika Virus. In Journal of Infectious Diseases (Vol. 216, pp. S875–S883). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/infdis/jix396
11. Hernández, M. (2021). Análisis de la infección por arbovirus en donantes de sangre en áreas endémicas y no endémicas de Colombia. Recuperado de: http://hdl.handle.net/20.500.12495/7377.
12. Labster Theory. (s.f). Método delta delta Ct. Labster.com. Retrieved September 30, 2023, from https://theory.labster.com/delta-delta-ct-es/
13. Luis Arredondo García, J. (2016). Arbovirus en Latinoamérica Correspondencia (Vol. 37, Issue 2). www.actapediatrica.org.mx
14. Noorbakhsh, F., Abdolmohammadi, K., Fatahi, Y., Dalili, H., Rasoolinejad, M., Rezaei, F., Salehi-Vaziri, M., Shafiei-Jandaghi, Z., Gooshki, S., Zaim, M., & Nicknam, M. H. (2019). Zika Virus Infection, Basic and Clinical Aspects: A Review Article. In Iran J Public Health (Vol. 48, Issue 1). http://ijph.tums.ac.ir
15. OMS. (2018). A report about health. Enfermedad por el virus de sika. Obtenido de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus
16. OMS. (2023). Dengue y Dengue grave. Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue
17. OMS (2020). Chikungunya. Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya
18. OMS. (2022). Virus de Zika. Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus
19. OPS. (2018). Dengue. Recuperado de. https://www.paho.org/es/temas/dengue
20. OPS, (2018). Chikungunya. Recuperado de: https://www.paho.org/es/temas/chikungunya
21. Pacheco, O., Beltrán, M., Nelson, C. A., Valencia, D., Tolosa, N., Farr, S. L., Padilla, A. V., Tong, V. T., Cuevas, E. L., Espinosa-Bode, A., Pardo, L., Rico, A., Reefhuis, J., González, M., Mercado, M., Chaparro, P., Martínez Duran, M., Rao, C. Y., Muñoz, M. M., … Ospina Martínez, M. L. (2020). Zika Virus Disease in Colombia — Preliminary Report. New England Journal of Medicine, 383(6), e44. https://doi.org/10.1056/nejmoa1604037

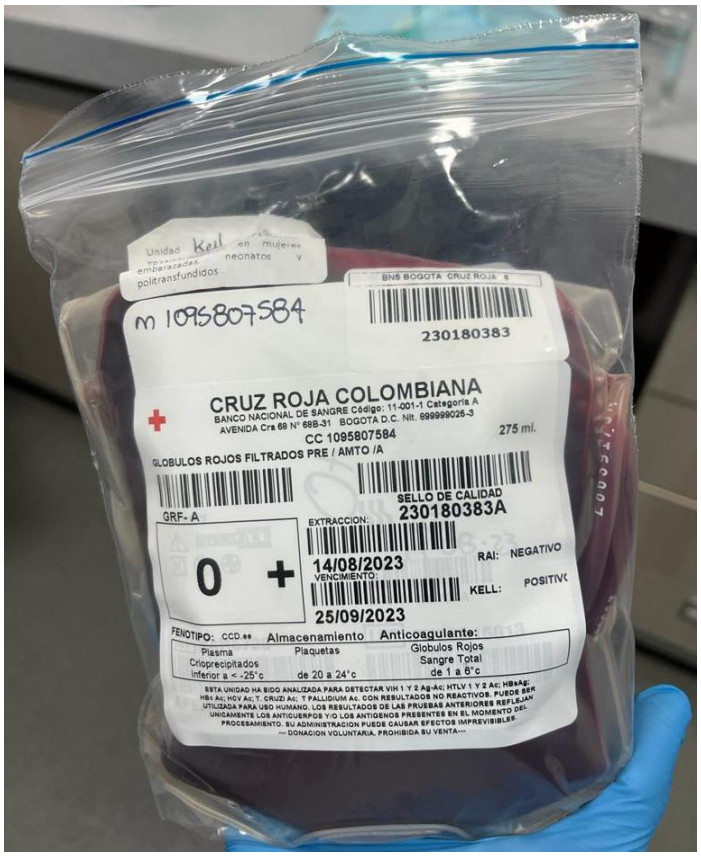
22. Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., Huang, J., & Xia, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. In Virology (Vol. 543, pp. 34–42). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015
23. Prada-Arismendy, J., & Castellanos, J. E. (2011). Real time PCR. Application in dengue studies. In Colomb Med (Vol. 42). Abril-Junio.
24. Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. In Journal of Neuroimmunology (Vol. 308, pp. 50–64). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001
25. Song, Y., Mugavero, J. A., Stauft, C. B., & Wimmer, E. (2019). Dengue and zika virus 5' untranslated regions harbor internal ribosomal entry site functions. MBio, 10(2). https://doi.org/10.1128/mBio.00459-19
26. Sutherland, M. R., Simon, A. Y., Serrano, K., Schubert, P., Acker, J. P., & Pryzdial, E. L. G. (2016). Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units. Transfusion, 56(5), 1129–1137. https://doi.org/10.1111/trf.13454

12. Anexos

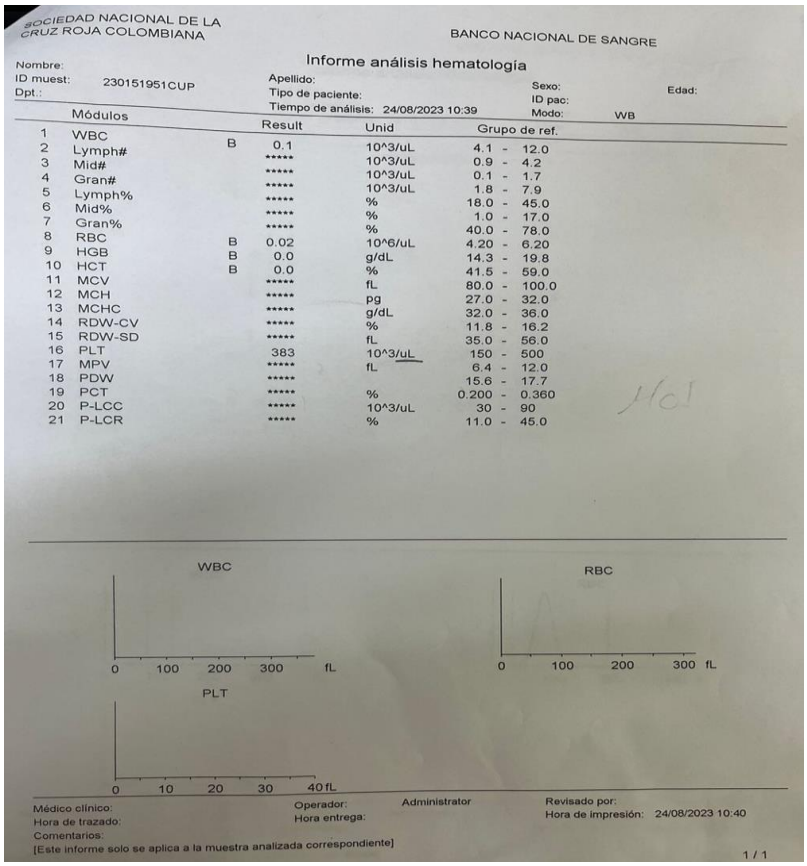
Anexo 1. Rótulo de unidad de plaquetas recibidas por la Cruz Roja Colombiana



Anexo 2. Rótulo de unidad de glóbulos rojos recibidos por la Cruz Roja Colombiana



Anexo 3. Hemograma de plaquetas recibidos por la Cruz Roja Colombiana



SOCIEDAD NACIONAL DE LA CRUZ ROJA COLOMBIANA

BANCO NACIONAL DE SANGRE

Informe análisis hematología

Nombre:
ID muest: 230151951CUP
Dpt.:
Apellido:
Tipo de paciente:
Tiempo de análisis: 24/08/2023 10:39
Sexo:
ID pac:
Modo: WB
Edad:

	Módulos		Result	Unid	Grupo de ref.
1	WBC	B	0.1	10^3/uL	4.1 - 12.0
2	Lymph#		*****	10^3/uL	0.9 - 4.2
3	Mid#		*****	10^3/uL	0.1 - 1.7
4	Gran#		*****	10^3/uL	1.8 - 7.9
5	Lymph%		*****	%	18.0 - 45.0
6	Mid%		*****	%	1.0 - 17.0
7	Gran%		*****	%	40.0 - 78.0
8	RBC	B	0.02	10^6/uL	4.20 - 6.20
9	HGB	B	0.0	g/dL	14.3 - 19.8
10	HCT	B	0.0	%	41.5 - 59.0
11	MCV		*****	fL	80.0 - 100.0
12	MCH		*****	pg	27.0 - 32.0
13	MCHC		*****	g/dL	32.0 - 36.0
14	RDW-CV		*****	%	11.8 - 16.2
15	RDW-SD		*****	fL	35.0 - 56.0
16	PLT		383	10^3/uL	150 - 500
17	MPV		*****	fL	6.4 - 12.0
18	PDW		*****		15.6 - 17.7
19	PCT		*****	%	0.200 - 0.360
20	P-LCC		*****	10^3/uL	30 - 90
21	P-LCR		*****	%	11.0 - 45.0

WBC

0 100 200 300 fL

RBC

0 100 200 300 fL

PLT

0 10 20 30 40 fL

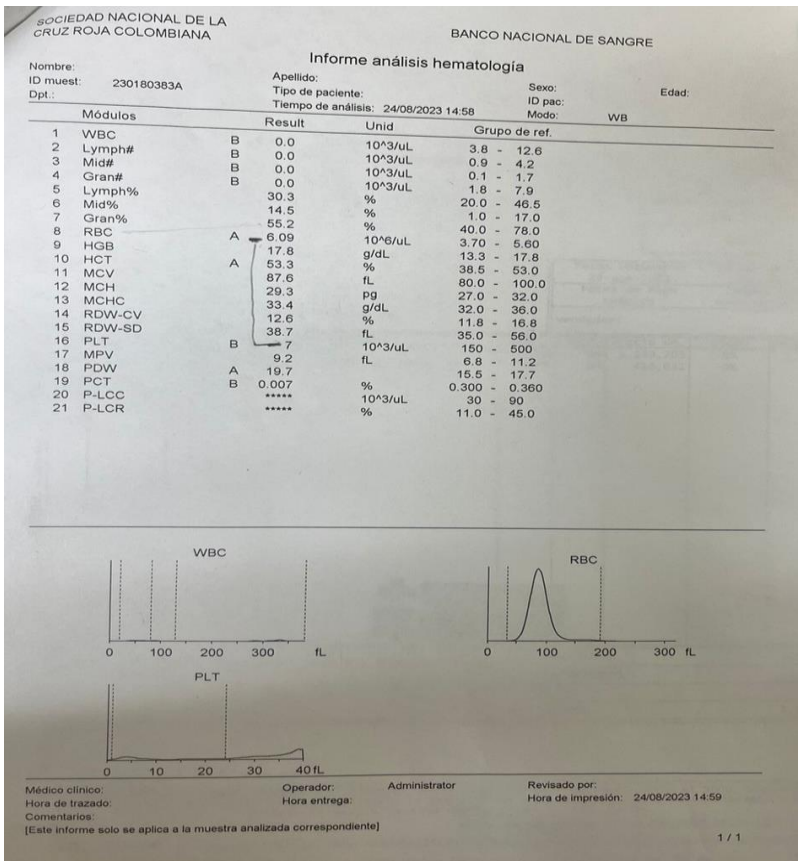
Médico clínico:
Hora de trazado:
Comentarios:
[Este informe solo se aplica a la muestra analizada correspondiente]

Operador: Administrator
Hora entrega:

Revisado por:
Hora de impresión: 24/08/2023 10:40

1 / 1

Anexo 4. Hemograma de glóbulos rojos recibidos por la Cruz Roja Colombiana



SOCIEDAD NACIONAL DE LA CRUZ ROJA COLOMBIANA

BANCO NACIONAL DE SANGRE

Informe análisis hematología

Nombre:
ID muest: 230180383A
Dpt.:
Apellido:
Tipo de paciente:
Tiempo de análisis: 24/08/2023 14:58
Sexo:
ID pac:
Modo: WB
Edad:

	Módulos		Result	Unid	Grupo de ref.
1	WBC	B	0.0	10^3/uL	3.8 - 12.6
2	Lymph#	B	0.0	10^3/uL	0.9 - 4.2
3	Mid#	B	0.0	10^3/uL	0.1 - 1.7
4	Gran#	B	0.0	10^3/uL	1.8 - 7.9
5	Lymph%		30.3	%	20.0 - 46.5
6	Mid%		14.5	%	1.0 - 17.0
7	Gran%		55.2	%	40.0 - 78.0
8	RBC	A	6.09	10^6/uL	3.70 - 5.60
9	HGB		17.8	g/dL	13.3 - 17.8
10	HCT	A	53.3	%	38.5 - 53.0
11	MCV		87.6	fL	80.0 - 100.0
12	MCH		29.3	pg	27.0 - 32.0
13	MCHC		33.4	g/dL	32.0 - 36.0
14	RDW-CV		12.6	%	11.8 - 16.8
15	RDW-SD		38.7	fL	35.0 - 56.0
16	PLT	B	7	10^3/uL	150 - 500
17	MPV		9.2	fL	6.8 - 11.2
18	PDW	A	19.7		15.5 - 17.7
19	PCT	B	0.007	%	0.300 - 0.360
20	P-LCC		*****	10^3/uL	30 - 90
21	P-LCR		*****	%	11.0 - 45.0

WBC

0 100 200 300 fL

RBC

0 100 200 300 fL

PLT

0 10 20 30 40 fL

Médico clínico:
Hora de trazado:
Comentarios:
[Este informe solo se aplica a la muestra analizada correspondiente]

Operador: Administrator
Hora entrega:

Revisado por:
Hora de impresión: 24/08/2023 14:59

1 / 1

Anexo 5. *Muestra de Datos Plaquetas obtenidos de la Técnica PCR.*

MUESTRA DE DATOS PLAQUETAS					
N°	Fluor	Dias Vs Replica	Cq	Log Copias Virales/µl	Copias virales/µl
1	HEX	DÍA 0 R1	26,88	4,82E+00	6,61E+04
2	HEX	DÍA 0 R1	26,80	4,85E+00	7,08E+04
3	HEX	DÍA 0 R2	27,91	4,45E+00	2,80E+04
4	HEX	DÍA 0 R2	27,85	4,47E+00	2,93E+04
5	HEX	DÍA 0 R3	27,83	4,48E+00	2,99E+04
6	HEX	DÍA 0 R3	27,87	4,46E+00	2,89E+04
7	HEX	DÍA 1 R1	28,14	4,36E+00	2,31E+04
8	HEX	DÍA 1 R1	28,29	4,31E+00	2,03E+04
9	HEX	DÍA 1 R2	28,58	4,20E+00	1,59E+04
10	HEX	DÍA 1 R2	28,59	4,20E+00	1,58E+04
11	HEX	DÍA 1 R3	27,87	4,46E+00	2,88E+04
12	HEX	DÍA 1 R3	27,91	4,45E+00	2,80E+04
13	HEX	DÍA 2 R1	30,84	3,38E+00	2,41E+03
14	HEX	DÍA 2 R1	30,83	3,38E+00	2,42E+03
15	HEX	DÍA 2 R2	29,68	3,80E+00	6,36E+03
16	HEX	DÍA 2 R2	29,68	3,80E+00	6,32E+03
17	HEX	DÍA 2 R3	28,68	4,17E+00	1,46E+04
18	HEX	DÍA 2 R3	28,54	4,22E+00	1,64E+04
19	HEX	DÍA 3 R1	28,33	4,29E+00	1,97E+04
20	HEX	DÍA 3 R1	28,40	4,27E+00	1,85E+04
21	HEX	DÍA 3 R2	28,70	4,16E+00	1,44E+04
22	HEX	DÍA 3 R2	28,53	4,22E+00	1,66E+04
23	HEX	DÍA 3 R3	28,15	4,36E+00	2,29E+04
24	HEX	DÍA 3 R3	28,02	4,41E+00	2,55E+04
25	HEX	DÍA 4 R1	30,40	3,54E+00	3,46E+03
26	HEX	DÍA 4 R1	30,49	3,51E+00	3,21E+03
27	HEX	DÍA 4 R2	31,52	3,13E+00	1,36E+03
28	HEX	DÍA 4 R2	31,68	3,07E+00	1,19E+03
29	HEX	DÍA 4 R3	29,98	3,69E+00	4,95E+03
30	HEX	DÍA 4 R3	29,91	3,72E+00	5,21E+03
31	HEX	DÍA 5 R1	30,65	3,45E+00	2,82E+03
32	HEX	DÍA 5 R1	30,22	3,61E+00	4,05E+03
33	HEX	DÍA 5 R2	29,17	3,99E+00	9,74E+03
34	HEX	DÍA 5 R2	29,03	4,04E+00	1,10E+04
35	HEX	DÍA 5 R3	29,32	3,93E+00	8,55E+03
36	HEX	DÍA 5 R3	29,13	4,00E+00	1,00E+04
37	HEX	DÍA 6 R1	29,15	3,99E+00	9,84E+03
38	HEX	DÍA 6 R1	29,41	3,90E+00	7,96E+03
39	HEX	DÍA 6 R2	28,06	4,39E+00	2,46E+04
40	HEX	DÍA 6 R2	27,88	4,46E+00	2,86E+04
41	HEX	DÍA 6 R3	30,64	3,45E+00	2,84E+03
42	HEX	DÍA 6 R3	30,82	3,39E+00	2,45E+03

Anexo 6. *Valores cuantificación relativa promedio por el método delta delta Ct (ΔΔCt) plaquetas.*

CUANTIFICACIÓN RELATIVA							
N°	Dias Vs Replica	Cq Virus	Cq Beta Actina	ΔCq	ΔΔCq	2^-ΔΔCq	Promedio Dia 0
1	DÍA 0 R1	26,88	21,14	5,74	0,34	0,79	5,40
2	DÍA 0 R1	26,80	21,32	5,48	0,07	0,95	
3	DÍA 0 R2	27,91	22,42	5,49	0,09	0,94	
4	DÍA 0 R2	27,85	22,46	5,40	-0,01	1,00	
5	DÍA 0 R3	27,83	22,79	5,04	-0,37	1,29	
6	DÍA 0 R3	27,87	22,60	5,27	-0,13	1,10	
7	DÍA 1 R1	28,14	22,02	6,12	0,72	0,61	
8	DÍA 1 R1	28,29	22,09	6,20	0,79	0,58	
9	DÍA 1 R2	28,58	22,46	6,13	0,73	0,60	
10	DÍA 1 R2	28,59	22,37	6,22	0,82	0,57	
11	DÍA 1 R3	27,87	21,86	6,01	0,61	0,66	
12	DÍA 1 R3	27,91	22,08	5,83	0,42	0,75	
13	DÍA 2 R1	30,84	24,28	6,56	1,15	0,45	
14	DÍA 2 R1	30,83	24,29	6,54	1,14	0,45	
15	DÍA 2 R2	29,68	23,60	6,07	0,67	0,63	
16	DÍA 2 R2	29,68	23,65	6,04	0,63	0,65	
17	DÍA 2 R3	28,68	23,04	5,64	0,24	0,85	
18	DÍA 2 R3	28,54	22,96	5,59	0,18	0,88	
19	DÍA 3 R1	28,33	22,77	5,56	0,16	0,90	
20	DÍA 3 R1	28,40	22,74	5,67	0,26	0,83	
21	DÍA 3 R2	28,70	22,83	5,87	0,47	0,72	
22	DÍA 3 R2	28,53	22,83	5,70	0,29	0,82	
23	DÍA 3 R3	28,15	22,48	5,66	0,26	0,84	
24	DÍA 3 R3	28,02	22,28	5,74	0,34	0,79	
25	DÍA 4 R1	30,40	24,96	5,44	0,04	0,98	
26	DÍA 4 R1	30,49	25,08	5,41	0,01	0,99	
27	DÍA 4 R2	31,52	26,15	5,37	-0,03	1,02	
28	DÍA 4 R2	31,68	26,17	5,51	0,11	0,93	
29	DÍA 4 R3	29,98	24,66	5,31	-0,09	1,07	
30	DÍA 4 R3	29,91	24,73	5,18	-0,22	1,16	
31	DÍA 5 R1	30,65	24,76	5,89	0,48	0,72	
32	DÍA 5 R1	30,22	24,52	5,70	0,30	0,81	
33	DÍA 5 R2	29,17	24,22	4,95	-0,45	1,37	
34	DÍA 5 R2	29,03	23,78	5,25	-0,15	1,11	
35	DÍA 5 R3	29,32	24,39	4,94	-0,47	1,38	
36	DÍA 5 R3	29,13	23,94	5,20	-0,21	1,15	
37	DÍA 6 R1	29,15	23,39	5,77	0,36	0,78	
38	DÍA 6 R1	29,41	23,76	5,65	0,25	0,84	
39	DÍA 6 R2	28,06	22,85	5,21	-0,19	1,14	
40	DÍA 6 R2	27,88	22,97	4,91	-0,49	1,40	
41	DÍA 6 R3	30,64	24,91	5,73	0,33	0,80	
42	DÍA 6 R3	30,82	24,56	6,26	0,86	0,55	

Anexo 7. *Muestra de Datos glóbulos rojos obtenidos de la Técnica PCR.*

MUESTRA DE DATOS GLOBULOS ROJOS					
N°	Fluor	Dias Vs Replica	Cq	Log Copias Virales/µl	Copias virales/µl
1	HEX	DÍA 0 R1	24,383	4,75E+00	5,65E+04
2	HEX	DÍA 0 R1	24,57	4,69E+00	4,92E+04
3	HEX	DÍA 0 R2	24,08	4,85E+00	7,08E+04
4	HEX	DÍA 0 R2	24,65	4,67E+00	4,63E+04
5	HEX	DÍA 7 R1	24,87	4,59E+00	3,93E+04
6	HEX	DÍA 7 R1	25,04	4,54E+00	3,44E+04
7	HEX	DÍA 7 R2	24,56	4,70E+00	4,96E+04
8	HEX	DÍA 7 R2	25,03	4,54E+00	3,46E+04
9	HEX	DÍA 14 R1	26,39	4,10E+00	1,25E+04
10	HEX	DÍA 14 R1	26,873	3,94E+00	8,70E+03
11	HEX	DÍA 14 R2	25,00	4,55E+00	3,55E+04
12	HEX	DÍA 14 R2	25,06	4,53E+00	3,38E+04
13	HEX	DÍA 21 R1	26,93	3,92E+00	8,35E+03
14	HEX	DÍA 21 R1	27,10	3,86E+00	7,31E+03
15	HEX	DÍA 21 R2	25,78	4,30E+00	1,98E+04
16	HEX	DÍA 21 R2	26,23	4,15E+00	1,41E+04

Anexo 8. *Valores cuantificación relativa promedio por el método delta delta Ct (ΔΔCt) glóbulos rojos.*

CUANTIFICACIÓN RELATIVA							
N°	Dias Vs Replica	Cq Virus	Cq Beta Actina	ΔCq	ΔΔCq	2^-ΔΔCq	Promedio Dia 0
1	DÍA 0 R1	26,88	21,14	5,74	0,34	0,79	5,40
2	DÍA 0 R1	26,80	21,32	5,48	0,07	0,95	
3	DÍA 0 R2	27,91	22,42	5,49	0,09	0,94	
4	DÍA 0 R2	27,85	22,46	5,40	-0,01	1,00	
5	DÍA 0 R3	27,83	22,79	5,04	-0,37	1,29	
6	DÍA 0 R3	27,87	22,60	5,27	-0,13	1,10	
7	DÍA 1 R1	28,14	22,02	6,12	0,72	0,61	
8	DÍA 1 R1	28,29	22,09	6,20	0,79	0,58	
9	DÍA 1 R2	28,58	22,46	6,13	0,73	0,60	
10	DÍA 1 R2	28,59	22,37	6,22	0,82	0,57	
11	DÍA 1 R3	27,87	21,86	6,01	0,61	0,66	
12	DÍA 1 R3	27,91	22,08	5,83	0,42	0,75	
13	DÍA 2 R1	30,84	24,28	6,56	1,15	0,45	
14	DÍA 2 R1	30,83	24,29	6,54	1,14	0,45	
15	DÍA 2 R2	29,68	23,60	6,07	0,67	0,63	
16	DÍA 2 R2	29,68	23,65	6,04	0,63	0,65	
17	DÍA 2 R3	28,68	23,04	5,64	0,24	0,85	
18	DÍA 2 R3	28,54	22,96	5,59	0,18	0,88	
19	DÍA 3 R1	28,33	22,77	5,56	0,16	0,90	
20	DÍA 3 R1	28,40	22,74	5,67	0,26	0,83	
21	DÍA 3 R2	28,70	22,83	5,87	0,47	0,72	
22	DÍA 3 R2	28,53	22,83	5,70	0,29	0,82	
23	DÍA 3 R3	28,15	22,48	5,66	0,26	0,84	
24	DÍA 3 R3	28,02	22,28	5,74	0,34	0,79	
25	DÍA 4 R1	30,40	24,96	5,44	0,04	0,98	
26	DÍA 4 R1	30,49	25,08	5,41	0,01	0,99	
27	DÍA 4 R2	31,52	26,15	5,37	-0,03	1,02	
28	DÍA 4 R2	31,68	26,17	5,51	0,11	0,93	
29	DÍA 4 R3	29,98	24,66	5,31	-0,09	1,07	
30	DÍA 4 R3	29,91	24,73	5,18	-0,22	1,16	
31	DÍA 5 R1	30,65	24,76	5,89	0,48	0,72	
32	DÍA 5 R1	30,22	24,52	5,70	0,30	0,81	
33	DÍA 5 R2	29,17	24,22	4,95	-0,45	1,37	
34	DÍA 5 R2	29,03	23,78	5,25	-0,15	1,11	
35	DÍA 5 R3	29,32	24,39	4,94	-0,47	1,38	
36	DÍA 5 R3	29,13	23,94	5,20	-0,21	1,15	
37	DÍA 6 R1	29,15	23,39	5,77	0,36	0,78	
38	DÍA 6 R1	29,41	23,76	5,65	0,25	0,84	
39	DÍA 6 R2	28,06	22,85	5,21	-0,19	1,14	
40	DÍA 6 R2	27,88	22,97	4,91	-0,49	1,40	
41	DÍA 6 R3	30,64	24,91	5,73	0,33	0,80	
42	DÍA 6 R3	30,82	24,56	6,26	0,86	0,55	

Anexo 9. *Consentimiento informado especifico*

Adjunto en pdf al final del documento, el cual consiste en el consentimiento informado específico para llevar a cabo investigaciones con el virus Dengue y otros arbovirus en donantes de sangre con código 130884467713, contrato 898-2019.

Anexo 10. *Aval comité de ética*

Adjunto en pdf al final del documento, el cual consiste en el comité de ética que avala este proyecto de investigación con un numero de acta 011-2019

Anexo 11. *Consentimiento Banco de Sangre Cruz Roja Colombiana*

Adjunto en pdf al final del documento, el cual consiste en el consentimiento informado que les da el Banco de sangre de la Cruz Roja Colombiana a las personas que van a donar sangre.

CONSENTIMIENTO INFORMADO ESPECÍFICO

ESTUDIO

"DETECCIÓN DE VIRUS DENGUE Y OTROS ARBOVIRUS EN DONANTES DE SANGRE EN COLOMBIA: PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS VIRALES AISLADAS" (Código 130884467713, contrato 898-2019)

Investigador Principal
Félix Giovanni Delgado Tiria, Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá D.C.

Apreciado (a) donante:

Usted está invitado(a) a participar en un estudio de investigación, debe decidir si quiere participar o no. Tome su tiempo para decidirlo. Lea cuidadosamente este documento y pregúntele al responsable del estudio cualquier inquietud que tenga. El estudio es realizado por el Grupo de Virología de la Universidad El Bosque y el Banco Nacional de Sangre de la Cruz Roja Colombiana.

¿Por qué se está haciendo este estudio?
Los virus dengue, Zika y Chikungunya son transmitidos a través de la picadura de mosquitos infectados. En Colombia, se presenta una elevada transmisión de estos virus en varias zonas del país. Algunas personas pueden tener algunos de estos virus en su sangre y no tener ningún síntoma o manifestación, pudiendo incluso donar sangre y transmitirlos al receptor de la transfusión, sin saberlo. En la actualidad, en Colombia no se realizan pruebas de laboratorio para la detección de estos virus en la sangre donada. El objetivo de este estudio es determinar la frecuencia con la cual estos virus se encuentran en la sangre de donantes voluntarios de sangre en Colombia.

¿Que tendré que hacer? ¿Cuáles son mis requerimientos?
Si usted acepta participar en este estudio, se le tomará una muestra adicional de sangre venosa del brazo en un tubo de 7 ml, la cual servirá para realizar las pruebas de detección de los virus dengue, Zika y Chikungunya. En caso de que usted resulte positivo para alguno de estos tres virus, será contactado telefónicamente por el banco de sangre, dos semanas después de la donación de sangre, para informarlo al respecto y para realizarle una encuesta relacionada con la posible exposición al (los) virus.

Acta 003-2021 del 23 de Febrero de 2021

Nadia Yadira Castaneda G.

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Comité Institucional de Ética en Investigación

En el caso específico de resultar positiva la prueba de detección de virus Zika, debido a que este virus también puede transmitirse por contacto sexual y cuando se produce infección en mujeres embarazadas existe el riesgo de malformaciones al feto, se tomarán las siguientes medidas adicionales:

1. Usted no podrá donar sangre dentro de los 120 días después de hallado el virus.
2. La sangre que usted donó será descartada.
3. Si alguno de los componentes de la sangre que usted donó fue transfundido, el servicio transfusional y el médico tratante que ordenó la transfusión serán contactados por parte del banco de sangre para informar del resultado positivo para virus Zika, para que se realice la respectiva investigación en el receptor de la transfusión, con especial énfasis en mujeres gestantes dado el riesgo de malformaciones graves en el feto.

¿Cuántas personas participarán en esta investigación?
Se escogerán aleatoriamente un total de 1200 donantes que asisten a los 6 bancos de sangre de la red de la Cruz Roja Colombiana.

¿Puedo retirarme de la investigación, de forma voluntaria, en cualquier momento?
Si, usted tiene el derecho de revocar este consentimiento informado en cualquier momento y de forma voluntaria, sin la necesidad de dar una razón especial. El retiro de esta investigación antes del tiempo programado, no le generará ninguna consecuencia negativa sobre su salud.

¿Cuáles son los riesgos o incomodidades asociados a esta investigación?
La toma de la muestra de sangre se realizará por parte de un(a) enfermero(a) con experiencia en el procedimiento y siguiendo todas las precauciones para conservar su integridad. Los riesgos más frecuentes de este procedimiento son dolor, inflamación y hematomas en la zona de la punción. Estos son los mismos riesgos que se tienen con el procedimiento de la donación de sangre y para este estudio sólo se necesitará un tubo de sangre adicional.

¿Obtendré algún beneficio al participar en esta investigación?
No habrá ningún beneficio económico directo para usted, pero en caso de que resulten positivas las pruebas de detección de los virus dengue, Zika o Chikungunya en su muestra, le será informada esta situación y no tendrá ningún costo para usted.

¿Cómo se va a garantizar la privacidad y confidencialidad de mis datos personales?
Toda su información personal y clínica será tratada bajo estricta confidencialidad. Sólo personal autorizado por el investigador principal del estudio podrá tener acceso a sus datos personales. En caso de resultar positivo para alguno de los virus estudiados, este resultado será notificado al Sistema Nacional de Hemovigilancia SIHEVI, como parte de los procedimientos estándares para bancos de sangre vigentes en Colombia.

¿Qué hago si tengo alguna pregunta o problema?
Si tiene alguna inquietud sobre el estudio o si previa aceptación de ingreso al estudio decide retirarse, puede contactarse con los investigadores del estudio:

1. Felix Giovanni Delgado Tiria.
   Investigador principal. Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá D.C.
   Teléfono: 6489000 extensión 1209. Correo: fdelgadot@unbosque.edu.co
2. Adriana del Pilar Urbina B.
   Coinvestigadora. Banco Nacional de Sangre, Cruz Roja Colombiana, Bogotá D.C.
   Teléfono: 6607913. Correo: adriana.urbina@cruzrojacolombiana.org

INFORMACIÓN DE CONTACTO DEL COMITÉ DE ÉTICA

Comité Institucional de Ética en Investigación, Universidad El Bosque, Bogotá D.C.
Teléfono: 6489000 extensión 1520. Correo: comiteetica@unbosque.edu.co

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio "**DETECCIÓN DE VIRUS DENGUE Y OTROS ARBOVIRUS EN DONANTES DE SANGRE EN COLOMBIA: PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS VIRALES AISLADAS" (Código 130884467713, contrato 898-2019).**

Si usted autoriza su participación, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.

Yo**, _____,** mayor de edad, residente en _____. Identificado (a) con CC No. _____, declaro que me han informado detalladamente y he comprendido los propósitos, procedimientos, riesgos y beneficios relacionados con el estudio, y que tuve la oportunidad de que mis dudas fueran aclaradas.

_____ Acepto voluntariamente mi participación en este estudio.

_____ Acepto que mi información personal, clínica y socio-demográfica, los resultados de las pruebas realizadas y mi muestra de sangre, sean almacenadas y utilizadas en un futuro para la realización de pruebas adicionales en investigaciones relacionadas con virus dengue, Zika, Chikungunya u otros arbovirus.

Firma de la persona que otorga el consentimiento.

Cédula de ciudadanía. No. _____

Fecha: Día (_____) Mes (_____) Año: (_____)

Nombre completo del profesional que obtuvo el consentimiento:

_____

Firma del profesional que obtuvo el consentimiento:

_____

C.C. No. _____

Testigo 1 (puede ser otro donante de sangre presentes en la jornada de donación):

Nombre: _____

C.C. No. _____

Firma: _____

Testigo 2 (puede ser otro donante de sangre presentes en la jornada de donación):

Nombre: _____

C.C. No. _____

Firma: _____

Vigilada Mineducación

MIEMBROS

NADIA YADIRA CASTAÑEDA G.
Lic. Biología y Química
MSc. en Bioquímica
cPhD. Biotecnología
Experto en Metodología de la Investigación
Presidente

EDGAR ORLANDO BELTRAN Z.
Odontólogo
MSc en Ciencias Básicas Biomédicas
Experto en Metodología de la Investigación
Secretario Ejecutivo

DIANA MARCELA BUITRAGO R.
Bacterióloga
PhD Ciencias Farmacéuticas
Investigador

FELIPE RAMÍREZ GIL.
Diseñador Industrial
Especialista en docencia Universitaria
cPhD Bioética
Experto en Bioética - Suplente

OSCAR LEONARDO CORREA J.
Médico Pediatra
MSc en Inmunología

MARIA DEL PILAR OLAYA O.
Química Farmacéutica.
MSc en Toxicología
cPhD Ciencias Farmacéuticas
Farmacóloga

LINA ROCIO GUTIERREZ T.
Abogada
Especialista en Derecho Administrativo, Derecho Procesal y Derecho Probatorio
Abogada

MARIA CRISTINA MEJÍA G.
Psicóloga
Representante de la Comunidad.

HERNÁN CAMILO MEDINA B.
Filósofo
MSc en Filosofía
Experto en Investigación en Ciencias Sociales

Bogotá, D.C., 17 de mayo de 2019

Doctor
MIGUEL OTERO CADENA
Vicerrector de Investigaciones
UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Bogotá

Proyecto: "Detección de virus dengue y otros arbovirus en donantes de sangre en Colombia: prevalencia de la infección y caracterización genómica de cepas virales aisladas"

Cód.: UEB 2019-523

Investigador Principal: Felix Giovanni Delgado

Co-investigadores: Jaime Eduardo Castellanos
Alexandra Porras
Eliana Calvo

Respetado Doctor Otero:

Estamos informando que el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad El Bosque, en evaluación expedita del 16 de mayo de 2019, Acta No. 011-2019, aprobó el proyecto en referencia.

Investigación sin riesgo

El Investigador Principal deberá entregar el informe de seguimiento en noviembre de 2019 e informe final en

Vigilada Mineducación

Número de Miembros Total: 9

Número de Miembros que participaron en la evaluación y aprobación de documentos: 9

Número de miembros que se requiere para que haya quórum: 5

mayo de 2020. El informe deberá presentarse en el formato autorizado por el comité.

Atentamente,

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
COMITÉ INSTITUCIONAL de Ética en Investigación

Nadia Yadira Castañeda G.

NADIA YADIRA CASTAÑEDA GARCIA
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigación

Anexos: Uno (01 Folios, Encuesta)
Dos (01 Folios, Formato de seguimiento)
Tres (02 Folios, Formato de Informe Final)

Diana M
103-2019-I

Cruz Roja Colombiana
Banco Nacional de Sangre

Codigo del donante

ENCUESTA PARA SELECCIÓN DE DONANTE DE SANGRE
POR FAVOR DILIGENCIE ESTE FORMATO CON LETRA CLARA Y LEGIBLE. UTILICE ESFERO DE TINTA NEGRA.

Fecha de diligenciamiento de la encuesta: Dia | Mes | Año

ESTIMADO DONANTE DE SANGRE

Gracias por su colaboración. Nuestro objetivo es proteger la salud de quien recibe su sangre así como también proteger su salud, por tal razón en algunas ocasiones nos vemos en la obligación de no aceptar una donación. Le pedimos el favor de contestar de manera **INDIVIDUAL** y **SINCERA** el siguiente cuestionario y recuerde que esta información es totalmente **CONFIDENCIAL**. Tenga en cuenta que los **análisis de laboratorio** que se le realizan a la sangre **no son suficientes** para determinar que ésta es segura. Si usted está o estuvo expuesto a situaciones de riesgo, absténgase de donar. Si mientras dona decide que su sangre no debe ser utilizada, por favor avísenos o diligencie el formato de **autoexclusión confidencial**. Usted puede retirarse y entregar esta encuesta si no está de acuerdo con alguna de las preguntas o diríjase al entrevistador quien lo orientará si no sabe o no entiende.

¿Leyó detenidamente la información anterior y la suministrada por los pendones informativos?

SI Por favor, continúe con la encuesta
NO Antes de continuar con el diligenciamiento de la encuesta, lea la información y cualquier inquietud pregúntela al personal del banco.

DATOS PERSONALES

1.APELLIDOS:				**NOMBRES:**				
2. LUGAR DE NACIMIENTO:				**3. FECHA DE NACIMIENTO:** Día	Mes	Año	**4. EDAD:**	años
5. GÉNERO:	F	M	**6. DOCUMENTO DE IDENTIDAD:**	C.C.	T.I	Otro	Número:	
7. GRUPO SANGUÍNEO Y FACTOR RH:			**8. NOMBRE ENTIDAD ASEGURADORA EN SALUD:**					
9. DIRECCIÓN DE RESIDENCIA:				**10. BARRIO:**				
11. CIUDAD/MUNICIPIO Y DEPARTAMENTO:				**12. TELÉFONO FIJO:**				
13. OCUPACIÓN O EMPLEO:				**14. TELÉFONO DEL TRABAJO:**				
15. CORREO ELECTRÓNICO PERSONAL:				**16. TELÉFONO CELULAR:**				

A continuación marque con una X su respuesta o diligencie en el espacio indicado

ALGUNA VEZ USTED:

1. ¿Ha donado sangre? SI NO
   ¿Cuándo fue su última donación? _____
   a. ¿Ha tenido alguna reacción adversa a la donación? SI NO
   ¿Que presentó? _____
2. ¿Le han impedido donar sangre? SI NO
   Si le sucedió ¿Por qué? _____
3. ¿Ha presentado alguno de los siguientes problemas de salud?:
   a. Enfermedades de la sangre. SI NO
   b. Enfermedades del corazón. SI NO
   c. Cáncer. SI NO
   d. Trastornos mentales. SI NO
   e. ¿Mareos, desmayos o convulsiones? SI NO
   f. Ha padecido o padece alguna enfermedad seria no mencionada anteriormente. ¿Cuál? _____ SI NO
4. ¿Padeció o ha recibido tratamiento para paludismo, leishmaniasis, fiebre amarilla, dengue, chikungunya o zika? SI NO
   ¿Cuál? _____
5. ¿Ha sido picado por el insecto **PITO**, chinche picudo, besador, rondador o chupa sangre, o ha tenido enfermedad de chagas? SI NO
6. ¿Ha recibido transfusión sanguínea, trasplante de órganos, tejidos u hormona humana del crecimiento? SI NO
7. ¿Padeció o ha recibido tratamiento para sífilis, gonorrea, herpes genital, condiloma, papiloma virus, hepatitis, VIH-SIDA u otra enfermedad de transmisión sexual? SI NO
8. ¿Ha recibido dinero, sustancias psicoactivas u otra forma de pago a cambio de relaciones sexuales? SI NO
9. ¿Ha tenido relaciones sexuales con trabajadores sexuales? SI NO
10. ¿Ha tenido relaciones sexuales con personas de su mismo sexo? SI NO
11. ¿Usó o usa marihuana, cocaína, heroína, bazuco o algún otro estimulante o alucinógeno? SI NO
12. ¿Ha vivido fuera del país o de la ciudad en que reside actualmente? SI NO
    ¿En dónde? _____
    ¿Hace cuánto? _____
    ¿Por cuánto tiempo? _____

EN LOS ÚLTIMOS 12 MESES USTED:

13. ¿Cuántas parejas sexuales ha tenido en el último año? ☐
14. ¿Estuvo bajo tratamiento médico o le han realizado alguna cirugía? SI NO
15. ¿Ha sido vacunado? SI NO
    ¿Qué vacuna recibió? _____
16. ¿Ha tenido accidentes de riesgo biológico (contacto con sangre, pinchazos con agujas contaminadas? SI NO
17. ¿Se ha realizado acupuntura, tatuajes, piercing, maquillaje permanente u otros procedimientos similares? SI NO
18. ¿Usted o su pareja sexual han estado privados de la libertad (cárcel) por más de 72 horas? SI NO

EN LOS ÚLTIMOS 6 MESES USTED:

19. ¿Ha visitado zonas donde hay paludismo, leishmaniasis, fiebre amarilla, dengue, chikungunya o zika? SI NO
20. ¿Ha tenido nueva pareja sexual en este periodo? SI NO
21. ¿Ha presentado alguno de los siguientes síntomas?
    a. Perdida inexplicable de peso SI NO
    b. Diarrea frecuente no controlable SI NO
    c. Sudoración nocturna SI NO
    d. Tos persistente (por más de dos semanas) SI NO
    e. Inflamación permanente de los ganglios SI NO
    f. Manchas o lesiones en la piel o mucosas SI NO
    g. Fiebre a repetición SI NO

EN LOS ÚLTIMOS 30 DÍAS USTED:

22. ¿Ha tomado algún medicamento? SI NO
¿Cuál?_____

23. ¿Ha padecido alguna enfermedad contagiosa o ha estado en contacto con personas que padezcan sarampión, rubéola, paperas o varicela? SI NO

EN LOS ÚLTIMOS 15 DÍAS USTED:

24. ¿Se ha sentido bien de salud? SI NO

EN LOS ÚLTIMOS 7 DÍAS A USTED:

25. ¿Le han realizado tratamientos dentales? SI NO
¿Cuál?_____

26. ¿Leyó y comprendió el cuestionario y fueron contestadas todas sus dudas al respecto? SI NO

27. ¿Qué actividad realizará después de la donación?

SOLO SI USTED ES MUJER, POR FAVOR DILIGENCIE:

28. Fecha de su última menstruación
Día _ _ Mes _ _ Año _ _

29. ¿Ha tenido cuántos...?
Embarazos _ _ Partos _ _ Abortos _ _

30. ¿En el último año ha estado embarazada, lactando o ha tenido abortos, legrados, partos o cesáreas? SI NO

¿Cuál?_____

PARA USO EXCLUSIVO DEL BANCO DE SANGRE:

OBSERVACIONES: _____

FIRMA DE QUIEN REALIZA LA OBSERVACIÓN

FIRMA DE DONANTE

DECLARACIÓN Y CONSENTIMIENTO DEL DONANTE

Apreciado donante: antes de firmar la encuesta, por favor lea con detenimiento las siguientes declaraciones:

Para todos los efectos legales a que haya lugar:

1.- Certifico que todas las respuestas e informes anotados en el presente cuestionario son **veraces** para evitar que esta sangre pueda ocasionar un daño al paciente receptor. Soy consciente de las **implicaciones legales** de donar sangre con conocimiento previo de estar infectado por algún microorganismo trasmisible a través de la sangre, lo cual se constituye en delito de **"propagación de epidemia"** (Decreto 1543 de 1997).
2.- Dono mi sangre de manera **responsable y voluntaria** al Banco Nacional de Sangre de la Cruz Roja Colombiana, para que la utilice con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación.
3.- Autorizo se realice a mi sangre donada las pruebas obligatorias establecidas por la ley para la detección de **VIH, Hepatitis B, Hepatitis C, Sífilis, Enfermedad de Chagas, HTLV** y otras que fueren exigidas con el tiempo para evitar que esta sangre pueda ocasionar un daño al paciente receptor.
4.- Autorizo se efectúen las respectivas **pruebas confirmatorias o complementarias**, según la normatividad vigente, en caso que uno o más resultados de las pruebas realizadas en el Banco de Sangre sean positivas.
5.- Autorizo, en caso de ser necesario y de acuerdo a la normatividad vigente, **se me ubique, contacte e informe** sobre los hallazgos obtenidos en las pruebas confirmatorias mediante asesoría personalizada.
6.- Autorizo, en caso de ser necesario y de acuerdo a la normatividad vigente, **se informe al servicio de epidemiología correspondiente y a mi aseguradora en salud** sobre los resultados de las pruebas confirmatorias.
7.- Dejo constancia expresa de estar informado(a) sobre el proceso de donación y de las posibles reacciones adversas que podrían presentarse durante o después del proceso de la donación.

Aviso de privacidad - Autorización de tratamiento de datos personales: Por medio de la presente autorizo de manera voluntaria, previa, explícita, informada e inequívoca al Banco Nacional de Sangre de la Cruz Roja Colombiana para tratar mis datos personales con fines publicitarios, estadísticos o estratégicos, así como para que me contacte a través de medios telefónicos, electrónicos, físicos y/o personales, de acuerdo a la Política de Protección de Datos Personales y para las finalidades legales, aquí contempladas.

Declaro como titular, que la información aquí consignada es completa, veraz, confiable, exacta y que he sido informado que el Banco Nacional de Sangre de la Cruz Roja Colombiana, actuará como responsable del tratamiento de mis datos personales y que ha colocado a mi disposición el correo electrónico calidadbns@cruzrojacolombiana.org y el teléfono 4376300 ext. 6730 para efectuar cualquier consulta y/o reclamo referente al tratamiento de datos personales, ejerciendo la Ley 1581 de 2012, Decreto Reglamentario 1377 de 2013, la Ley 1266 de 2008, el Decreto 1571 de 1993, la Resolución 1995 y el Decreto 2759 de 1991.

FIRMA DEL DONANTE:_____

DOCUMENTO IDENTIDAD:_____

ANÁLISIS DEL RIESGO EN LA SEGURIDAD TRANSFUSIONAL DEBIDO A LA CIRCULACIÓN DE ARBOVIRUS EN COLOMBIA

BRIAN ALEJANDRO CÁCERES MUNAR

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ D.C, COLOMBIA
2023

ANÁLISIS DEL RIESGO EN LA SEGURIDAD TRANSFUSIONAL DEBIDO A LA CIRCULACIÓN DE ARBOVIRUS EN COLOMBIA

BRIAN ALEJANDRO CÁCERES MUNAR

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE: MAGISTER EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS

DIRECTOR (A):
Félix Giovanni Delgado Tiria PhD.

CODIRECTOR (A):

Jaime Eduardo Castellanos Parra PhD.
Adriana del Pilar Urbina PhD.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:
Grupo de Virología

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ D.C, COLOMBIA
2023

RESUMEN

En la actualidad, es claro que el principal mecanismo de transmisión de estos virus es mediante la picadura de mosquitos hematófagos del género *Aedes* infectados, sin embargo, los altos porcentajes de infecciones asintomáticas y las elevadas viremias que éstas pueden desarrollar son factores que pueden contribuir a que estos virus se transmitan a través de otras vías alternativas, entre estas, las infecciones transmitidas por transfusión sanguínea.

En este sentido, el presente estudio tuvo por objetivo evaluar el riesgo en la seguridad transfusional por arbovirus en donantes de sangre en Colombia, para esto, en el marco de un estudio analítico transversal se compararon las prevalencias, tasas de incidencia y riesgos residuales de infecciones por DENV ZIKV, CHIKV y coinfecciones en donantes de sangre, obtenidas durante un periodo endémico (2021-2022, n=1.119) y un brote de dengue (2018-2019, n=462), adicionalmente, se evaluó la estabilidad de DENV,ZIKV y CHIKV en plaquetas y glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre.

Las prevalencias de arbovirus (DS positivos para el menos un virus del estudio) representaron el 25,1% y el 5,3% en el brote y el periodo endémico de dengue respectivamente ($p < 0,05$), en el brote la prevalencia más alta se observó en DENV (14,5%) mientras que el periodo endémico, la prevalencia más alta se observó en CHIKV (3,3%), las tasas de incidencia de arbovirus representaron hasta 104,4 y 6,4 donantes positivos por cada mil donantes-mes en brotes y periodos endémicos de dengue respectivamente, mientras que el riesgo residual de arbovirus representó hasta 24,3 y 1,5 donaciones positivas por cada mil donaciones en brotes y periodos endémicos de dengue respectivamente. Por otro lado, se confirmó la estabilidad del genoma viral de DENV y ZIKV, además de la capacidad infecciosa de CHIKV en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre durante 6 días. En conclusión, estos resultados sugieren que los arbovirus pueden respetar un riesgo para la seguridad transfusional en el país, especialmente en periodos de brote de estos virus, sin embargo, se necesitan más estudios dirigidos no solo al estudio de los DS, también al estudio de los receptores de estas transfusiones potencialmente infecciosas para comprender con más detalle el impacto que pueden generar las infecciones arbovirales en la seguridad transfusional del país.

Palabras clave: arbovirus, donantes de sangre, seguridad transfusional, riesgo residual

ABSTRACT

Currently, it is well-established that the primary mode of transmission for these viruses is through the bite of infected hematophagous mosquitoes of the genus Aedes. However, the high rates of asymptomatic infections and the substantial viremias that they can develop are factors that may contribute to the transmission of these viruses through other alternative routes, including blood transfusions. The Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes are the main vectors for these viruses, and they are known to be highly effective at transmitting them. After feeding on a person infected with the virus, the mosquito can transmit the virus for the rest of its life. Therefore, it is important to consider the potential for virus transmission through blood transfusions, especially in areas where these viruses are endemic.

The present study aimed to evaluate the risk of arbovirus transmission through blood transfusions in Colombia. A cross-sectional analytical study was conducted to compare the prevalences, incidence rates, and residual risks of infections by DENV, ZIKV, CHIKV, and co-infections in blood donors obtained during an endemic period (2021-2022, n=1,119) and a dengue outbreak (2018-2019, n=462). Additionally, the stability of DENV, ZIKV, and CHIKV in platelets and red blood cells stored under standard blood bank conditions was evaluated.

The prevalences of arboviruses in blood donors were compared between an endemic period (2021-2022, n=1,119) and a dengue outbreak (2018-2019, n=462) in Colombia. The prevalences of arboviruses (DS positive for at least one study virus) were 25.1% and 5.3% in the outbreak and endemic period of dengue, respectively ($p < 0.05$). In the outbreak, the highest prevalence was observed in DENV (14.5%), while in the endemic period, the highest prevalence was observed in CHIKV (3.3%). The incidence rates of arboviruses represented up to 104.4 and 6.4 positive donors per thousand donor-months in outbreaks and endemic periods of dengue, respectively, while the residual risk of arboviruses represented up to 24.3 and 1.5 positive donations per thousand donations in outbreaks and endemic periods of dengue, respectively. The stability of the viral genome of DENV and ZIKV was confirmed, as well as the infectious capacity of CHIKV in platelets stored under standard blood bank conditions for 6 days. These results suggest that arboviruses may pose a risk to transfusion safety in the country, especially during outbreaks of these viruses. However, further studies are needed not only to study the DS but also to study the recipients of these potentially infectious transfusions to understand in more detail the impact that arboviral infections can have on transfusion safety in the country.

Key words: arbovirus, blood donors, transfusion safety, residual risk.

INTRODUCCIÓN

Los virus dengue (DENV), Zika (ZIKV) y chikungunya (CHIKV) son virus de ARN monocatenario de sentido positivo, (1–3), que pueden causar un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el hospedero (4–6). Estos virus comúnmente se incluyen dentro del grupo de los arbovirus (un término que se refiere a aquellos virus que son transmitidos por artrópodos), ya que generalmente se transmiten a través de la picadura de mosquitos hembra hematófagos del género *Aedes*. A pesar de esto, las infecciones transmitidas por transfusión sanguínea (ITT) recientemente se han establecido como una ruta alterna de transmisión de estos arbovirus, representando un problema en salud pública (7–9). El alto porcentaje de infecciones asintomáticas o subclínicas (10–12) y los altos títulos virémicos que puede presentar un individuo infectado, son factores clave para considerar a estos virus como virus que pueden ser transmitidos por transfusión sanguínea (13–19).

Desde el 2009, la AABB (Asociación para el Avance de las Bioterapias y la Sangre, anteriormente llamada Asociación Americana de Banco de Sangre) listó una serie de agentes emergentes infecciosos y los clasificó según el riesgo potencial que representan durante una transfusión sanguínea (9). De acuerdo con la AABB, DENV fue clasificado con el riesgo más alto de prioridad (rojo), considerándolo como un agente infeccioso con un alto riesgo potencial de causar resultados clínicos graves durante la transfusión de sangre; de forma similar, CHIKV fue incluido en la misma lista, pero con un nivel más bajo de prioridad (naranja). Siete años después, esta lista fue actualizada y ZIKV también fue incluido (20), principalmente debido a la transmisión activa reportada en 58 países y la divulgación de casos probables de transmisión transfusional surgidos en Brasil (21–24).

La evidencia publicada durante los últimos 20 años ha reportado prevalencias de ARN arboviral en donantes de sangre (DS) durante brotes de estos virus de hasta el 5,5% de DENV en Arabia Saudita(25), 2,8% de ZIKV en la Polinesia Francesa (26) y del 1,9% para CHIKV en Puerto Rico(19). Por otro lado, además de los estudios de prevalencia en DS, se ha reportado DENV con capacidad infecciosa en diversos tipos de componentes sanguíneos (glóbulos rojos, plaquetas y plasma) y se han notificado casos de ITT(27,28). En contraste, solo se han reportado casos de infección con ZIKV por ITT a partir de la transfusión de concentrados plaquetarios (22,29) y, para el caso de CHIKV no existen reportes de ITT, sin embargo, se considera un virus con alto potencial de riesgo debido a los altos títulos de viremia que desarrollan los DS asintomáticos (30).

En Colombia, la circulación del vector de estos arbovirus en más del 90% del territorio nacional, la presencia de todos los serotipos de DENV (DENV-1/DENV-4), además de ZIKV y CHIKV, han generado un estado hiperendémico en el país (31) que ha tenido grandes consecuencias para la salud pública. Se estima que más de la mitad de la población nacional está en riesgo de ser infectada por estos arbovirus(32) y este riesgo de infección tiende a aumentar durante los periodos de brotes de arbovirus, que ocurren durante periodos de sequía y aumento de la temperatura en todo el país (33). Hasta la fecha, han sido reportados cinco brotes de dengue en el país (1998, 2022, 2010, 2013 y 2019), uno de ZIKV (2016) y otro de CHIKV (2015) (34–36) en los que un alto número de casos fueron reportados. Considerando todo lo anterior, este estudio tuvo por objetivo evaluar el riesgo en la seguridad transfusional por arbovirus en donantes de sangre Colombianos, y para esto, aplicamos una técnica de diagnóstico molecular de arbovirus previamente validada en 1.200 sueros de DS que asistieron a seis bancos de sangre vinculados a la red nacional de bancos de sangre de la Cruz Roja Colombiana; posteriormente, se calcularon las prevalencias e incidencias de arbovirus en la población de DS y, se estimó el riesgo que estos arbovirus representan para la seguridad transfusional en el país. Si bien en Colombia no se han reportado casos de ITT de arbovirus, se espera que los resultados de este estudio sean útiles para comenzar a recopilar información útil que sirva de base para el desarrollo de políticas de salud pública en el futuro.

ÍNDICE

1 MARCO TEÓRICO 1

1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS ARBOVIRUS 1

1.2 GENERO FLAVIVIRUS: VIRUS DENGUE Y ZIKA 1

1.2.1 Virus dengue 2

1.2.2 Virus Zika 3

1.3 GENERO ALPHAVIRUS: VIRUS CHIKUNGUNYA 3

1.3.1 Virus chikungunya 4

1.4 HISTORIA Y EPIDEMIOLOGIA DE LOS VIRUS DENGUE, ZIKA Y CHIKUNGUNYA 5

1.4.1 Virus dengue 5

1.4.2 Virus Zika 6

1.4.3 Virus chikungunya 7

1.5 IMPACTO DE LA CIRCULACIÓN DE ARBOVIRUS EN LA SEGURIDAD TRANSFUSIONAL 8

1.6 RIESGO TRANSFUSIONAL 10

1.6.1 Prevalencia 10

1.6.2 Tasa de incidencia 10

1.7 ESTADO DEL ARTE 12

1.7.1 Arbovirus Transmitidos por Transfusión (TT) 12

1.7.2 Prevalencia de arbovirus en donantes de sangre 13

1.7.3 Planteamiento del Problema 14

2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 15

3 OBJETIVOS 15

3.1 OBJETIVO GENERAL 15

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 15

4 CAPITULO 1: ANÁLISIS DE LA PREVALENCIA E INCIDENCIA DE ARBOVIRUS EN DONANTES DE SANGRE DURANTE UN PERIODO ENDÉMICO DE DENGUE EN COLOMBIA 15

4.1 INTRODUCCIÓN 16

4.2 METODOLOGÍA 16

4.2.1 Recolección de muestras y consideraciones éticas 16

4.2.2 Detección molecular de arbovirus en sueros provenientes de donantes de sangre 18
4.2.3 Análisis estadístico 18
4.3 RESULTADOS 19
4.3.1 Durante periodos endémicos de dengue, DENV, ZIKV y CHIKV circulan en donantes de sangre 19
4.3.2 Las prevalencias e incidencias de arbovirus son similares en áreas endémicas y no endémicas para dengue 21
4.3.3 Los serotipos 1 y 2 de DENV circulan en donantes de sangre 23
4.3.4 Las prevalencias más altas de arbovirus en donantes de sangre se encuentran en Cali y Manizales 24
4.4 DISCUSIÓN 25
4.5 CONCLUSIÓN 26
5 CAPÍTULO 2: COMPARACIÓN DEL RIESGO RESIDUAL DE ARBOVIRUS EN DONANTES DE SANGRE DURANTE DOS MOMENTOS EPIDEMIOLÓGICOS DISTINTOS 27
5.1 INTRODUCCIÓN 27
5.2 METODOLOGÍA 27
5.2.1 Comparación de prevalencias, tasas de incidencia y riesgos residuales de arbovirus durante un brote y un periodo endémico de dengue 27
5.2.2 Encuesta realizada a los donantes de sangre positivos para arbovirus 28
5.2.3 Análisis estadístico 29
5.3 RESULTADOS 29
5.3.1 Las prevalencias y tasas de incidencia de arbovirus en donantes de sangre fueron más altas durante el brote de dengue, en comparación con el periodo endémico 29
5.3.2 En áreas no endémicas, las prevalencias y tasas de incidencia de chikungunya y coinfecciones fueron similares durante el brote y el periodo endémico de dengue 33
5.3.3 Durante brotes y periodos endémicos de dengue, los arbovirus pueden representar un riesgo en la seguridad transfusional 36
5.3.4 La mayoría de las donantes de sangre encuestados fueron asintomáticos 38
5.4 DISCUSIÓN 39
5.5 CONCLUSIONES 42
6 CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS VIRUS DENGUE, ZIKA Y CHIKUNGUNYA EN PLAQUETAS Y GLÓBULOS ROJOS ALMACENADOS BAJO CONDICIONES ESTÁNDAR DE BANDO DE SANGRE 42

6.1 INTRODUCCIÓN 42
6.2 METODOLOGÍA 43
6.2.1 Población y Muestras 43
6.2.2 Cuantificación absoluta de copias genómicas de dengue, Zika y chikungunya. 43
6.2.3 Relación del título viral y copias genómicas de cosechas virales de dengue, Zika y chikungunya 44
6.2.4 Ensayos de Infección de plaquetas y glóbulos rojos con virus dengue, Zika y chikungunya 44
6.2.5 Detección molecular de virus dengue, Zika, chikungunya y beta-actina en plaquetas y glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre 45
6.2.6 Confirmación de la capacidad infecciosa de chikungunya en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre 46
6.2.7 Análisis estadístico 47
6.3 RESULTADOS 47
6.3.1 Equivalencia entre el título viral y el número de copias genómicas de cosechas virales de dengue, Zika y chikungunya utilizadas 47
6.3.2 El genoma viral de dengue, Zika y chikungunya es estable en plaquetas y glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre 48
6.3.3 La capacidad infecciosa del virus chikungunya se mantiene en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre 50
6.4 DISCUSIÓN 52
6.5 CONCLUSIONES 54
7 CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES 55
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre durante un periodo endémico de dengue. 20

FIGURA 2. Tasas de incidencias de arbovirus en donantes de sangre durante un periodo endémico de dengue. 21

FIGURA 3. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas de colombia. 23

FIGURA 4. Tasas de incidencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas durante un periodo endémico de dengue. 23

FIGURA 5. Prevalencias de serotipos de denv en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas de colombia. 24

FIGURA 6. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre durante un brote, y un periodo endémico de dengue. 32

FIGURA 7. Tasas de incidencias de arbovirus en donantes de sangre durante un brote y un periodo endémico de dengue en colombia. 32

FIGURA 8. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas durante un brote, y un periodo endémico de dengue en colombia. 34

FIGURA 9. Tasas de incidencias de arbovirus en donantes de sangre de áreas endémicas y no endémicas durante un brote y un periodo endémico de dengue en colombia. 35

FIGURA 10. Riesgo residual de arbovirus en donantes de sangre durante el brote y el periodo endémico de dengue en colombia. 36

FIGURA 11. Riesgo residual de arbovirus en donantes de sangre de áreas endémicas y no endémicas durante el brote y el periodo endémico de dengue en colombia. 37

FIGURA 12. Cuantificación absoluta de copias genómicas de dengue, zika y chikungunya virus en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre. 49

FIGURA 13. Cuantificación absoluta de copias genómicas de dengue, zika y chikungunya virus en glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre. 50

FIGURA 14. Detección de la proteína e del virus chikungunya. 51

FIGURA 15. Cuantificación del título viral de chikv, en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre. 52

ÍNDICE DE TALAS

TABLA 1. Número de muestras recolectadas por los bancos de sangre incluidos en el estudio……..... 17

TABLA 2. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes las ciudades incluidas el estudio..... 25

TABLA 3. Número de muestras recolectadas en cada banco de sangre durante los años 2019-2020 28

TABLA 4. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre durante el brote y el periodo endémico de dengue 30

TABLA 5. Virus que integraron las coinfecciones en donantes de sangre durante el brote de dengue. 30

TABLA 6. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas durante un brote de dengue. 34

TABLA 7. Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por arbovirus en donantes de sangre en colombia. 39

TABLA 8. Secuencias de primers y sondas utilizadas en rt-qpcr para la cuantificación absoluta de copias genómicas de denv, zikv y chikv 43

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Detección de denv, zikv y chikv en sueros de donantes de sangre por rt-pcr semi-anidada multiplex. 77

ANEXO 2. Mapa político de las regiones colombianas resaltando los departamentos y municipios en los que se observaron coinfecciones arbovirales durante el brote de dengue 2019-2020)..... 78

ANEXO 3. Relación entre el titulo viral expresado en ufp/ml y el número de copias genómicas de cosechas virales de denv, zikv y chikv 78

ANEXO 4. Amplificación de virus dengue, zika y chikungunya por rt-qpcr..... 79

ANEXO 5. Conteos celulares y parámetros hematológicos de la unidad de plaquetas y glóbulos rojos enviada al instituto de virología de la universidad el bosque 80

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Descripción general de los arbovirus

El término arbovirus, es una abreviatura que significa "**ar**thropod-**bo**rne **viruses**", y hace referencia a un grupo de más de 500 virus (37) que se transmiten a un huésped susceptible a la infección por medio de artrópodos (vectores) hematófagos, los cuales incluyen mosquitos, garrapatas y moscas (37,38). La distribución global de estos virus está asociada directamente con la distribución del vector (39), mientras que el mantenimiento de la propagación de estos virus requiere del vector, huéspedes vertebrados y unas condiciones ambientales apropiadas (38). Típicamente, los ciclos de transmisión de estos virus involucran ciclos enzoóticos (selváticos), en los cuales el virus se propaga por la transmisión entre los vectores y huéspedes vertebrados primarios como primates, aves y pequeños mamíferos, y ciclos urbanos, en donde un animal doméstico o un humano se infecta (en un ciclo enzoótico) y actúa como un huésped amplificador en la transmisión del virus a otras personas o animales domésticos de la comunidad, en donde el vector puede ser el mismo o uno diferente al del ciclo selvático (5,38).

A nivel global, los arbovirus capaces de causar enfermedad en los humanos pertenecen en su mayoría a tres familias; Flaviviridae (*genero Flavivirus*), Togaviridae (*género Alphavirus*) y Bunyaviridae (*géneros Bunyavirus, Orthobunyavirus, Nairovirus y Phlebovirus*) (38). En el contexto de América latina y el caribe, los virus dengue (DENV) y Zika (ZIKV) de la familia Flaviviridae y el virus chikungunya (CHIKV) de la familia Togaviridae, son los más relevantes, puesto que han producido grandes epidemias a lo largo de todo el continente desde su introducción (40–43). Estos virus son transmitidos principalmente por la picadura de mosquitos hembra de las especies *Aedes aegypti* y *Ae. Albopictus*(44–48).

1.2 Genero flavivirus: virus dengue y Zika

Los *flavivirus* constituyen el género con más relevancia clínica de los arbovirus, ya que varios virus de este género son motivo de preocupación mundial, entre estos, el virus dengue (DENV), virus Zika (ZIKV), virus del Nilo occidental (WNV), y el virus de la fiebre amarilla (YFV) (49). Su genoma viral es un ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla de sentido positivo (ss+ARN). Los genomas de los virus DENV y ZIKV están estrechamente relacionados, puesto que

comparten aproximadamente el 55% de su identidad de aminoácidos (50). El tamaño del genoma de estos dos virus es de aproximadamente 11 kb y están flanqueados por unas regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5´ y 3´ (51) y contiene un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica tres proteínas estructurales (la de cápside (C), precursora de membrana (prM) y la proteína de envoltura (E)) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Las proteínas estructurales de estos virus se involucran principalmente en la producción de viriones infecciosos, la unión, entrada y salida del virus en la célula. Por otro lado, las proteínas no estructurales (NS) de estos virus intervienen en procesos intracelulares del ciclo viral como la replicación y traducción del genoma, el procesamiento del polipéptido viral, reordenamiento de la membrana, ensamblaje del virión y evasión de la respuesta inmune innata (52). Ahora bien, aunque los virus DENV y ZIKV poseen una amplia gama de similitudes genómicas, estos difieren en las características clínicas y la patogénesis que desarrolla el hospedero una vez se infecta. Estas características se describen a continuación.

1.2.1 Virus dengue

Este virus consta de cuatro serotipos (DENV-1 al DENV-4), que se encuentran genéticamente relacionados, con una identidad de hasta el 75% de aminoácidos (AA) entre estos, mientras que los virus (DENV) que se agrupan dentro de cada uno de estos serotipos, tienen una identidad alrededor del 97% de AA y se agrupan entonces en genotipos (53). La infección por cualquiera de los serotipos de DENV puede ocasionar fiebre de dengue, que es una enfermedad de curso asintomático o subclínico (con síntomas leves que, generalmente no incitan al individuo a acudir a un centro de salud) en hasta el 75% de los casos (4,54). Tras un periodo de incubación entre cuatro y ocho días, la enfermedad se resuelve de una manera autolimitada en la mayoría de los casos sintomáticos, no obstante, una baja proporción de éstos desarrolla una enfermedad grave que se caracteriza por una fuga plasmática y daño endotelial(55). Según su severidad, clínicamente esta enfermedad se clasifica como dengue, en la que se desarrolla fiebre acompañada de náuseas, erupciones cutáneas y malestar general; dengue con signos de alarma, que (junto a la presencia de los anteriores síntomas) se caracteriza por un intenso dolor abdominal acompañado de signos como son la acumulación clínica de líquidos, hepatomegalia, aumento del hematocrito y trombocitopenia; y dengue grave, en la que se evidencia una extravasación plasmática cuyo desenlace puede ser la muerte (55).

Un individuo puede desarrollar fiebre de dengue hasta por cuatro veces en su vida (una por cada serotipo de DENV) y, las infecciones secundarias heterólogas (es decir, por un serotipo distinto) se asocian con desenlaces más graves de la enfermedad (56). En este último caso, se presentan fenómenos como la supresión de la respuesta inmune innata (57) y la amplificación de la infección dependiente de anticuerpos (ADE), en el cual, los anticuerpos generados durante una infección heteróloga previa tardía (6 meses o más) son incapaces de neutralizar por completo el virus y, por el contrario, contribuyen al aumento de la replicación viral (58).

1.2.2 Virus Zika

El virus Zika, cuyo nombre hace referencia al lugar (bosque de Zika, Uganda) donde se identificó por primera vez (59), posee una particular diferencia estructural respecto a otros *Flavivirus* como DENV. Esta diferencia se encuentra en la proteína E, específicamente en la región cercana al sitio de glicosilación Asn 154, siendo esta región 5 AA más grande en ZIKV y, particularmente, con una alta variabilidad de la secuencia cuando se compara con otros *Flavivirus* o incluso entre cepas de ZIKV; se cree que esta diferencia podría influir en las interacciones con receptores y en la respuesta humoral del huésped(60). Clínicamente, la infección por ZIKV tiene un periodo de incubación entre 4 y 10días (11,61), se cursa de manera asintomática en hasta el 80% de los casos (59) y, es una enfermedad que presenta síntomas como fiebre, exantema maculopapular pruriginoso, artralgias y conjuntivitis no purulenta (62). La infección por este virus se ha asociado con el desarrollo del síndrome de Guillain Barre (63) y la microcefalia fetal por una infección durante el embarazo (64).

De manera interesante, se ha observado que anticuerpos provenientes de sueros de individuos infectados con DENV en fase aguda o convaleciente temprana (6 meses o menos) son capaces de neutralizar la infección por ZIKV (65), sin embargo, los sueros de individuos infectados con DENV pero, provenientes de fases convalecientes tardías, poseen poca actividad neutralizante y una baja reactividad cruzada contra ZIKV (66), de hecho, estos anticuerpos inducidos durante una infección previa de DENV, pueden potenciar la infección in *vitro* de ZIKV (67), siguiendo el modelo (previamente descrito) de ADE para DENV.

1.3 Genero *alphavirus*: virus chikungunya

Los *alphavirus* son un género perteneciente la familia *Togaviridae*, este género abarca virus que se encuentran distribuidos en todos los continentes exceptuando la Antártida. Dentro de

este género, se incluyen diversos patógenos de importancia clínica humana y animal, entre estos, el virus chikungunya (CHIKV), el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) y el virus Sindbis (SINV)(68). Son virus icosaédricos de aproximadamente 70nm cuyo genoma es un ss+ARN de 12 kb (69) y a diferencia de otros arbovirus como los agrupados dentro del género *flavivirus*, los *alphavirus* contienen en su genoma una caperuza 5´ (también denominada cap-5´), una secuencia de ácido poliadenílico 3´ y dos marcos de lectura abiertos (ORF) (70). El primer ORF (en sentido 5´-3´) codifica un total de cuatro proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) implicadas en procesos de transcripción y traducción del virus. La proteína nsP1 participa en el ensamblaje de la cap-5´ en el genoma viral, la proteína nsP2 es necesaria para el procesamiento de las poliproteínas ya que en su extremo carboxilo terminal (C-terminal) contiene una cisteína proteasa, mientras que la nsP3 es crucial en la replicación viral y la actividad de la ARN polimerasa depende de la actividad de la nsP4 (71,72). El segundo ORF codifica las cinco proteínas estructurales (C,6k,E1,E2 y E3), donde la proteína C se encarga de empaquetar el ss+RNA del virus, las proteínas E1 y E2 median la entrada del virus a la célula, mientras que las proteínas E3 y 6k trabajan en conjunto para transportar la proteína precursora de membrana al retículo endoplasmático de la célula (73); además de estas proteínas estructurales, existe una última denominada proteína transferasa (TF), que comparte la misma región codificante de 6k, pero se genera por un cambio de marco ribosómico y reduce la expresión de la respuesta temprana de los interferones (IFN) de tipo I (74).

1.3.1 Virus chikungunya

El virus Chikungunya (CHIKV), se identificó por primera vez en Tanzania en 1952 y su nombre se le atribuye a una palabra del idioma kimakonde cuyo significado es “lo que se dobla”, referenciando la postura encorvada de las personas infectadas(75). A diferencia de las infecciones por virus del género *flavivirus* como *DENV* y ZIKV, las infecciones por CHIKV se cursan de manera asintomática en un porcentaje más bajo, que oscila entre el 5 y el 28% de los casos (76,77). Tras un periodo de incubación de 4 días (78) la infección se caracteriza por una fiebre alta acompañada de artralgias, rash, cefalea y dolores retro orbitales (79). Algo que llama mucho la atención de esta infección, es que alrededor del 48% (80) de los individuos convalecientes experimentan trastornos musculoesqueléticos crónicos y, un 5% de estos individuos cumplen con todos los criterios de un reumatismo inflamatorio crónico, que puede destruir y deformar las articulaciones (81). La razón del curso de esta patogénesis se puede

explicar con resultados de estudios realizados en primates, donde se ha mostrado que CHIKV infecta y persiste en células de linaje monocito/macrófago y posteriormente se establece en el tejido sinovial durante las infecciones cuyo desenlace evidencia signos articulares crónicos (82).

Por último, existe evidencia que sugiere que el fenómeno de ADE podría estar implicado en la potenciación de la infección por CHIKV, siendo este un factor que contribuye a la aparición de condiciones patológicas graves durante la infección. Lum y colaboradores demostraron que a concentraciones sub-neutralizantes, los anticuerpos específicos contra CHIKV incrementaron la replicación *in vitro* de este virus al infectar líneas celulares de monocitos e, *in vivo* utilizando modelos murinos para la infección por CHIKV(83).

1.4 Historia y epidemiologia de los virus dengue, Zika y chikungunya

1.4.1 Virus dengue

Aunque el origen del DENV sigue siendo un tema de debate, las primeras enfermedades similares a la fiebre de dengue se registraron por primera vez en las Américas en el año 1635 (13), sin embargo, fue hasta la década de 1950 que se registraron los primeros casos severos (14); más adelante, por la globalización, el aumento de la migración humana, la urbanización descontrolada y el poco control vectorial en la mayor parte de las zonas endémicas para estos virus, el DENV se convirtió en uno de los arbovirus más dispersos en el mundo (15). Actualmente, Se estima que 4.000 millones de personas viven en zonas endémicas para DENV en todo el mundo, y cálculos epidemiológicos adicionales informan que ocurren aproximadamente 390 millones de casos de fiebre de dengue al año, de estos, hasta 1.000.000 de casos se diagnostican como dengue grave y 20.000 de ellos (particularmente niños) terminan en desenlaces fatales (16). La fiebre de dengue, hasta la fecha es la infección viral transmitida por vectores con más incidencia de casos en Colombia (17), la incidencia de casos de dengue en Colombia aumento significativamente entre 1970 y 1978. Desde ese momentó, se han registrado 6 brotes de dengue en Colombia, el primero en 1998 con un saldo de 63.177 casos sintomáticos reportados y una incidencia de 326 casos por 100.000 habitantes, en 2002 (78.628 casos; 380 casos por 100.000 habitantes), en 2010 (157.202 casos; 666 casos por 100.000 habitantes), 2013 (125.554 casos; 76,2 casos por 100.000 habitantes) y en 2019 (127,55 3 casos; 475,4 casos por 100.000 habitantes)(34). En el presente año, desde la

semana epidemiológica 14 Colombia ha estado en brote de dengue y hasta el momento se han registrado 100.348 casos (84).

1.4.2 Virus Zika

El primer aislamiento de ZIKV se obtuvo a partir del suero de un primate (*macaco rhesus*) en 1947, en el bosque de Zika, que se ubica en la península de Entebbe, Uganda (85); posteriormente, la infección de ZIKV en humanos se informó por primera vez en Nigeria en el año 1954, durante un brote de una infección cuyo signo principal era la ictericia, que más tarde se confirmó como infección por ZIKV, ya que se correlacionaba con el desarrollo de títulos altos de anticuerpos neutralizantes contra ZIKV y el desarrollo de ictericia en individuos a los que se les aisló ZIKV a partir de muestras de suero durante este brote (86). Desde ese momento y hasta inicios de la década del 2000, solo se registraron casos leves de infecciones asociadas a ZIKV que no estaban relacionadas con brotes, esto en países de África y Asia (87), pero fue hasta el año 2007 donde por primera vez se reportó una infección por ZIKV fuera de Asia y África. Además de esto, el primer gran brote de este virus se registró en la isla Yap, que hace parte de los Estados Federados de Micronesia (11); durante este primer gran brote, se infectaron alrededor del 73% de los habitantes de la isla y los síntomas atribuibles a la infección por ZIKV eran leves y se caracterizaban por la presencia de fiebre, rash, artralgias y conjuntivitis no purulenta (11,88).

Posteriormente, durante los años 2013-2014, se produjo una gran epidemia de infecciones por ZIKV en la Polinesia Francesa, un territorio del medio sur del Océano Pacifico, en el que residen alrededor de 270.000 personas distribuidas a lo largo de 67 islas en cinco archipiélagos (89). Se estima que el 11% de la población consultó a un centro médico por la presencia de síntomas similares a los evidenciados en las infecciones por ZIKV reportadas en el brote del 2007 en la Isla de Yap (90), sin embargo, una pequeña proporción de estos casos se asoció con una enfermedad más severa en la que se evidenciaban complicaciones neurológicas, específicamente el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré (91). En esta epidemia no solo se describió que la infección por ZIKV podría estar involucrada en el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré, sino que también favoreció la propagación de ZIKV a otras islas cercanas a la Polinesia Francesa (92,93), e inclusive a otros países lejanos a estas islas como Australia(94),Italia (95) y Japón (96), en los que, por primera vez, se reportaron infecciones por ZIKV.

En América del sur, a principios del año 2015 se notificó por primera vez la transmisión autóctona de ZIKV (es decir, la transmisión por mosquitos infectados con ZIKV que circulan en un área determinada) en el noreste de Brasil (97) y para finales del 2015, los casos sospechosos de infecciones por ZIKV se habían reportado en 14 estados brasileños y superaban los 440.000 casos (98). Inesperadamente, de manera simultánea al aumento del reporte de casos de infecciones por ZIKV, los casos de microcefalia empezaron a aumentar de una manera directamente proporcional en las áreas de Brasil afectadas por ZIKV (99). En América, la propagación de este virus hacia los países cercanos a Brasil fue muy rápida, tanto así que, para finales del año 2016, 48 países y territorios de las Américas habían notificado la transmisión autóctona de ZIKV (100).

Colombia, después de Brasil, fue el segundo país en reportar casos de ZIKV en América del sur y para finales del año 2016, el país había notificado más de 100.000 infecciones sospechosas de ZIKV (101). En este país, al igual que en Brasil, fue documentado el aumento de casos de microcefalia de manera directamente proporcional al número de casos sospechosos de ZIKV. Curiosamente, se reportó un número máximo de casos de microcefalia aproximadamente 24 semanas después del pico de brote de ZIKV en el país, lo que sugirió que el mayor riesgo de resultados adversos se daba entre mujeres que se infectaron al principio del embarazo (102). Desde ese año, no se han reportado más brotes de ZIKV en Colombia, sin embargo, se siguen reportando casos de infección por ZIKV; en 2023 hasta el periodo epidemiológico IX (que incluye el mes de agosto) se han notificado 83 casos de infecciones por ZIKV, 53 de estos considerados como sospechosos y 28 confirmados por clínica (103).

1.4.3 Virus chikungunya

Aunque este virus se aisló por primera vez en 1952 en Tanzania, a partir de una muestra de suero de un individuo infectado durante un brote de una enfermedad cuyas características clínicas principales eran poliartralgias debilitantes (104), se ha descrito que CHIKV se originó en África hace más de 500 años. En este mismo estudio, el análisis filogenético del linaje africano común de CHIKV, indicó que el virus se dividió en tres genotipos, que se denominan africano occidental (WA), africano oriental, central y sudafricano (ECSA) y asiático. Adicionalmente, la variante ECSA se puede dividir en un sub-linaje del Océano Índico (IOL). El primer gran brote de CHIKV se produjo entre los años 2005-2006 en la isla de Reunión, en el Océano Índico; durante este brote (desencadenado por la variante IOL), se estimó que 775.000 habitantes (aproximadamente el 35% de la población) de la isla se infectaron con CHIKV.

Curiosamente, en este brote se reportaron formas graves de la enfermedad que incluían daños en el sistema nervioso central (SNC) y hepatitis fulminante (105). El regreso a los países natales de un elevado número de viajeros que se infectaron en la isla de Reunión durante este brote de CHIKV, provocó que el virus se disipara rápidamente en otros países alrededor del mundo, entre estos, Italia, Malasia y Bangladesh(106).

En las Américas, en el año 2013 la isla de San Martín fue el primer lugar en reportar la transmisión autóctona de CHIKV (107) y en el 2014, la trasmisión autóctona de CHIKV a través de *Aedes aegypti* se documentó en otras islas de las Américas (107). Un año después, en la América continental, se habían confirmado más de 37.000 casos de infecciones por CHIKV y para el 2016 la cifra ya había ascendido a más de 140.000 casos confirmados por pruebas de laboratorio, siendo Brasil, Bolivia y Colombia los países con el mayor número de casos reportados (105). Los brotes de CHIKV en las Américas agravaron el estado hiperendémico de los países en los que ya circulaban otros arbovirus como DENV y ZIKV; en Brasil, por ejemplo, se reportó una proporción significativa de coinfecciones entre CHIKV y otros arbovirus, y más complejo aún, se reportó infección de CHIKV en SNC en individuos con sospecha de infección por ZIKV (108). De esta manera, se ha registrado que las coinfecciones pueden llegar a presentarse en hasta el 36% de las infecciones por arbovirus reportadas (109).

En Colombia, en el 2014 se notificaron 106.592 casos de infecciones por CHIKV y en el 2015 más de 250.000 casos de infecciones por CHIKV, sin embargo, a pesar de este alto número de casos reportados en estos años, se estima que hubo un subregistro de los casos notificados, lo cual es importante, en tanto puede generar sesgos en las proyecciones epidemiológicas y dificultades en la adopción de decisiones sobre el manejo de la epidemia. En este sentido, un reporte que estimó el subregistro de los casos de chikungunya en el municipio de Girardot, Cundinamarca, entre noviembre de 2014 y mayo de 2015, reportó un 36,1% de casos que no se registraron porque el individuo no asistió a consulta y un 24,9% por falta de notificación institucional (110).

1.5 Impacto de la circulación de arbovirus en la seguridad transfusional

La seguridad es un proceso que depende de una serie de funciones interconectadas que inicia con el reclutamiento y selección de voluntarios, que reduce significativamente la probabilidad de que los voluntarios que se convierten en donantes de sangre (DS) sean individuos con alto de riesgo de presentar infecciones transmisibles por transfusión sanguínea (111). Después de la selección de los DS, el segundo paso que involucra la seguridad transfusional, se enfoca en

la detección de patógenos capaces de transmitirse a través de la transfusión de hemocomponentes (111); en Colombia, la normativa vigente referente a la detección de patógenos infecciosos en DS voluntarios, especifica el tamizaje del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 y tipo 2 (HIV-1;HIV-2), anticuerpos anti virus de la hepatitis C (VHC), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico de la enfermedad de Chagas), serología para Sífilis, gota gruesa para *Plasmodium* en zonas endémicas para este parásito y opcionalmente, anticuerpos anti HTLV 1 y 2 y anticuerpos anti hepatitis B (anti-HBc) (112). Después del tamizaje de la sangre total que se recolecta en el banco de sangre, el procesamiento de ésta es otro paso fundamental en la seguridad transfusional, ya que se enfoca en el fraccionamiento de la sangre en sus hemocomponentes (glóbulos rojos, plaquetas y plasma). Este proceso puede incluir la depleción de leucocitos de cada uno de estos hemocomponentes y, en algunos casos, la aplicación de técnicas de reducción de patógenos. Algunos países cuentan con herramientas para recibir informes de eventos adversos tras el uso de componentes sanguíneos (lo que se conoce como hemovigilancia), después de que los hemocomponentes son liberados por el banco de sangre para su uso (111).

La presencia de patógenos (capaces de transmitirse por transfusión) en cualquiera de los hemocomponentes que se puedan obtener a partir de la sangre total, afecta directamente la seguridad transfusional. Particularmente, los arbovirus se empezaron a considerar como patógenos que representan un riesgo en la seguridad transfusional desde principios del siglo XXI, cuando en Estados Unidos se describió una infección de virus del Nilo occidental (WNV) transmitida por transfusión sanguínea (7). Al igual que el VNO, otros arbovirus como ZIKV se incluyen entre los requisitos de pruebas de tamizaje a DS sugeridos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (U.S. Food and Drug Administration; FDA) y la AABB (113), sin embargo, en la mayoría de los países endémicos para estos virus (entre estos Colombia), a la fecha ningún arbovirus se tamiza de manera rutinaria (112). Si se considera que un pilar en la seguridad transfusional se enfoca en la detección de patógenos capaces de transmitirse a través de la transfusión de hemocomponentes, los arbovirus podrían representar un riesgo en la seguridad transfusional ya que no se tamizan en bancos de sangre. Adicionalmente, los arbovirus poseen características que les proporcionan un potencial teórico de transmisión por transfusión (TT). En primer lugar, la infección por cualquiera de estos tres virus se puede cursar de manera asintomática (10–12), en este sentido, un DS virémico podría realizar una donación sin tener conocimiento que está infectado por estos virus. En segundo lugar, las infecciones (asintomáticas y sintomáticas) que causan DENV, ZIKV y CHIKV suelen

cursarse con elevados títulos de viremia (15,17,19), por lo tanto, la cantidad de virus en hemocomponentes infectados que pueden llegar a transfundirse sería elevada; adicionalmente, en áreas endémicas para estos virus, el vector y el hospedero se encuentran en constante interacción, por lo tanto, un DS nunca tendría la certeza si está o no infectado con el virus.

1.6 Riesgo Transfusional

Para garantizar que las donaciones no provengan de un DS, cuya probabilidad de estar infectado con agentes que puedan ser transmitidos por hemocomponentes sea alta, una de las medidas críticas se enfoca en la recopilación de datos epidemiológicos sobre infecciones transmisibles por sangre en la población de DS, esto, para obtener información acerca del riesgo de una infección en una población específica de DS (114). Estos datos epidemiológicos recolectados, se presentan generalmente como medidas de prevalencia e incidencia. La incidencia es la medida de nuevas infecciones, mientras que la prevalencia es una medida de la extensión de una infección en una población; sus respectivas definiciones se presentan a continuación:

1.6.1 Prevalencia

Es la frecuencia de infección identificada (incluidas las infecciones pasadas y recientes) en un momento especifico o durante un periodo de tiempo específico en una población definida.

1.6.2 Tasa de incidencia

Tasa de infección recién adquirida identificada durante un periodo de tiempo específico en una población definida.

Ahora bien, en una población definida, los datos epidemiológicos de tasa de incidencia y prevalencia pueden arrojar resultado altos o bajos de una manera independiente. Una alta prevalencia e incidencia son indicativas de una infección establecida con transmisión continua; una alta prevalencia acompañada de una baja incidencia, son indicativas de una infección establecida, para la cual se han introducido medidas de intervención; por otro lado, una baja prevalencia en conjunto de una alta incidencia, indican una infección que recientemente se

introdujo en una población; por último, una baja prevalencia junto con una baja incidencia indicarían que hay muy poca evidencia de infección pasada o actual en la población.

La evaluación del riesgo en una población está sujeta a variaciones por la interacción de características específicas del individuo, y la exposición a factores de riesgo. El riesgo residual corresponde a la probabilidad de liberar una donación potencialmente infecciosa, causado predominantemente por donantes infectados que se encuentran en período de ventana (infección reciente), periodo en el cual el agente infeccioso alcanza un nivel detectable en las pruebas de diagnóstico. En este caso, la variación puede controlarse y reducir este riesgo, mediante el conocimiento de los factores de riesgo (identificados en la encuesta) y la elaboración de pruebas de diagnóstico (serológicas y moleculares) para el diagnóstico de enfermedades transmisibles.

Dentro de las recomendaciones generales propuestas en las guías de la AABB(115) para minimizar el riesgo de transmisión de infecciones en transfusiones se encuentran:

1. Los componentes sanguíneos (sangre total, aféresis) deben analizarse antes de la liberación para usos clínicos o industria.
2. El análisis de los componentes sanguíneos debe realizarse de forma obligatoria para los siguientes marcadores: antígeno p24 y anticuerpos para HIV-1 y HIV-2, antígeno de superficie del virus de Hepatitis B (HBV), anticuerpos contra el antígeno core del virus de la Hepatitis B (HBV), anticuerpos para el virus de Hepatitis C (HCV), anticuerpos específicos para sífilis (*Treponema pallidum*), anticuerpos específicos para enfermedad de Chagas (Trypanosoma cruzi), anticuerpos específicos para virus linfotrópicos humanos (HTLV-1 y 2).
3. Análisis de donaciones para otras infecciones como malaria o enfermedad de Chagas, de acuerdo con evidencia epidemiológica local.
4. El tamizaje de las muestras debe realizarse con ensayos sensibles y específicos los cuales han sido evaluados y validados para el tamizaje en sangre.
5. Considerar el análisis de todas las muestras de donantes con pruebas serológicas antes de considerar pruebas como la detección de ácidos nucleicos.
6. Solo se debe liberar los componentes sanguíneos de las donaciones con resultado negativo (no reactivo) en todos los marcadores evaluados, para el uso en clínica o en la industria.
7. Las unidades reactivas deben identificarse de forma clara, removerse del stock de unidades en cuarentena y deben almacenarse de forma separada y segura antes de su disposición final o su conservación en condiciones que garanticen la calidad en investigación, de acuerdo con las políticas nacionales.

1.7 Estado del Arte

1.7.1 Arbovirus Transmitidos por Transfusión (TT)

El primer caso documentado de DENV-TT ocurrió en Hong Kong en el año 2002, un área no endémica para este virus. En este, una mujer que era seronegativa para DENV antes de la transfusión, presentó fiebre dos días después de recibir una unidad de glóbulos rojos (GR), cuyo donante fue diagnosticado con DENV siete días después de la donación. Posteriormente, los análisis serológicos y moleculares realizados al receptor confirmaron la infección por DENV-1 y la seroconversión a IgM específica contra DENV, luego de la transfusión (28). El segundo caso de TT fue reportado en Singapur en el 2007, donde un donante de sangre (DS) asintomático reportó fiebre un día después de la donación y, al investigar los receptores de esta donación, se encontró que el receptor de GR había desarrollado fiebre 2 días después de la transfusión, así como el receptor del plasma fresco congelado (PFC) que desarrolló fiebre y derrame pleural 1 día después de la transfusión; más adelante, los análisis serológicos realizados a las muestras del DS y los receptores resultaron positivos para DENV-2 (27).

En América, el primer caso de DENV-TT fue documentado en Puerto Rico durante el 2012. En este, un hombre de 80 años con anemia refractaria recibió dos unidades de GR y tres días después desarrolló fiebre hemorrágica de dengue (FHD). Aunque el DS no pudo ser rastreado, la asociación entre la detección serológica y molecular de DENV-2 y el desarrollo de una enfermedad por DENV severa durante el periodo de hospitalización del receptor, sugirió una infección TT de este virus (15). Más adelante, en Brasil se reportó un caso de TT, pero esta vez a partir de concentrados plaquetarios. El receptor fue una mujer de 56 años con anemia aplásica, la cual desarrolló fiebre acompañada de una disminución en la presión sanguínea 5 días después de la transfusión. La infección por DENV fue confirmada por un ensayo serológico y una PCR en tiempo real en la que se evidenció DENV-2 como serotipo infectante y una carga viral de $6.192x10^3$ copias/mL (116). Además de estos, otros tres casos con descripciones aún más detalladas del virus, del DS y de los receptores de estos componentes en los que se evidencia infección por DENV-TT se encuentran reportados (23,117), soportando así la idea de que este virus puede transmitirse por una transfusión de hemocomponentes infectados.

Respecto a la TT de ZIKV, hasta el momento solo se han reportado dos casos en Brasil. De estos, el que más información presenta, es el caso de un hombre que recibió una unidad de GR

en marzo de 2015 y, días después, la infección por este virus fue confirmada mediante pruebas de diagnóstico molecular. Particularmente, este hombre llevaba internado 3 meses en una unidad de cuidados intensivos (UCI), por lo que una transmisión por el vector fue completamente descartada (22).

Por otro lado, aunque no se han confirmado casos de CHIKV TT, dado su potencial teórico de TT, éste ha sido considerado como un agente infeccioso de cuidado para garantizar la seguridad transfusional, especialmente en zonas donde el virus es endémico. Debido a esto, se han realizado análisis de estimación del riesgo de TT, esto durante la epidemia ocurrida en la provincia de Songkhla en Tailandia, en la que, en ausencia de medidas de control, el riesgo de TT potencial fue del 10.9% (118).

1.7.2 Prevalencia de arbovirus en donantes de sangre

Dada la evidencia del riesgo de infección por transfusión de estos tres virus, varios estudios encaminados a la detección del genoma viral en los componentes sanguíneos luego de la donación de sangre han sido realizados en diferentes países endémicos. Para el caso de DENV, se han reportado estudios de prevalencia donde se ha detectado ARN viral hasta en el 5.5% de los DS; esto en un estudio prospectivo realizado en Arabia Saudita durante el 2016, en el cual 50 de un total de 911 sueros resultaron positivos para DENV, empleando una RT-qPCR multiplex para la detección de este virus (25). No obstante, en el continente asiático otros reportes encaminados a la búsqueda de ARN de DENV en DS no reportan prevalencias superiores al 1%. Por ejemplo, en China las prevalencias de ARN de DENV se encuentran entre el 0% y el 0.1%(119,120), en Taiwán entre el 0.3% y el 0.4% (121) y en la India la prevalencia reportada es del 0%(122). Por otro lado, en el continente americano, en Brasil, las prevalencias están entre el 0% y el 0.5% (123), en Puerto Rico entre el 0% y el 0.2%(124), y en los Estados Unidos de Norte América (USA) la prevalencia reportada es del 0% (125).

Para el caso de ZIKV, recientemente fueron publicados los resultados de un estudio que se llevó a cabo en la Polinesia Francesa durante el 2014, donde se reportó una prevalencia del 2.8% de DS infectados con el virus (126), siendo esta, la prevalencia más alta reportada hasta el momento. En el continente asiático, son dos los países que han evaluado la prevalencia de ARN de ZIKV en DS, China y Singapur, en el que se reportaron prevalencias del 0% y el 0.1%, respectivamente (127). En el continente americano, está consolidado el mayor número de estos reportes en el mundo, especialmente en Brasil donde las prevalencias están entre el 0% y el

2.7% (128,129), seguido de USA donde las prevalencias son menores del 0.1% (130)y Puerto Rico donde las prevalencias están entre el 0.1% y el 0.3% (123).

A diferencia de los reportes de ARN de DENV y ZIKV en DS donde las prevalencias más altas se han reportado en Asía y Oceanía respectivamente, la prevalencia más alta de CHIKV se ha reportado en el continente americano, en Puerto Rico, donde mediante el uso de un enfoque de amplificación mediado por transcripción (TMA), se reportaron 56 muestras de plasma positivas para ARN de CHIKV de un total de 3.007 muestras tamizadas, sugiriendo así una prevalencia del 1.9% (19). Además de este estudio, en Puerto Rico se han reportado prevalencias entre el 0% y 0.5% (131); en otros países del continente americano (Brasil y USA), las prevalencias reportadas son del 0%(125).

1.7.3 Planteamiento del Problema

La transmisión de virus a través de vectores es un problema de salud pública que afecta a la población de muchos países en el mundo, especialmente a aquella socialmente más vulnerable que tiene acceso limitado a los servicios de salud. En Colombia, la circulación de arbovirus como DENV, CHIKV y ZIKV ha causado cientos de miles de infecciones a lo largo de todo el territorio, provocando problemas sanitarios importantes y muy variados. A pesar de que se tiene completamente claro que el principal modo de transmisión de estos virus es a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, se han identificado otros mecanismos por los cuales estos virus pueden llegar a ser transmitidos a los humanos. Entre los mejor documentados se tienen: la transmisión vertical, a través del contacto sexual y la transfusión sanguínea. Este último, ha sido claramente documentado en casos específicos de infecciones con arbovirus, y recientemente ha cobrado mucha importancia debido al reporte de casos bien documentados de infecciones con ZIKV a través de esta vía. Tanta fue la preocupación a nivel internacional, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con el Centro de Control de Enfermedades de los EE. UU. (CDC, por sus siglas en inglés), lanzaron campañas promoviendo una serie de medidas que debían tomarse para garantizar la seguridad del suministro de sangre en los países con casos de infección por ZIKV. Dichas medidas fueron bien aplicadas en Colombia durante el brote de este virus, sin embargo, ahora que estamos en un periodo endémico, su aplicación representa un reto más grande y muy seguramente necesitarán ser replanteadas. Esta situación claramente plantea la necesidad urgente de iniciar estudios para recopilar y analizar toda la información posible alrededor de la situación de seguridad transfusional en función de la circulación de arbovirus en el país. Así pues, encontrar

una respuesta a la pregunta sobre ¿Qué riesgo representa la circulación de DENV, CHIKV y ZIKV para la Seguridad Transfusional en Colombia?, resulta de gran importancia epidemiológica para la toma de decisiones sobre el control de las enfermedades causadas por estos virus.

2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué riesgo representa la circulación de DENV, CHIKV y ZIKV para la Seguridad Transfusional en Colombia?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el riesgo en la seguridad transfusional por arbovirus en donantes de sangre provenientes de la red nacional de bancos de sangre de la Cruz Roja Colombiana.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la prevalencia e incidencia de Arbovirus en un periodo endémico de dengue, en donantes provenientes de la red nacional de bancos de sangre de la Cruz Roja Colombiana.

2. Comparar el riesgo residual de Arbovirus de un periodo endémico y epidémico, en donantes provenientes de la red nacional de bancos de sangre de la Cruz Roja Colombiana.

3. Analizar la estabilidad de los virus dengue, Zika y chikungunya en plaquetas y glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre.

4 CAPITULO 1: ANÁLISIS DE LA PREVALENCIA E INCIDENCIA DE ARBOVIRUS EN DONANTES DE SANGRE DURANTE UN PERIODO ENDÉMICO DE DENGUE EN COLOMBIA

4.1 Introducción

Arbovirus como el dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y más recientemente el Zika (ZIKV), han generado epidemias que han tenido gran impacto en la salud pública, y que han llevado a las autoridades sanitarias a ejercer un control estricto de las variables epidemiológicas que se van generando. En la actualidad, es claro que el principal mecanismo de transmisión de estos virus es mediante la picadura de mosquitos hematófagos del género *Aedes* infectados, sin embargo, los altos porcentajes de infecciones asintomáticas (10–12)y las elevadas viremias que éstas pueden desarrollar(15,17,18) son factores que pueden contribuir a que estos virus se transmitan a través de otras vías alternativas, entre estas, las infecciones transmitidas por transfusión sanguínea. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios encaminados en el análisis de la prevalencia de estos virus en donantes de sangre se han llevado a cabo en brotes de infección con estos virus, no obstante es plausible que estos virus puedan estar circulando también en DS en periodos endémicos de estos virus, por esto, el presente análisis pretende determinar la prevalencia e incidencia de arbovirus en DS, durante un periodo endémico de dengue en Colombia comprendido entre 2021 y 2022, en los cuales se notificaron 53.334 y 69.497 casos respectivamente (132,133).

4.2 Metodología

4.2.1 Recolección de muestras y consideraciones éticas

En el marco de un estudio observacional, analítico transversal, financiado por el Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (MinCiencias), bajo el contrato 898-2019 código: 130884467713, en Colombia, se recolectaron sueros de donantes de sangre (DS), que asistieron a los diferentes bancos de sangre que pertenecen a la red nacional de bancos de sangre de la Cruz Roja Colombiana y, estaban ubicados en las ciudades de Armenia (Banco de Sangre de Quindío), Bogotá (Banco Nacional de Sangre), Cali (Hemocentro Valle Del Cauca), Cartagena (Banco de Sangre Bolívar) Manizales (Hemocentro del Café) y Medellín (Banco de Sangre de Antioquia). Según los informes de la red Nacional de bancos de Sangre y Servicios de Transfusión vinculada al Instituto nacional de salud (INS), estos seis bancos de sangre representan el 7.3% de los 81 bancos de sangre existentes en el país, sin embargo, cuatro de estos (Medellín, Bogotá, Manizales y Cali), hacen parte de los bancos de sangre que recolectan más de 12.000 unidades de sangre por año y, por lo tanto, se consideran como

bancos de sangre de alta colecta. La distribución de muestras recolectadas en los seis bancos de sangre incluidos en este estudio se presenta en la tabla 1. El cálculo del tamaño de la muestra por ciudad fue realizado usando el programa Epidat v4.2 aplicando un ajuste de 10% por pérdida de muestras por hemólisis (tabla 1).

Tabla 1. Número de muestras recolectadas por los bancos de sangre incluidos en el estudio

Banco de Sangre	muestras recolectadas durante el año 2020	muestras incluidas en el estudio
Bogotá, Cundinamarca (Banco Nacional de Sangre)	23.388	244
Manizales, Caldas (Hemocentro del Café)	33.369	280
Armenia, Quindío (Banco de Sangre de Quindío)	5.864	72
Cali, Valle (Hemocentro Valle Del Cauca)	26.166	260
Cartagena, Bolivar (Banco de Sangre Bolívar)	6.409	60
Medellín. Antioquia (Banco de Sangre de Antioquia)	21.693	284
Total	118.910	1.200

Después de calcular el número de muestras (sueros provenientes de DS) que se iban a recolectar en el estudio (n =1.200), durante los años 2021-2022, se recolectaron sueros con un volumen aproximado de 1 mL por cada DS en cada uno de los bancos de sangre del estudio (tabla 1). Para esto, además de la donación regular, utilizando el mismo acceso venoso, se tomó una muestra de sangre total adicional de cada DS utilizando un tubo tapa amarilla de 7 mL; posteriormente, los sueros de las muestras se obtuvieron por centrifugación (3.500 rpm durante 10 minutos) y, se almacenaron en cada banco de sangre a una temperatura entre -20 y -30ºC. Posteriormente, estos sueros fueron enviados al Instituto de Virología de la Universidad el Bosque, donde se procesaron en un tiempo máximo de siete días a partir del momento de la recolección. Este estudio contó con aprobación por parte del comité de ética institucional de la Universidad el Bosque (acta 011-2019 del 16 de mayo de 2019).

4.2.2 Detección molecular de arbovirus en sueros provenientes de donantes de sangre

Una vez los sueros se recibían en el Instituto de Virología de la Universidad el Bosque, se alicuotaron y, un volumen de 200 µL de muestra fue utilizado para purificar el ARN viral utilizando el kit comercial DNA/RNA Virus Mini Kit (Stratec). Para el caso de los controles positivos, se utilizaron alícuotas de 200 µL de sobrenadantes de cultivo provenientes de células c6/36 infectadas con DENV y de células vero infectadas con ZIKV o CHIKV. Una vez purificado el ARN viral de los sueros o los sobrenadantes, éste fue amplificado utilizando un enfoque de RT-PCR Semi-Anidada múltiplex de un solo paso descrita previamente en el Instituto de Virología de la Universidad el Bosque (134). Brevemente, la primera ronda de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL utilizando el kit comercial Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR (NEB), se utilizaron 5 µL de plantilla de ARN (60-80 ng/µL) y 0.4 µM de cada uno de los primers (un total de seis primers); las temperaturas de amplificación fueron las siguientes: 15 min a 55°C, 3 min a 95°C, seguidos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C y 30 seg a 72°C durante 30 ciclos de amplificación y 5 min a 72°C.

La detección específica de los cuatro serotipos de DENV, ZIKV y CHIKV, se llevó a cabo en reacciones separadas con un volumen final de 20 µL, utilizando 2 µL de plantilla (proveniente de la primera ronda de amplificación), $MgCl_2$ a 3 mM, DNTPs a 0.4 mM y 0.2 *µ*M de cada primer; los tiempos de amplificación fueron los siguientes: 3 min a 95°C; 30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C (DENV y ZIKV) o 30 seg a 60°C (CHIKV); 30 seg a 72°C por 30 ciclos de amplificación y 5 min a 72°C. Finalmente, los productos fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

4.2.3 Análisis estadístico

El primer paso del análisis se enfocó en el cálculo de la prevalencia de las variables categóricas dicotómicas obtenidas (porcentaje de muestras positivas y negativas en la prueba de diagnóstico molecular aplicada para detectar arbovirus). El criterio para el cálculo de la prevalencia se describe a continuación:

$$Prevalencia = (Número\ de\ donantes\ positivos\ )/(Número\ de\ donantes\ tamizados\ )\ x\ 100$$

Posteriormente, se realizaron comparaciones de las prevalencias observadas entre DS que provenían de áreas endémicas y no endémicas para dengue en Colombia, utilizando la prueba

de Chi cuadrado y prueba exacta de Fisher según fuera pertinente, con ajuste para comparaciones múltiples por la prueba de Bonferroni ($p < 0.05$). Para esto, se considerarán como áreas no endémicas, lugares cuya ubicación geográfica se encuentre a alturas (metros sobre el nivel del mar, m.s.n.m.) superiores a 1.984 m.s.n.m.; mientras que las áreas endémicas, corresponderán a lugares que se encuentran a altitudes menores o iguales a los 1.984 m.s.n.m. Esta clasificación está basada en la altitud más alta (1.984 m.s.n.m.) en la que se han reportado vectores (*Aedes aegypti*) infectados con al menos un arbovirus en Colombia (135).

El cálculo de la tasa de incidencia de infecciones autolimitadas como las arbovirosis, es decir, infecciones que no son crónicas, implica establecer el tiempo de seguimiento de la población, para este caso, este tiempo se calculó teniendo en cuenta los días en los que se inició y finalizó la recolección de todas las muestras. Teniendo en cuenta esto, la fórmula aplicada para el cálculo de tasa de incidencia fue la siguiente:

$$Tasa\ de\ incidencia = \frac{Número\ de\ donantes\ positivos}{(número\ de\ donantes\ tamizados\ x\ meses\ de\ seguimiento)} x\ 1.000 donantes - mes$$

Las comparaciones de tasas de incidencia se realizaron mediante el método exacto de Poisson, y se reportan los valores *p* a dos colas utilizando el ajuste *p* medio(136); todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico STATA v16.

4.3 Resultados

4.3.1 Durante periodos endémicos de dengue, DENV, ZIKV y CHIKV circulan en donantes de sangre

Hasta el momento, no existen reportes publicados de prevalencias y/o incidencias de arbovirus en DS en Colombia durante periodos endémicos de dengue, por esto, el presente estudio buscó evaluar la prevalencia de estos virus en un periodo comprendido desde la semana epidemiológica (SE) 38 hasta la SE 49 de 2021 y, desde la SE 4 hasta la SE 32 de 2022. En este tiempo se recolectaron un total de 1.200 sueros de DS provenientes de seis bancos vinculados a la red nacional de bancos de sangre de la Cruz Roja Colombiana (Tabla 1), y del total de sueros recolectados, se analizaron 1.119 muestras. En estos, se detectó ARN de DENV, ZIKV y CHIKV (Anexo 1), en un total de 59 sueros, lo que representó una prevalencia

de arbovirus del 5,3% y una tasa de incidencia de 5,6 donantes por cada mil donantes mes (DMDM). Entre estos arbovirus, la prevalencia de CHIKV representó el mayor número de muestras positivas de DS (37/1.119), estás, representaron una prevalencia del 3,3%, seguida por una prevalencia del 1,9% (21/1.119) y del 0.3% (3/1.119) para DENV y ZIKV respectivamente (Figura 1).

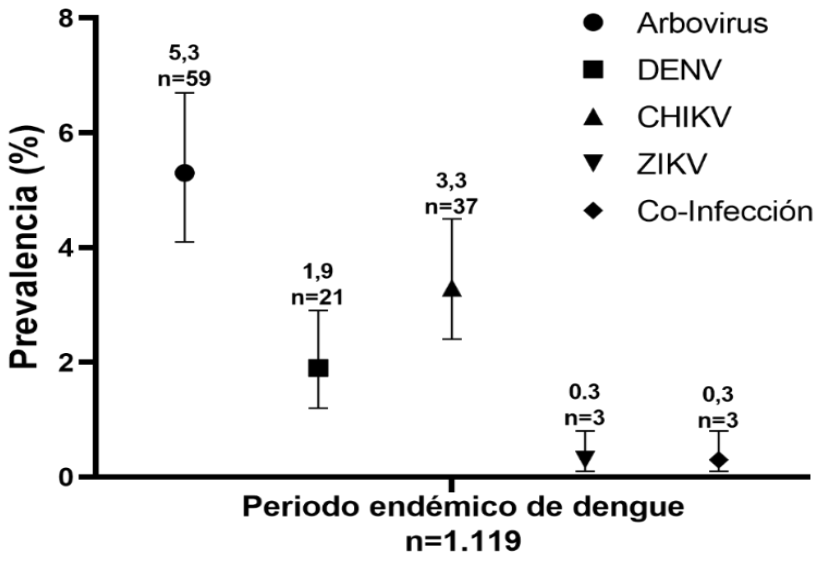


Figura 1. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre durante un periodo endémico de dengue. *Los resultados se presentan como prevalencias (en porcentajes) e intervalo de confianza al 95%.*

Posteriormente, también se evaluó la tasa de incidencia de estos virus por separado. Al igual que la prevalencia de CHIKV en DS, la tasa de incidencia de CHIKV en DS fue la más alta entre los tres virus y, representó 4,1 DMDM mientras que las tasas de incidencia de DENV y ZIKV representaron 2,3 y 0,3 DMDM respectivamente (Figura 2). De manera interesante, además de las infecciones sencillas por un arbovirus del estudio (DENV, ZIKV o CHIKV), se detectaron coinfecciones en los DS, que representaron una prevalencia del 0,3% (3/1.119). Al analizar los arbovirus que integraban estas 3 coinfecciones, se encontraron coinfecciones entre DENV-1/CHIKV, DENV-1/DENV-2 y ZIKV/CHIKV. En conjunto, estos resultados sugieren una circulación de DENV, ZIKV y CHIKV en DS durante un periodo endémico de dengue, e inclusive, coinfecciones de estos virus en DS.

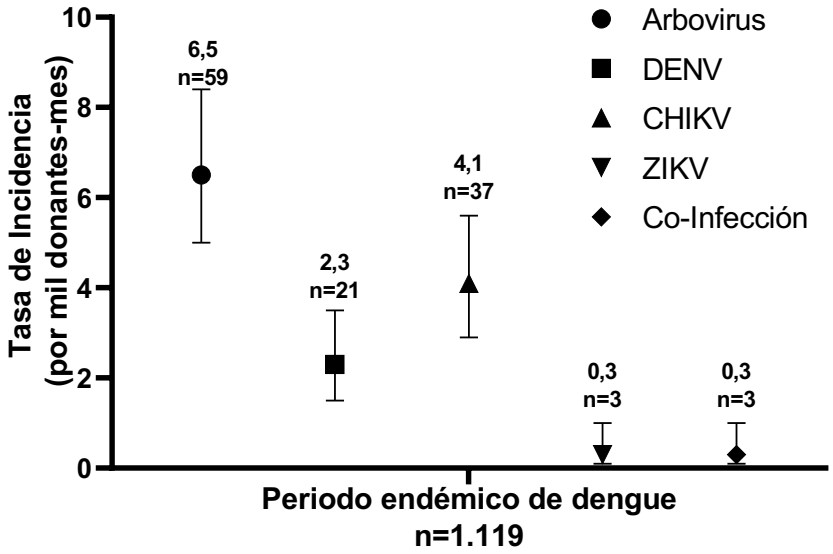


Figura 2. Tasas de Incidencias de arbovirus en donantes de sangre durante un periodo endémico de dengue. *Los resultados se presentan como tasas de incidencia por mil donantes-mes e intervalo de confianza al 95%. Para el cálculo de las tasas de incidencia se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 8,06 meses y 1.119 muestras para un cálculo de persona tiempo de 9.019 donantes-mes.*

4.3.2 Las prevalencias e incidencias de arbovirus son similares en áreas endémicas y no endémicas para dengue

El hallazgo de estos virus en DS durante un periodo endémico de dengue en Colombia, planteó la necesidad de analizar si las prevalencias de estos arbovirus se mantenían en áreas endémicas y no endémicas del país, es decir, en áreas cuya ubicación geográfica se encuentre a una altitud superior a los 1.984 m s.n.m, que es la altitud más elevada en la que se han reportado mosquitos (*Aedes aegypti*) infectados con DENV en Colombia(135). Para esto, separamos los DS en dos grupos, según hubiesen realizado la donación en áreas endémicas (≤ 1.984 m s.n.m) o no endémicas del país (>1.984 m s.n.m); este análisis indicó que 695 DS provenían de áreas endémicas y 424 DS provenían de áreas no endémicas. En áreas endémicas se detectaron 38 muestras de DS positivas para arbovirus, lo cual representó una prevalencia del 5,5% (38/695); al separar estas muestras positivas por arbovirus (DENV, ZIKV o CHIKV), se identificó una prevalencia de CHIKV del 3,5% (24/695), siendo este el más prevalente, seguido de DENV y ZIKV con prevalencias del 2% (14/695) y 0,1% (1/695) respectivamente. Por otro lado, en áreas no endémicas, la prevalencia de arbovirus en DS represento el 5% (21/424) de las muestras analizadas; al igual que en las áreas endémicas, la

prevalencia de CHIKV fue la más alta, siendo de 3,1% (13/424), mientras que las prevalencias de DENV y ZIKV representaron un 1,7% (7/424) y un 0.5% (2/424), respectivamente. Adicionalmente, encontramos coinfecciones en los dos grupos de DS; en áreas endémicas, estas representaron una prevalencia del 0,3% (2/695) y en áreas no endémicas del 0,2% (1/424). Interesantemente, las prevalencias encontradas en los dos grupos no fueron significativamente distintas (Figura 3). En conjunto, estos resultados sugieren una circulación de estos virus y coinfecciones en DS provenientes de áreas endémicas y no endémicas para dengue en proporciones similares, durante un periodo endémico de dengue.

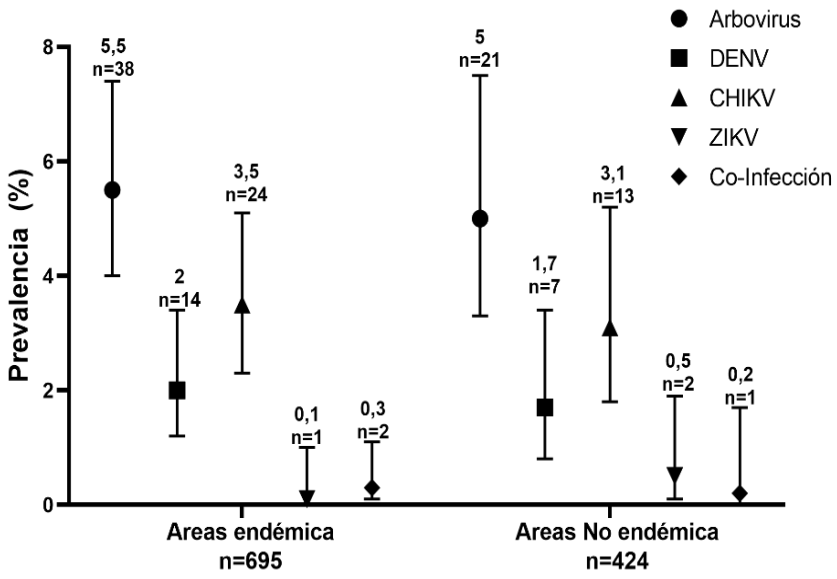


Figura 3. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas de Colombia. *Los resultados se presentan como prevalencias (en porcentajes) e intervalo de confianza al 95%.*

Posteriormente, también se analizaron las tasas de incidencia en los dos grupos (áreas endémicas y no endémicas). En estos grupos, las tasas de incidencia de arbovirus representaron 6,7 y 6,1 DMDM en áreas endémicas y no endémicas respectivamente; al igual que las prevalencias reportadas previamente en estos dos grupos, las tasas de incidencia de CHIKV fueron las más altas y, representaron 4,2 y 3,8 DMDM en áreas endémicas y no endémicas respectivamente. Las tasas de incidencia de DENV, ZIKV y de coinfecciones de estos dos grupos se presentan en la figura 4. Al realizar comparaciones de las tasas de incidencia de estos virus encontradas en los dos grupos, no encontramos diferencias significativas, lo que sugiere que las tasas de incidencia para estos virus son similares en DS de áreas endémicas y no endémicas durante un periodo endémico de dengue.

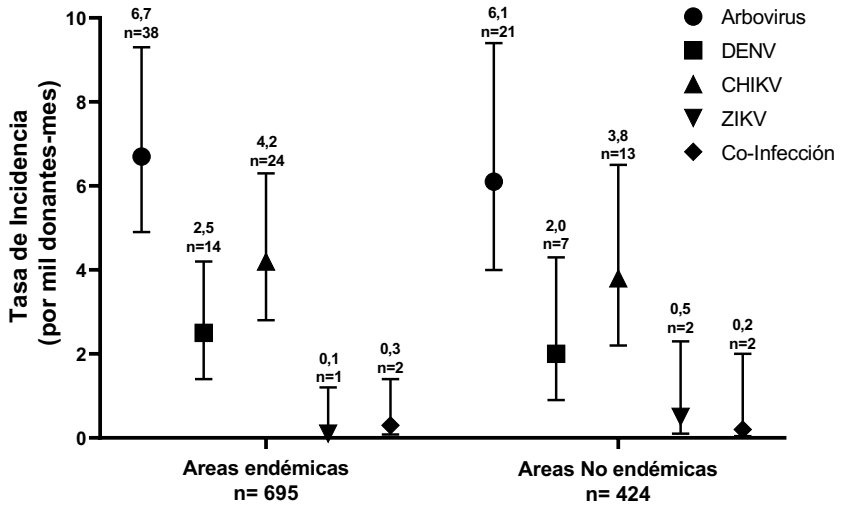


Figura 4. Tasas de Incidencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas durante un periodo endémico de dengue. *Los resultados se presentan como tasas de incidencia por mil donantes-mes e intervalo de confianza al 95%. Para el cálculo de las tasas de incidencia en áreas endémicas se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 8,06 meses y 695 muestras para un cálculo de persona tiempo de 5.6017 donantes-mes. Para el cálculo de las tasas de incidencia en áreas no endémicas, se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 8,06 meses y 424 muestras para un cálculo de persona tiempo de 3.4174 donantes-mes.*

4.3.3 Los serotipos 1 y 2 de DENV circulan en donantes de sangre

Teniendo en cuenta que Colombia es un país hiperendémico para dengue, en tanto circulan los cuatro serotipos de este virus(31), se realizó un análisis de la circulación de cada uno de los serotipos de DENV en DS para identificar si la circulación de estos serotipos es similar a la reportada. Con este análisis, se identificaron prevalencias de DENV-2 del 1,4% (16/1.119) y de DENV-1 de 0,5 (6/1.119), lo que sugiere una circulación de dos serotipos de DENV en DS (DENV-1 y DENV-2), siendo DENV-2 el más prevalente. Ahora bien, también realizamos un análisis de la circulación de estos serotipos en DS de áreas endémicas y no endémicas; de igual forma, en estos grupos DENV-2 fue el más prevalente y representó una prevalencia del 1,6% y 1,2% en DS de áreas endémicas y no endémicas respectivamente, mientras que DENV-1 representó una prevalencia de 0,6% y 0,5% en estos dos grupos (Figura 5). Las prevalencias de estos serotipos no fueron significativamente distintas, lo que sugiere que, en áreas endémicas y no endémicas del país, DENV-2 y DENV-1 circulan en proporciones similares en DS.

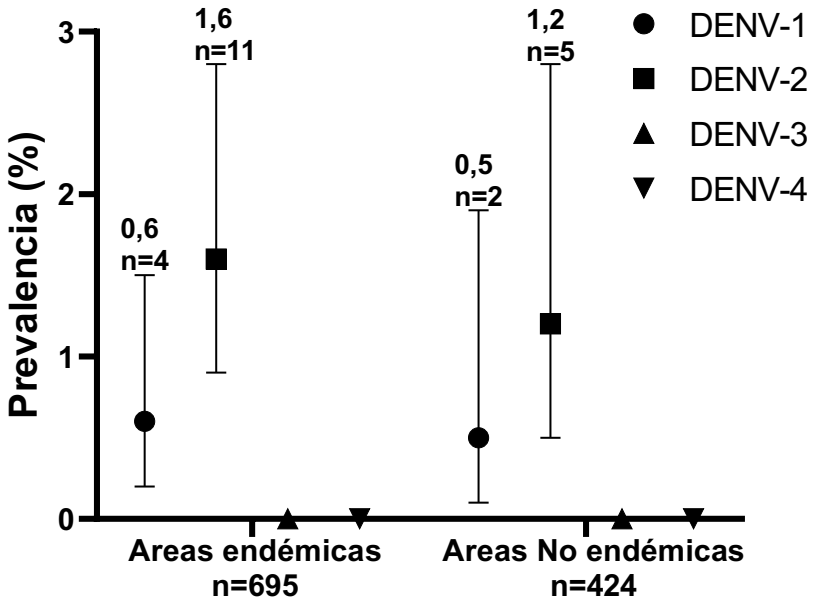


Figura 5. Prevalencias de serotipos de DENV en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas de Colombia. *Los resultados se presentan como prevalencias (en porcentajes) e intervalo de confianza al 95%.*

4.3.4 Las prevalencias más altas de arbovirus en donantes de sangre se encuentran en Cali y Manizales

Aunque los análisis de los grupos de DS provenientes de áreas endémicas y no endémicas sugirieron una circulación de estos virus durante periodos endémicos de dengue, los bancos de sangre que integraban estos grupos estaban ubicados en lugares distintos del país: el grupo de áreas endémicas estaba integrado por los bancos de sangre de Armenia, Cali, Cartagena y Medellín, mientras que el grupo de áreas no endémicas estaba integrado por los bancos de sangre de Bogotá y Manizales. En este sentido, la ubicación geográfica distinta de estos bancos de sangre en el país planteó la necesidad de analizar la prevalencia de arbovirus en DS de cada uno de estos bancos de sangre. Este análisis indicó una prevalencia de arbovirus del 6,8% (16/235) en la ciudad de Cali (Hemocentro Valle del Cauca), siendo ésta la más prevalente seguida de Manizales, en la que se evidenció una prevalencia del 6,6% (17/256) (Tabla 2). Interesantemente, en una de las ciudades endémicas del estudio (Armenia, Banco de

sangre de Quindío), no se encontraron muestras positivas para arbovirus. En conjunto, estos resultados siguieren la circulación de estos virus en DS en la mayoría (5/6) de bancos de sangre del estudio en un periodo endémico de dengue.

Tabla 2. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes las ciudades incluidas el estudio

Periodo endémico de dengue 2021-2022 n= 1.119												
Variable	Armenia n=42		Cali n=235		Cartagena n=86		Medellín n=239		Bogotá n=261		Manizales n=256	
	No. Muestras Positivas	Prevalencia (IC 95%)	No. Muestras Positivas	Prevalencia (IC 95%)	No. Muestras Positivas	Prevalencia (IC 95%)	No. Muestras Positivas	Prevalencia (IC 95%)	No. Muestras Positivas	Prevalencia (IC 95%)	No. Muestras Positivas	Prevalencia (IC 95%)
Arbovirus	0	0	16	6,8(4,2-10,8)	2	2,3(0,6-8,8)	12	5(2,9-8,6)	12	4,6(2,6-7,9)	17	6,6(4,2-10,4)
DENV	0	0	5	2,1(0,9-5,0)	0	0	6	2,5(1,1-5,5)	5	1,9(0,8-4,5)	5	2(0,8-4,6)
DENV-1	0	0	1	0,4(0,1-3,0)	0	0	3	1,3(0,4-3,8)	2	0,8(0,2-3)	0	0
DENV-2	0	0	4	1,7(0,6-4,5)	0	0	4	1,7(0,6-4,4)	3	1,7(0,6-4,5)	5	2(0,8-4,6)
DENV-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DENV-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZIKV	0	0	1	0,4(0,1-3,0)	0	0	0	0	1	0,4(0,1-3,1)	1	0,4(0,1-2,7)
CHIKV	0	0	10	4,3(2,3-7,7)	2	2,3(0,6-8,8)	7	2,9(1,4-6)	6	2,3(1,1-5,0)	12	4,7(2,7-8,1)
Co-Infección	0	0	0	0	0	0	2	0,8 (0,2-3,3)	0	0	1	0,4 (0,1-2,7)

DENV: dengue virus, ZIKV: Zika virus, CHIKV: chikungunya virus

4.4 Discusión

En este estudio, por primera vez en Colombia, durante un periodo endémico de dengue (2021-2022), en donde los casos reportados son menores a los que se reportan en los brotes, se tamizaron sueros de DS para arbovirus de interés en la salud pública del país, mediante el uso de una RT-PCR Semi-Anidada de un solo paso previamente estandarizada en el laboratorio (134). Durante el periodo analizado se detectaron en DS todos los virus que incluyó el estudio, es decir, DENV, CHIKV y ZIKV, que representaron prevalencias globales del 1,9%, 3,3% y 0,3% respectivamente. Estos resultados representan prevalencias altas de estos virus en DS de Colombia, en comparación con otras prevalencias de arbovirus reportadas durante periodos endémicos en otros países, en donde las prevalencias se encuentran alrededor del 0,001% (137). Diversos estudios retrospectivos en los cuales se reportan prevalencias bajas de DENV en DS, se caracterizan por utilizar muestras congeladas a temperaturas de -80°C o inferiores (122,138–140), sin embargo, existe evidencia acerca de la degradación de RNA viral proveniente de sueros cuando estas muestras se congelan a temperaturas inferiores a los -70°C (141,142). En el contexto de este estudio, es plausible pensar que una de las razones para explicar las altas prevalencias aquí reportadas pueda estar atribuida al hecho de que los sueros utilizados en este estudio no fueron congelados a estas temperaturas antes del análisis, además, el procesamiento de los sueros de los donantes de sangre (en un plazo máximo de siete días tras la recogida) también fue un factor que garantizó la buena calidad de la muestra

en el momento de la purificación del ARN a partir de los sueros. Por otro lado, también se ha descrito que la técnica de RT-PCR Semi-Anidada (utilizado aquí para la detección de virus en sueros de donantes) es más sensible que otros métodos como la PCR y la PCR en tiempo real (143–146), por lo tanto, la mayor sensibilidad proporcionada por el enfoque de RT-PCR Semi-Anidada podría ser otra razón para explicar las altas prevalencias informadas aquí.

Aunque los casos sintomáticos de CHIKV y ZIKV reportados por el INS en el país durante el periodo de estudio (2021-2022) sumaron 288 (147,148) y 239(149,150) respectivamente, lo cual que representa un número bajo de reportes, en comparación con otras infecciones arbovirales como dengue que sumaron 122.831 de casos sintomáticos notificados en el mismo periodo de estudio (132,133). Algo para resaltar es que más del 40% de estos casos notificados de dengue no fueron confirmados por técnicas de laboratorio; estos casos no confirmados fueron registrados como casos probables de dengue o casos confirmados por vinculación epidemiológica (147,148). Teniendo en cuenta que existen síntomas inespecíficos que pueden presentarse en infecciones por DENV, ZIKV o CHIKV, como malestar general, dolor de cabeza y artralgias/mialgias(151), es plausible que las altas prevalencias de ZIKV y CHIKV en DS podrían significar una sobreestimación de los casos de dengue (particularmente los casos que no están confirmados por laboratorio) y, por tanto, una subestimación de los casos reportados de ZIKV y CHIKV en el país, ya que existe la posibilidad de que una parte de los casos probables de DENV puedan ser casos de infecciones por ZIKV o CHIKV, sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

Es claro que, en áreas no endémicas, las infecciones por arbovirus se explican mayoritariamente por individuos provenientes de áreas o ciudades donde estos virus son endémicos (152), de hecho, en ciudades no endémicas de Colombia se han reportado casos con sospecha de infección por arbovirus distintos al DENV, como ZIKV y CHIKV(31,153), cuya infección había sido adquirida en los municipios o localidades aledañas al área no endémica donde residían los infectados. La movilización por períodos cortos de tiempo de la población residente en ciudades no endémicas hacia ciudades o municipios endémicos para arbovirus puede ser una explicación para las prevalencias de DENV, ZIKV y CHIKV en DS encontrados en ciudades no endémicas.

4.5 Conclusión

En conclusión, por primera vez en Colombia, se identificaron altas prevalencias y tasas de incidencias de DENV, ZIKV, CHIKV y Coinfecciones en DS durante un periodo endémico de

dengue, adicionalmente, estos virus circulan en áreas endémicas y no endémicas del país en proporciones similares, por otro lado, también se identificó la presencia de los serotipos 1 y 2 de DENV en DS, siendo el serotipo 2 el más prevalente en DS. El diseño transversal del estudio, la sensibilidad de la técnica de tamizaje molecular utilizada y el estado de hiperendemicidad constante de arbovirus en el país son factores que pudieron favorecer la detección de estos virus en sueros de DS, Inclusive en áreas no endémicas. En conjunto, estos resultados pretenden sentar las bases que contribuyan a un estudio más profundo sobre el riesgo que estos virus pueden representar en la seguridad transfusional del país.

5 CAPÍTULO 2: COMPARACIÓN DEL RIESGO RESIDUAL DE ARBOVIRUS EN DONANTES DE SANGRE DURANTE DOS MOMENTOS EPIDEMIOLÓGICOS DISTINTOS

5.1 Introducción

En Colombia, arbovirus de importancia en salud pública como DENV, ZIKV y CHIKV, no se tamizan de manera rutinaria en bancos de sangre, ni siquiera durante los periodos de brote, en donde el número de casos que se reportan puede aumentar hasta un 58,6% en comparación con el número que se reporta en periodos endémicos(132). Aunque las proporciones en las que circulan estos virus en brotes y en periodos endémicos están ampliamente descritas en la población, es poca la información que existe en donantes de sangre (DS), hasta el momento, no hay reportes en los que se comparen las proporciones en las que circulan estos virus durante brotes y periodos endémicos en DS, ni tampoco estimaciones del riesgo que estos arbovirus pueden representar durante estos periodos, en este sentido, este capítulo tuvo por objetivo estimar y comparar las prevalencias, tasas de incidencia y riesgo residual de infecciones por arbovirus en DS durante un brote y un periodo endémico de dengue.

5.2 Metodología

5.2.1 Comparación de prevalencias, tasas de incidencia y riesgos residuales de arbovirus durante un brote y un periodo endémico de dengue

En el marco de un estudio analítico transversal realizado en el Instituto de Virología de la Universidad el Bosque, financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad el

Bosque (proyecto de convocatoria interna, 2018-2019), se recolectaron sueros de donantes de sangre (DS), que asistieron a los diferentes bancos de sangre que pertenecen a la red nacional de bancos de sangre de la Cruz Roja Colombiana y, estaban ubicados en las ciudades de Armenia (Banco de Sangre de Quindío), Bogotá (Banco Nacional de Sangre), Cali (Hemocentro Valle Del Cauca), Cartagena (Banco de Sangre Bolívar) Manizales (Hemocentro del Café) y Medellín (Banco de Sangre de Antioquia). Aunque el desarrollo experimental de este proyecto no se realizó en el marco del presente trabajo, éste hace parte de un trabajo de grado previo titulado "Análisis de la prevalencia de dengue, Zika y chikungunya en donantes provenientes de la red nacional de bancos de sangre de la cruz roja colombiana"(154); el uso y análisis de los resultados obtenidos en este proyecto fue autorizado por los autores del trabajo y serán utilizados para comparar las prevalencias, tasas de incidencia y riesgo residual (RR) obtenidas en el capítulo 1. El número de sueros que se recolectaron en cada banco de sangre se presentan en la tabla 3. La recolección, procesamiento y detección de arbovirus a partir de estos sueros se realizó en las mismas condiciones descritas en el capítulo 1.

Tabla 3. Número de muestras recolectadas en cada banco de sangre durante los años 2019-2020

Banco de Sangre	muestras recolectadas durante el año 2017	muestras recolectadas
Bogotá, Cundinamarca (Banco Nacional de Sangre)	26.730	87
Manizales, Caldas (Hemocentro del Café)	24.894	130
Armenia, Quindío (Banco de Sangre de Quindío)	5.678	26
Cali, Valle (Hemocentro Valle Del Cauca)	26.961	125
Cartagena, Bolivar (Banco de Sangre Bolívar)	6.987	17
Medellín. Antioquia (Banco de Sangre de Antioquia)	23.388	77
Total	114.638	462

5.2.2 Encuesta realizada a los donantes de sangre positivos para arbovirus

Durante los dos estudios transversales (el primero realizado durante un brote de dengue y el segundo durante un periodo endémico de dengue), dos semanas después de la donación, un profesional sanitario se puso en contacto (vía telefónica) con todos los donantes que dieron positivo para al menos uno de los virus del estudio, esto, con el objetivo de obtener información sobre sus características sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas.

5.2.3 Análisis estadístico

El riesgo residual (RR), definido como la probabilidad de liberar una donación potencialmente infecciosa, atribuida predominantemente a los DS infectados que se encuentran en periodo de ventana, se calculó de la siguiente manera:

$$Riesgo\ Residual = Incidencia\ x\ periodo\ de\ ventana$$

Se consideraron 7 días como el periodo de ventana (PV) de estas arbovirosis, ya que representa un valor promedio del PV de infecciones por DENV, ZIKV y CHIKV (155–157). Las comparaciones de tasas de incidencia y RR se realizaron mediante el método exacto de Poisson, y se reportan los valores *p* a dos colas utilizando el ajuste *p* medio(136); todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico STATA v16.

5.3 Resultados

5.3.1 Las prevalencias y tasas de incidencia de arbovirus en donantes de sangre fueron más altas durante el brote de dengue, en comparación con el periodo endémico

Hasta la fecha, no existen reportes que comparen prevalencias de arbovirus en DS durante periodos de brote y periodos endémicos de estos virus en Colombia. Un estudio previo realizado en el Instituto de Virología de la Universidad el Bosque, encaminado a identificar las prevalencias de estos virus durante un brote de dengue en Colombia(154), nos permitió (bajo el consentimiento de los autores) realizar estas comparaciones ya que las muestras habían sido recolectadas en los mismos bancos de sangre y, se utilizaron las mismas pruebas de detección molecular para la búsqueda de estos virus en sueros de DS. Durante este estudio, entre las SE 48 de 2019 y 7 de 2020, se tamizaron arbovirus en un total de 462 sueros, de estos, se detectaron arbovirus en 116, lo que representó una prevalencia del 25,1%. Al realizar los análisis de prevalencia de cada uno de los virus del estudio (DENV, ZIKV y CHIKV), se

identificaron prevalencias de DENV del 14,5% (67/462) y prevalencias similares de ZIKV y CHIKV que representaron el 7,8% (36/462) y el 8% (37/462) respectivamente. A diferencia del periodo endémico de dengue en Colombia en donde solo se detectaron dos serotipos de DENV, durante el brote de dengue se detectaron los cuatro serotipos, siento los serotipos uno y dos los más prevalentes; la descripción detallada de estas prevalencias de agrupa en la tabla 4.

Tabla 4. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre durante el brote y el periodo endémico de dengue

Variable	Brote de dengue 2019-2020 n=462			Periodo endémico de dengue 2021-2022 n=1.119			*p*
	No. muestras positivas	Prevalencia (%)	IC 95%	No. muestras positivas	Prevalencia (%)	IC 95%	
Arbovirus	116	25,1	21,4-29,3	59	5,3	4,1-6,7	0,0001†
DENV	67	14,5	11,6-18	21	1,9	1,2-2,9	0,0001†
DENV-1	28	6	4,2-8,6	6	0,5	0,2-1,2	0,0001†
DENV-2	33	7,1	5,1-9,9	16	1,4	0,9-2,3	0,0001†
DENV-3	6	1,3	0,6-2,9	0	0	0	0,001*
DENV-4	3	0,6	0,2-2	0	0	0	0,025*
ZIKV	36	7,8	5,7-10,6	3	0,3	0,1-0,8	0,0001†
CHIKV	37	8	5,9-10,9	37	3,3	2,4-4,5	0,000†
Co-Infección	20	4,3	2,8-6,6	3	0,3	0,1-0,8	0,0001†

DENV: dengue virus, ZIKV: Zika virus, CHIKV: chikungunya virus.
IC: Intervalo de Confianza, †: Prueba de Chi-cuadrado, prueba de Bonferroni para comparaciones multiples. *:Prueba exacta de Fisher, prueba de Bonferroni para comparaciones multiples.

De la misma forma que en el análisis del periodo endémico de dengue, durante el brote también se identificaron coinfecciones de DS, sin embargo, en proporciones mayores y con un mayor número de virus en algunas coinfecciones, en las que se detectaron hasta cuatro virus (DENV-1/DENV-2/ZIKV y CHIKV) en un mismo DS (Tabla 5 y Anexo). En conjunto estos resultados sugieren una circulación simultánea de DENV, ZIKV y CHIKV en DS durante un brote de dengue, en donde la prevalencia de DENV en DS es más alta en comparación con las de ZIKV y CHIKV.

Tabla 5. Virus que integraron las coinfecciones en donantes de sangre durante el brote de dengue.

Co-infecciones	Brote de dengue 2019-2020 n=462				
	Armenia	Cali	Cartagena	Medellín	Manizales
DENV-1/CHIKV	1	0	0	1	1
DENV-2/ZIKV	1	1	0	0	0
DENV-1/DENV-2	0	1	0	0	0
DENV-1/ZIKV	0	2	0	0	1
DENV-2/CHIKV	0	0	1	0	0
ZIKV/CHIKV	0	0	1	3	0
DENV-2/ZIKV/CHIKV	1	0	0	0	0
DENV-1/DENV-3/CHIKV	0	1	0	0	0
DENV-3/ZIKV/CHIKV	0	0	2	0	0
DENV-1/ZIKV/CHIKV	1	0	0	0	0
DENV-1/DENV-2/ZIKV/CHIKV	0	0	1	0	0
TOTAL	**4**	**5**	**5**	**4**	**2**

La circulación de arbovirus en DS durante periodos de brote y endémicos para dengue, planteó la necesidad de identificar si existían diferencias en las prevalencias de DENV, ZIKV y CHIKV en estos dos periodos y, por lo tanto, identificar si seguían el mismo comportamiento de la población general, en donde el número de casos es significativamente mayor durante los brotes de estos virus en comparación a los periodos endémicos. Al realizar este análisis se identificaron en DS prevalencias de DENV, ZIKV, CHIKV y Coinfecciones significativamente mayores durante el brote, en comparación con el periodo endémico de dengue (Figura 6 y Tabla 5).

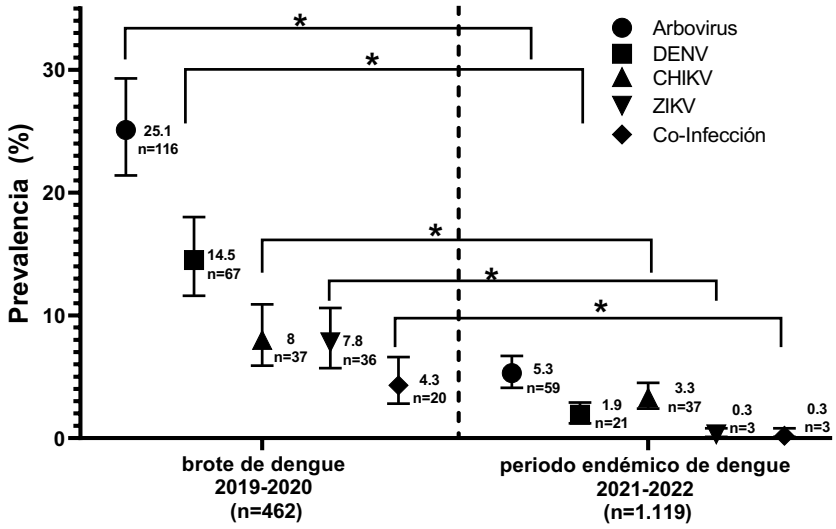


Figura 6. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre durante un brote, y un periodo endémico de dengue. *Los resultados se presentan como prevalencias (en porcentajes) e intervalo de confianza al 95%. * p <0.05, la comparación de las prevalencias de arbovirus en donantes de sangre se realizo utilizando la prueba de Chi-cuadrado o Exacta de Fisher con ajuste de prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples según fuera pertinente.*

Posteriormente, también se analizaron las tasas de incidencia que estos arbovirus podrían representar en DS durante un brote de dengue; estas tasas de incidencia de arbovirus representaron hasta 104,6 DMDM y, entre los virus del estudio, DENV representó la tasa de incidencia más alta (60,4 DMDM). Ahora bien, al comparar estas tasas de incidencias con las obtenidas durante el periodo endémico de dengue (descritas en el Capítulo 1), se evidenciaron (de la misma forma que en los análisis de prevalencias) diferencias significativas en todas las tasas de incidencia de arbovirus obtenidas en el brote, respecto a las obtenidas en el periodo endémico de dengue (Figura 7).

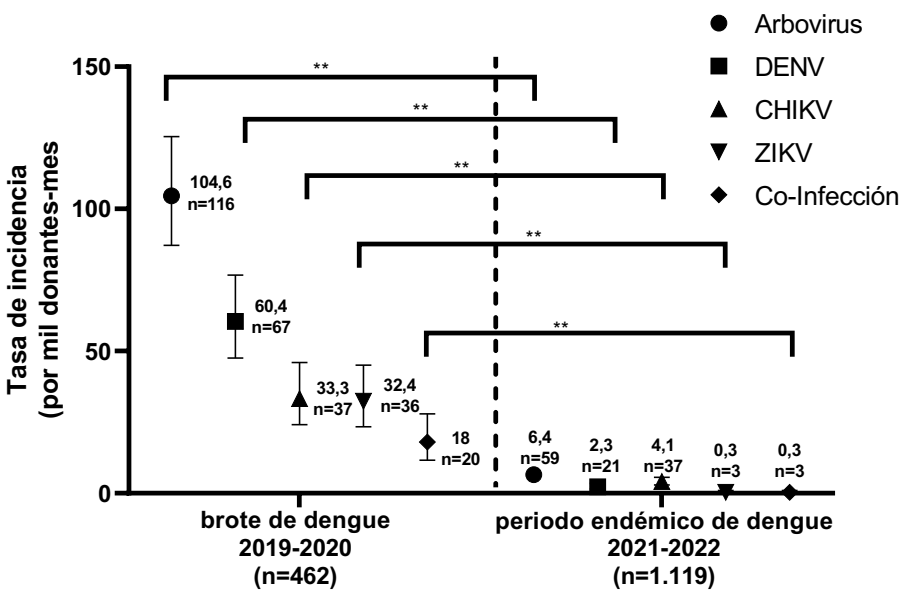


Figura 7. Tasas de Incidencias de arbovirus en donantes de sangre durante un brote y un periodo endémico de dengue en Colombia. *Los resultados se presentan como tasas de incidencia por mil donantes-mes e intervalo de confianza al 95%. Para el cálculo de las tasas de incidencia en el brote de dengue se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 2,4 meses y 462 muestras para un cálculo de persona tiempo de 1.109 donantes-mes. Para el cálculo de las tasas de incidencia en el periodo endémico de dengue, se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 8,06 meses y 1.119 muestras para un cálculo de persona tiempo de 9.019 donantes-mes, ** p <0.0001.*

5.3.2 En áreas no endémicas, las prevalencias y tasas de incidencia de chikungunya y coinfecciones fueron similares durante el brote y el periodo endémico de dengue

Aunque los dos estudios encaminados a identificar arbovirus en sueros de DS, se realizaron en dos momentos epidemiológicos diferentes, uno durante un brote de dengue (2019-2021, n= 462) y otro durante un periodo endémico de dengue (2021-2022, n=1.119), las muestras de estos dos estudios fueron colectadas además en áreas endémicas (≤ 1.984 m s.n.m) y no endémicas (>1.984 m s.n.m) del país; esto planteó la necesidad de analizar las prevalencias y tasas de incidencia en estas áreas durante el brote y el periodo endémico de dengue. Para esto, se dividió en cuatro grupos la población total de DS (n=1.581), incluidas en los dos estudios, según hubiesen realizado la donación en áreas endémicas o no endémicas durante el brote (grupos uno y dos) o el periodo endémico de dengue (grupos tres y cuatro). En este análisis se evidencio que, durante el brote de dengue, 297 DS provenían de áreas endémicas y 165 DS provenían de áreas no endémicas, mientras que, durante el periodo endémico de dengue, 695 DS provenían de áreas endémicas y 425 de áreas no endémicas. Durante el brote

de dengue en áreas endémicas, DENV y CHIKV representaron las prevalencias más altas, estas fueron equivalentes al 16,8% (50/297) y 12,1% (36/297) respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas durante un brote de dengue.

Variable	Brote de dengue 2019-2020 n=462						p
	Áreas endémicas n=297			Áreas No-endémicas n= 165			
	No. Muestras Positivas	Prevalencia (%)	IC 95%	No. Muestras Positivas	Prevalencia (%)	IC 95%	
Arbovirus	90	30,3	25,3-35,8	26	15,8	11,0-22,1	0,0001[£]
DENV	50	16,8	13,0-21,5	17	10,3	6,5-16,6	0,015[£]
DENV-1	24	8,1	5,5-11,8	4	2,4	0,9-6,3	0,0001[£]
DENV-2	24	8,1	5,5-11,8	9	5,5	2,9-10,2	0,689[£]
DENV-3	4	1,3	0,3-4,7	2	1,2	0,3-4,7	1[$]
DENV-4	1	0,3	0-2,4	2	1,2	0,3-4,7	0,228[$]
ZIKV	28	9,4	6,6-13,3	8	4,8	2,4-9,4	0,011[£]
CHIKV	36	12,1	8,9-16,4	1	0,6	0,1-4,2	0,0001[£]
Co-Infección	20	6,7	4,4-10,2	0	0	0	0,0001[£]

DENV: dengue virus, ZIKV: Zika virus, CHIKV: chikungunya virus.
IC: Intervalo de Confianza, †: Prueba de Chi-cuadrado, prueba de Bonferroni para comparaciones multiples. *:Prueba exacta de Fisher, prueba de Bonferroni para comparaciones multiples.

Por otro lado, en áreas no endémicas durante el brote de dengue, DENV y ZIKV representaron las prevalencias más altas, que fueron equivalentes al 10,3% (17/65) y 4,8% (8/165) respectivamente (Tabla 6). Aunque las prevalencias de arbovirus en DS de áreas endémicas durante el brote fueron significativamente mayores a las observadas en el periodo endémico de dengue (Figura 8), interesantemente, en áreas no endémicas, las prevalencias de CHIKV y Coinfecciones fueron similares (Figura 8), en conjunto estos resultados sugieren que la circulación de estos virus en DS de áreas endémicas es mayor en brotes de dengue, en comparación con periodos que son endémicos, por otro lado, en áreas no endémicas, la circulación de arbovirus como CHIKV es similar durante brotes y periodos endémicos de dengue.

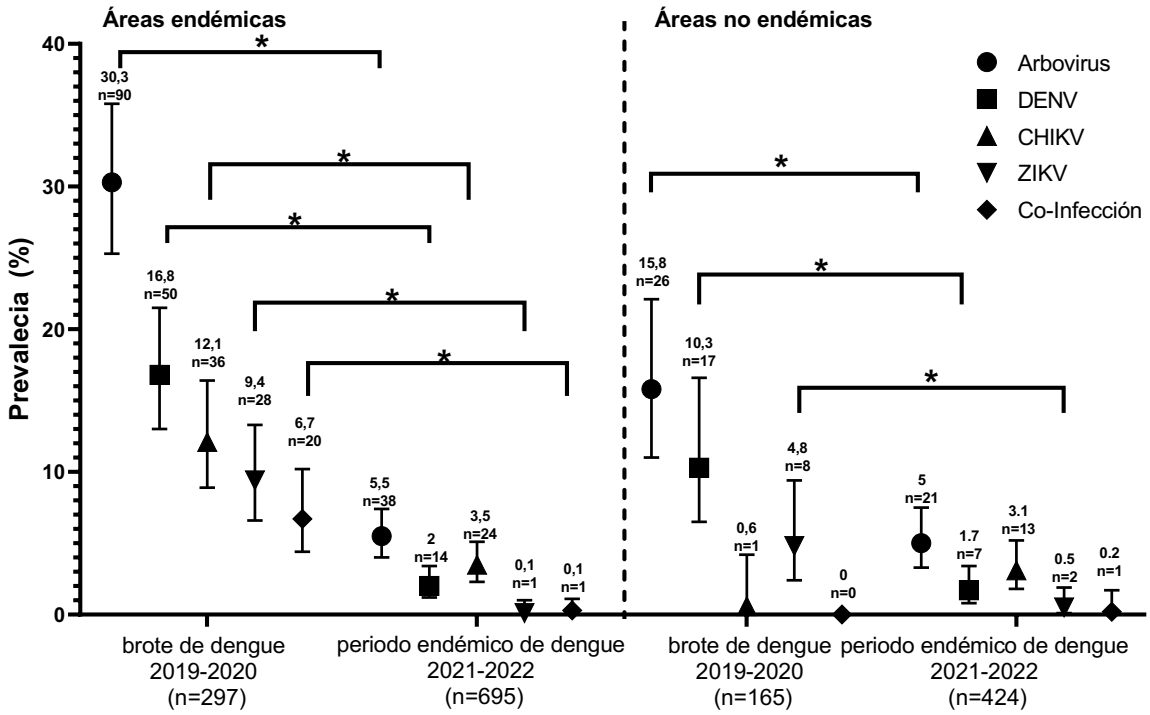


Figura 8. Prevalencias de arbovirus en donantes de sangre provenientes de áreas endémicas y no endémicas durante un brote, y un periodo endémico de dengue en Colombia. *Los resultados se presentan como prevalencias (en porcentajes) e intervalo de confianza al 95%. * p <0.05, la comparación de las prevalencias de arbovirus en donantes de sangre se realizó utilizando la prueba de Chi-cuadrado o Exacta de Fisher con ajuste de prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples según fuera pertinente.*

Ahora bien, los análisis de tasas de incidencias de arbovirus en los cuatro grupos previamente descritos, mostraron que las tasas de incidencia de DENV en DS de áreas endémicas durante el brote de dengue, pueden representar hasta 70,1 DMDM y, tasas de incidencia de ZIKV y CHIKV de hasta 39,2 y 50,5 DMDM respectivamente, siendo estas significativamente mayores respecto a las que se encuentran en periodos endémicos de dengue (Figura 9); de forma similar a los análisis de prevalencia, en DS de áreas no endémicas, las tasas de incidencia de CHIKV y coinfecciones, fueron similares durante el brote y el periodo endémico de dengue (Figura 9), esto, sugiere que las tasas de incidencia (al igual que la prevalencia) de algunos arbovirus podrían mantenerse en magnitudes similares durante brotes y periodos endémicos de dengue.

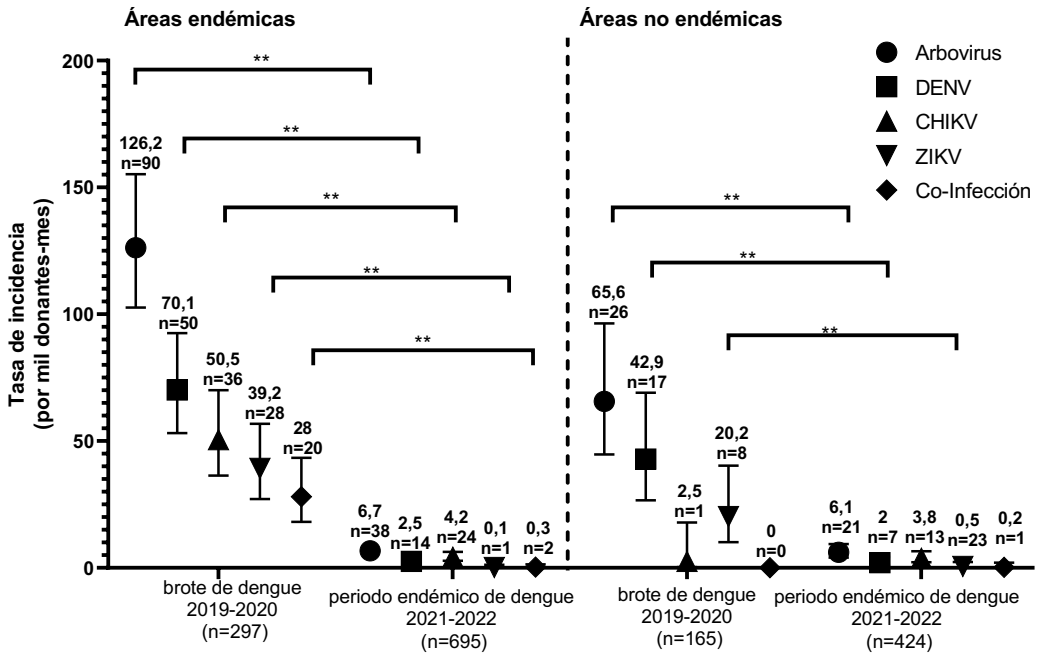


Figura 9. Tasas de Incidencias de arbovirus en donantes de sangre de áreas endémicas y no endémicas durante un brote y un periodo endémico de dengue en Colombia. *Los resultados se presentan como tasas de incidencia por mil donantes-mes e intervalo de confianza al 95%. Para el cálculo de las tasas de incidencia en áreas endémicas durante el brote de dengue se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 2,4 meses y 297 muestras para un cálculo de persona tiempo de 712 donantes-mes, en áreas no endémicas durante el brote, se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 2,4 meses y 165 muestras para un cálculo de persona tiempo de 396 donantes-mes. Durante el periodo endémico de dengue, en áreas endémicas, se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 8,06 meses y 695 muestras para un cálculo de persona tiempo de 5.601,7 donantes-mes, en áreas no endémicas, se tuvo en cuenta un tiempo de seguimiento de 8,06 meses y 424 muestras, para un cálculo de persona tiempo de 3.417,4 donantes-mes, ** p <0.0001.*

5.3.3 Durante brotes y periodos endémicos de dengue, los arbovirus pueden representar un riesgo en la seguridad transfusional

La evidencia de la circulación de estos virus en DS durante brotes, inclusive en periodos endémicos de dengue en Colombia, planteó la necesidad de estimar el riesgo que estos arbovirus pueden representar en la seguridad transfusional. Para esto, se utilizaron los análisis de incidencia de arbovirus en DS descritos previamente y, se realizaron estimaciones del riesgo residual (RR) que estos virus pueden representar en DS colombianos; el RR permite determinar la posibilidad de que una donación potencialmente infecciosa sea liberada, inclusive si DENV, ZIKV y CHIKV fueran tamizados de manera rutinaria en bancos de sangre, esto, a causa del periodo de ventana en el que se puedan encontrar DS infectados con estos virus. Durante el brote de dengue, se estimó el RR de arbovirus en 24,3 donaciones potencialmente infecciosas por cada mil donaciones (DMD), entre estos arbovirus, el RR más alto se encontró

en DENV, éste representó 14 DMD; por otro lado, aunque durante el periodo endémico de dengue el RR de arbovirus en DS fue significativamente menor respecto al brote, éste representó hasta 1,5 DMD (Figura 10), en conjunto estos resultados sugieren que los arbovirus podrían representar un riesgo en la seguridad transfusional.

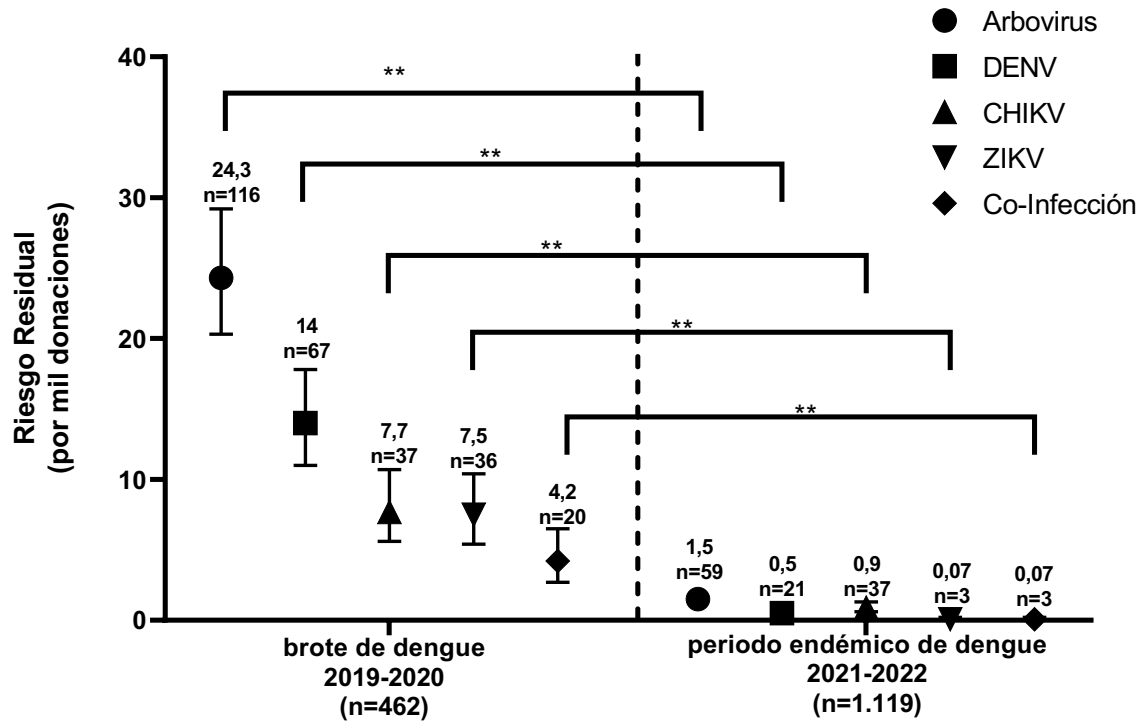


Figura 10. Riesgo residual de arbovirus en donantes de sangre durante el brote y el periodo endémico de dengue en Colombia. *Los resultados se presentan como riesgo residual por cada mil donaciones e intervalo de confianza al 95%. Para el cálculo del riesgo residual se tuvo en cuenta un periodo de ventana de 7 días (0,233 meses), **p <0.0001.*

Posteriormente, el RR que representan estos arbovirus en la seguridad transfusional durante brotes y periodos endémicos de dengue, planteó la necesidad de identificar el RR que estos arbovirus pueden representar en áreas endémicas y no endémicas de Colombia. Para esto, se dividió la población de DS en los mismos cuatro grupos utilizados para el análisis de tasas de incidencias en áreas endémicas y no endémicas durante el brote y periodo endémico de dengue. Este análisis permitió identificar que, en áreas endémicas los arbovirus pueden representar un riesgo en la seguridad transfusional inclusive en periodos endémicos de dengue, donde el RR de arbovirus es más bajo en comparación al que se evidencia en brotes de dengue (Figura 11), sin embargo, en áreas no endémicas, las magnitudes de RR de CHIKV y coinfecciones son similares en brotes y periodos endémicos (Figura 11). En conjunto, estos

resultados sugieren que los arbovirus podrían representar un riesgo en la seguridad transfusional en áreas endémicas y no endémicas durante brotes y periodos endémicos de dengue.

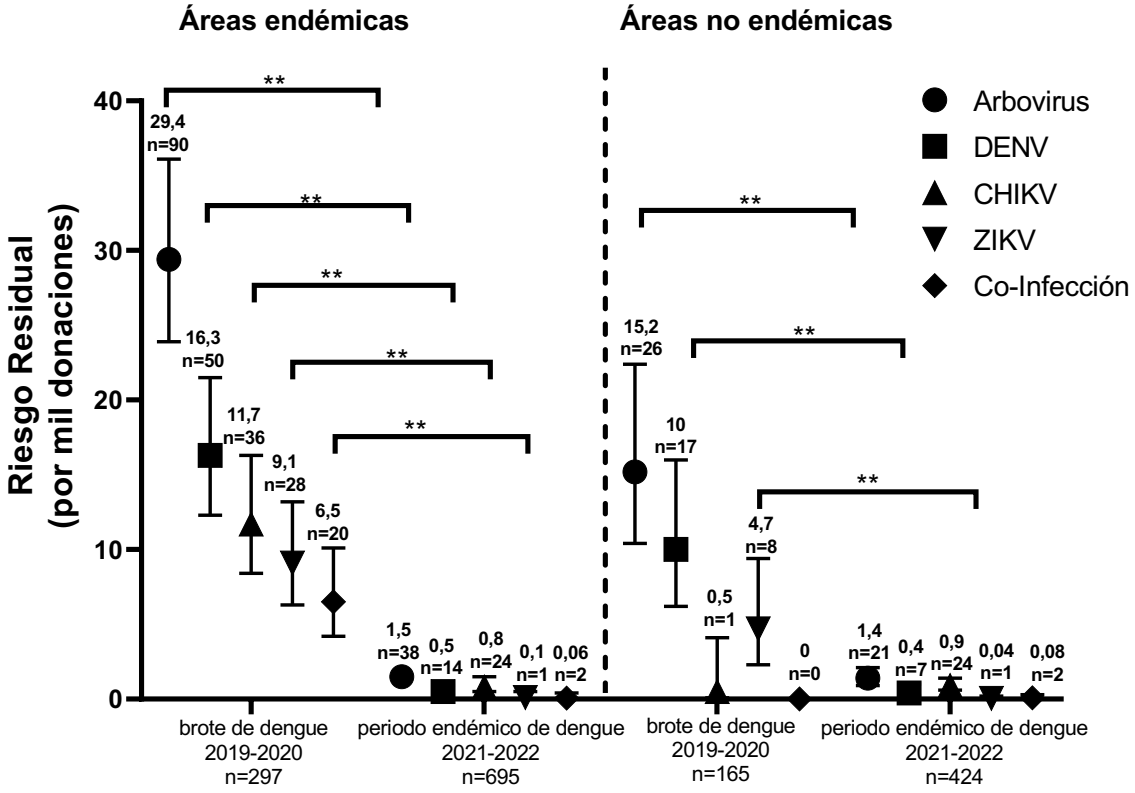


Figura 11. Riesgo residual de arbovirus en donantes de sangre de áreas endémicas y no endémicas durante el brote y el periodo endémico de dengue en Colombia. *Los resultados se presentan como riesgo residual por cada mil donaciones e intervalo de confianza al 95%. Para el cálculo del riesgo residual se tuvo en cuenta un periodo de ventana de 7 días (0,233 meses), **p <0.0001.*

5.3.4 La mayoría de las donantes de sangre encuestados fueron asintomáticos

Los DS que fueron positivos para al menos un arbovirus del estudio (DENV, ZIKV o CHIKV), fueron contactados por vía telefónica quince días después de la donación, esto, con el objetivo de identificar características clínicas y sociodemográficas de estas infecciones por arbovirus. La tasa general de respuesta de los 175 donantes positivos fue del 47% (83/175); los DS encuestados durante el brote de dengue representaron el 70% (58/83), mientras que los encuestados durante el periodo endémico representaron el 30% (25/83). Los resultados de esta encuesta se agrupan en la Tabla 7, donde se muestra que, entre los donantes sintomáticos,

que representaron el 43% (36/83), los síntomas más frecuentes fueron cefalea, malestar y artralgia, lo que sugiere la aparición de manifestaciones leves e inespecíficas entre los DS sintomáticos. Además, cuando clasificamos a los DS encuestados según procedieran de ciudades endémicas o no endémicas, no encontramos diferencias significativas en la frecuencia de los síntomas ni entre los virus.

Tabla 7. Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por arbovirus en donantes de sangre en Colombia.

Características		Áreas		Total (n= 83; 100%)
		Áreas no endémicas (n= 18; 22%)	Áreas endémicas (n= 65; 78%)	
Género	Femenino	10; 56%	33; 51%	43; 52%
	Masculino	8; 44%	32; 49%	40; 48%
Tipo de donante	Primera vez	6; 33%	17; 26%	23; 28%
	No repetitivo	5; 28%	29; 45%	34; 41%
	Repetitivo	7; 39%	19; 29%	26; 31%
historial de viajes a regiones endémicas en el último mes	No	12, 67%	37; 57%	49; 59%
	Si	6; 33%	28; 43%	34; 41%
Infección por Arbovirus	Dengue	10; 56%	26; 40%	36; 43%
	Zika	2; 11%	9; 14%	11; 13%
	Chikungunya	6; 33%	16; 24%	22; 27%
	Coinfección	0; 0%	14; 22%	14; 17%
Sintomático	No	13; 72%	34; 52%	47; 57%
	Si	5; 28%	31; 48%	36; 43%
Cefalea		5; 28%	21; 32%	26; 31%
Malestar General		2; 11%	9; 14%	11; 13%
Artralgias		0; 0%	8; 12%	8; 10%
Fiebre/escalofríos		1; 6%	6; 9%	7; 8%
Dolor Ocular o Retro-Orbital		1; 6%	6; 9%	7: 8%
Osteodinia o Mialgia		0; 0%	4; 6%	4; 5%
Conjuntivitis		0; 0%	4; 6%	4; 5%
Exantema		1; 6%	2; 3%	3; 4%
Dolor abdominal		0; 0%	3; 5%	3; 4%
No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las áreas endémicas y no endémicas (p>0,05).				

5.4 Discusión

En este análisis, se utilizaron los datos de dos estudios encaminados a identificar arbovirus en sueros de DS que asistieron a seis bancos de sangre de la Cruz Roja Colombiana, durante dos momentos epidemiológicos diferentes, uno durante un brote de dengue (2019-202) y otro durante un periodo endémico de dengue (2021-2022). Curiosamente, durante el brote de dengue, encontramos prevalencias de DENV de 14,5% y 1,9% durante el periodo endémico de dengue, lo que representa una alta prevalencia de ARN DENV en sueros de DS en Colombia, en comparación con la mayoría de los reportes durante brotes de estos virus en las Américas (138,157–160) y en Asia(119,161) donde las prevalencias de ARN de DENV en DS son menores al 1%. A pesar de esto, existen algunos reportes de altas prevalencias de DENV en DS durante brotes de dengue, en Arabia Saudí se notificó una prevalencia de ARN de DENV del 5,5%(25), mientras que en Portugal se notificó una prevalencia del 2,3%(162). En los dos estudios que incluyó el presente análisis, las altas prevalencias encontradas pueden atribuirse al hecho de que los sueros utilizados para realizar la detección molecular de estos arbovirus en DS durante los dos periodos (brote y periodo endémico), nunca se congelaron a temperaturas inferiores a los -70°C, que son temperaturas en las que se evidencia degradación del RNA viral proveniente de sueros(141,142); por otro lado, las altas prevalencias también pueden atribuirse a la sensibilidad técnica de la prueba utilizada (RT-PCR Semi-Anidada), que puede llegar a ser más sensible que otros enfoques como la RT-qPCR y la PCR convencional(143–146).

Durante el brote de dengue de 2019 en Colombia se notificaron 127.553 casos sintomáticos de dengue (475,4 por cada 100.000 habitantes) (34), después del brote de dengue en 2010 donde se reportaron 157.202 casos sintomáticos (666 casos por cada 100.000 habitantes) (34), el brote de dengue de 2019 es el segundo con más casos reportados en Colombia, esto podría ser una explicación de las prevalencias de arbovirus significativamente más altas encontradas en el brote de dengue; adicionalmente, durante el brote de dengue detectó ARN de los cuatro serotipos de DENV en DS, siendo los serotipos uno y dos los más prevalentes, estos resultados concuerdan con los reportados por el instituto nacional de salud de Colombia en ese periodo(163) y, sugieren que los serotipos de DENV pueden circular simultáneamente en la población de DS durante los brotes de dengue. Además de la circulación de los cuatro serotipos de DENV, ZIKV y CHIKV también circulan de manera simultánea en Colombia(164); curiosamente, en este estudio se evidencia que el estado hiperendémico del país, también se refleja en la población de DS donde no solo encontramos altas prevalencias de ARN de DENV durante el brote de dengue, sino también altas prevalencias de ARN de ZIKV (7,8%) y CHIKV (8%) y una alta prevalencia de CHIKV (3,3%) acompañada de una baja prevalencia de ZIKV (0,3%) durante el periodo endémico. Aunque durante estos dos periodos, el número de casos

notificados de ZIKV y CHIKV fue bajo en el país (147–150,165–167), las altas prevalencias de estos virus en DS aquí encontradas, podrían sugerir una subestimación del número de casos en el país, particularmente atribuidos a los casos de dengue que no se diagnostican por laboratorio y se reportan como casos sospechosos o confirmados por nexo epidemiológico, que pueden significar más del 40% de los casos de dengue reportados en el país (147,148), de hecho, durante el más reciente brote de chikungunya en Colombia, se estimó que el subregistro de los casos de chikungunya podían llegar a ser hasta del 36,1% de casos no registrados por falta de consulta del individuo y hasta del 24,9% por falta de notificación institucional, esto, en municipios colombianos (Girardot, Cundinamarca) entre noviembre de 2014 y mayo de 2015(110).

Ahora bien, en países hiperendémicos para arbovirus como Colombia, es frecuente encontrar coinfecciones en pacientes con síndromes febriles compatibles con infección por DENV, en los cuales se detecta ARN viral de más de un arbovirus(164,168). En este trabajo, se encontraron coinfecciones entre DENV/ZIKV, DENV/CHIKV, ZIKV/CHIKV e incluso coinfecciones entre los tres virus; aunque esto ya ha sido descrito, en el contexto de los bancos de sangre esto es altamente relevante, en tanto que puede significar que más de un virus puede ser transfundido a un receptor, sin embargo, los resultados aquí presentados no nos permiten hacer tal afirmación y es un tema que debe ser analizado con más detalle en futuros estudios.

La encuesta (quince días después de la donación) realizada a los DS positivos para al menos un arbovirus, indicó que el 67% de los donantes de sangre de ciudades no endémicas, no habían viajado a lugares endémicos ara arbovirus en los últimos tres meses, aunque esto se puede atribuir a que en el momento de la encuesta, el DS no pudo tener completamente clara la definición de área endémica al momento de responder esa pregunta, este resultado también puede sugerir que la transmisión de estos virus puede estar activa en áreas del país que se consideran no endémicas. En Colombia, la altitud máxima a la que se ha reportado vectores (*A. aegypti*) positivos para arbovirus (dengue) es de 1.984 m s.n.m y, la mayor altitud a la que se han encontrado mosquitos *A. aegypti* no infectados corresponde a 2.302 m s.n.m (135), e inclusive, en otros países se ha notificado la presencia de *Ae. aegypti* en altitudes de hasta 2.900 m s.n.m (169). Aunque estos informes de altitudes superiores a los 1.984 m s. n. m son de vectores no infectados, recientemente se ha demostrado que los especímenes de *A. albopictus* pueden transmitir CHIKV a una temperatura de 20°C (un indicador de altitud elevadas)(170); curiosamente, en las áreas no endémicas, durante el brote y el periodo endémico de dengue aquí analizado, la mayoría de DS positivos para CHIKV de áreas no endémicas, procedían de la ciudad de Manizales, una ciudad cuya temperatura se encuentra

entre los 14 -23°C y, se encuentra a una altitud de 2.160 m s.n.m, esto podría sugerir que en estas áreas que se consideran no endémicas en el país, pueda existir una circulación del vector infectado con CHIKV, no obstante, nuestros resultados no son suficientes para concluir que en algunas áreas no endémicas del país puedan estar circulando vectores infectados capaces de transmitir estos virus. La encuesta también mostró que la mayoría de los DS encuestados eran asintomáticos (57%) y, entre los sintomáticos (43%), los síntomas más frecuentes (cefalea, malestar general y artralgias) fueron inespecíficos; estas infecciones suelen denominarse subclínicas o inaparentes y, aunque se detectan por seroconversión o detección del virus, los síntomas suelen ser insuficientes para incitar al individuo a consultar a un centro médico(4). En el contexto de banco de sangre, estas infecciones son importantes en tanto los síntomas de estas infecciones subclínicas pueden pasar desapercibidas por el DS y, dificultar el auto reporte de estas al banco de sangre.

5.5 Conclusiones

En conclusión, arbovirus como DENV, ZIKV y CHIKV representan prevalencias y tasas de incidencias significativamente mayores durante brotes de dengue, en comparación con periodos endémicos. En áreas no endémicas, las proporciones de CHIKV y coinfecciones en DS observadas fueron similares en el brote y el periodo endémico de dengue, por lo tanto, es posible que en algunas áreas no endémicas del país pueda estar establecida la circulación de vectores infectados capaces de transmitir estos virus. Por último, los análisis de riesgos residuales de arbovirus en brotes y periodos endémicos de dengue sugieren que estos virus pueden representar un riesgo durante brotes y periodos endémicos de dengue.

6 CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS VIRUS DENGUE, ZIKA Y CHIKUNGUNYA EN PLAQUETAS Y GLÓBULOS ROJOS ALMACENADOS BAJO CONDICIONES ESTÁNDAR DE BANDO DE SANGRE

6.1 Introducción

Si bien en los anteriores capítulos se describió la circulación de DENV, ZIKV y CHIKV en DS inclusive en periodos no endémicos para estos virus, la presencia de ARN de estos virus en hemocomponentes, no deduce que estos, puedan tener a su vez viriones infecciosos al

momento de transfundirse, en este sentido, el presente análisis tuvo por objetivo analizar la estabilidad de DENV, ZIKV y CHIKV en plaquetas y glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre.

6.2 Metodología

6.2.1 Población y Muestras

En el marco de un estudio observacional descriptivo, financiado por MinCiencias (contrato 898-2019, código: 130884467713), desde el banco nacional de sangre de la Cruz Roja Colombiana, una unidad de glóbulos rojos (GR) filtrada grupo O, Rh positivo y, una unidad de plaquetas obtenidas por aféresis grupo O, Rh negativo fue enviada al instituto de Virología de la Universidad el Bosque, estos componentes, fueron enviados manteniendo las temperaturas de almacenamiento estándar en bancos de sangre para GR (4 ºC) y plaquetas (entre 20 a 24 ºC), los parámetros hematológicos y conteos celulares de las unidades de estas unidades, se agrupan en la Figura suplementaria 2.

6.2.2 Cuantificación absoluta de copias genómicas de dengue, Zika y chikungunya.

La amplificación y cuantificación absoluta de copias genómicas de DENV, ZIKV y CHIKV se realizó por separado utilizando un enfoque de RT-qPCR, en resumen, la amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 15 µL utilizando el kit comercial Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR (NEB), se utilizaron 5 µL de plantilla de ARN (60-80 ng/µL) y 0.4uM de sonda y de cada uno de los primers (un total de dos primers), las temperaturas de amplificación fueron las siguientes: 15 min a 55°C, 3 min a 95°C, seguidos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 55°C, 15 seg a 72°C durante 39 ciclos de amplificación, la descripción detallada de los primers y sondas utilizados se agrupa en la tabla 8, estos oligonucleótidos se han descrito previamente en protocolos validados para la detección molecular de DENV, ZIKV y CHIKV (171–173)

Tabla 8. Secuencias de primers y sondas utilizadas en RT-qPCR para la cuantificación absoluta de copias genómicas de DENV, ZIKV y CHIKV

Virus	Forward	Reverse	Probe	Label	Quencher	Gene	Amplicon size bp
	5-´3	5´-3	5´-3	5´	3´		
DENV2	CAGGCTATGGCACYG TCACGAT	CCATYTGCAGCARCA CCATCTC	CTCYCCRAGAACGGG CCTCGACTTCAA	HEX	BHQ1	E	78
ZIKV	CCGCTGCCCAACACA AG	CCACTAACGTTCTTTT GCAGACAT	AGCCTACCTTGACAA GCAGTCAGACACTCA A	HEX	BHQ1	E	76
CHIKV	AAGCTYCGCGTCCTT TACCAAG	CCA AAT TGT CCY GGT CTT CCT	CCA ATG TCY TCM GCC TGG ACA CCT TT	FAM	BHQ1	nsp4	

La cuantificación absoluta de copias genómicas de DENV, ZIKV y CHIKV se realizó utilizando una curva de calibración construida con diluciones base 10 de estándares de DNA plasmídico, cuyas concentraciones iniciales correspondían a $9.6x10^7$ copias/ µL (DENV,), y $1.2x10^8$ copias/ µL (ZIKV y CHIKV).

6.2.3 Relación del título viral y copias genómicas de cosechas virales de dengue, Zika y chikungunya.

Las cosechas virales de DENV, ZIKV y CHIKV obtenidas en el Instituto de Virología de la Universidad el Bosque, se titulan mediante un ensayo de reducción del número de placas, y el título viral se reporta como Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/mL) (174), para conocer la equivalencia del número de copias genómicas que representan los títulos (expresados en UFP) de estas cosechas virales, se realizaron diluciones seriadas en base 10 de cada una de las cosechas de DENV, ZIKV y CHIKV que tenían un título inicial de $1,6x10^5$, $4,6x10^5$ y $2.5x10^7$ respectivamente, posteriormente, se tomaron alícuotas de 140 µL estas diluciones y, se purificó el RNA viral de cada una de estas utilizando un kit comercial (Quiagen ref: 52906), el RNA purificado se amplificó y se cuantificó utilizando el enfoque de RT-qPCR descrito en el enunciado 6.2.2.

6.2.4 Ensayos de Infección de plaquetas y glóbulos rojos con virus dengue, Zika y chikungunya

Las cargas virales reportadas de DENV, ZIKV y CHIKV en DS asintomáticos a los que se les detecta estos virus están en el rango de 3 a $1.3x10^8$ copias/µL, por lo tanto, se utilizaron cantidades de DENV, ZIKV y CHIKV dentro de estos rangos para infectar las unidades de plaquetas y glóbulos rojos. En el caos de las plaquetas, se realizaron alícuotas con volúmenes

de 35 mL, esto, en tubos falcón de 50 mL a los que posteriormente se les adicionó cantidades conocidas de DENV, ZIKV o CHIKV, posteriormente, estas alícuotas (en tubos Falcon de 50 mL) infectadas con cada uno de los virus, se distribuyeron en cajas de cultivo celular T 1.25 (Falcon Ref: 353107) con volúmenes de 3 mL, en total se alicuotaron 63 cajas de cultivo T 12.5 (cada una con volumen de 3 mL de plaquetas infectadas donde DENV, ZIKV o CHIKV) por virus, estas cajas de cultivo, fueron almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre que, en el caso de plaquetas, corresponden a 20-24 ºC bajo agitación constante, esto durante seis días, que corresponde al tiempo máximo en el que las unidades de plaquetas pueden ser utilizadas para una transfusión sanguínea, durante cada uno de los seis días de observación, se recolectaron los volúmenes (3 mL) contenidos en tres de cultivo de las 63 cajas de cultivo cajas (9 mL en total) infectadas con DENV, ZIKV o CHIKV, estos volúmenes se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 mL a -80 ºC para su posterior análisis.

En el caso de los glóbulos rojos, se realizaron alícuotas con volúmenes de 35 mL, esto, en tubos falcón de 50 mL a los que posteriormente se les adicionó cantidades conocidas de DENV, ZIKV o CHIKV, posteriormente, estas alícuotas (en tubos Falcon de 50 mL) infectadas con cada uno de los virus, se distribuyeron en placas de cultivo celular de síes pozos (NEST, Ref: 703001), con volúmenes de 4 mL por pozo, en total se alicuotaron 12 pozos por cada virus, estas placas de cultivo de celular, fueron almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre que, en el caso de glóbulos rojos, corresponde a 4 ºC, esto durante 42 días, que corresponde al tiempo máximo en el que las unidades de glóbulos rojos pueden ser utilizados para una transfusión sanguínea, durante los 42 días de observación, con intervalos de 7 días, se recolectaron los volúmenes (4 mL) contenidos en dos pozos (8 mL en total) de placas de cultivo celular de seis pozos infectadas con DENV, ZIKV o CHIKV, estos volúmenes se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 mL a -80 ºC para su posterior análisis.

6.2.5 Detección molecular de virus dengue, Zika, chikungunya y *beta-actina* en plaquetas y glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre

Para la detección molecular de DENV, ZIKV o CHIKV en glóbulos rojos y plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre, se utilizaron volúmenes de 140 µL provenientes de las alícuotas recolectadas en cada uno de los siete días de seguimiento (especificados en el enunciado 6.2.4), de las plaquetas y glóbulos rojos almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre, estos volúmenes fueron utilizados para purificar el

ARN viral de DENV, ZIKV o CHIKV utilizando un kit comercial (Quiagen ref: 52906), posteriormente, este ARN se amplificó y cuantificó utilizando utilizó el enfoque de RT-qPCR descrito en el enunciado 6.2.2.

6.2.6 Confirmación de la capacidad infecciosa de chikungunya en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre

La capacidad infecciosa de CHIKV en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre (20-24ºC bajo agitación constante) se confirmó por ensayos de plaqueo viral (174), utilizando una línea celular proveniente de células de riñón de mono verde africano (células vero), para esto, se utilizaron volúmenes de 300 µL provenientes de las alícuotas recolectadas de cada uno de los siete días de seguimiento (especificados en el enunciado 6.2.4), de las plaquetas infectadas con CHIKV, estos volúmenes fueron centrifugados durante 15 minutos a una velocidad de 15.000 *g* y una temperatura de 4ºC, posteriormente, fueron utilizados volúmenes de 200 µL de los sobrenadantes de estas alícuotas centrifugadas para realizar ensayos de plaqueo viral, para esto, 24 horas antes de la infección, se sembraron células vero en placas de 24 pozos a una densidad de $1{,}0x10^5$ en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Gibco) al 2% y, se incubaron a 37ºC y CO2 al 5%, luego, las células se infectaron durante dos horas con 200 µL de las alícuotas recolectadas de cada uno de los siete días de seguimiento de las plaquetas infectadas con CHIKV y, con 200 µL de los sobrenadantes de estas alícuotas centrifugadas, posteriormente el inóculo de la infección se retiró y se reemplazó por DMEM 2x suplementado con carboximetilcelulosa (Sigma C4888-500 G), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) al 7.5%, SFB al 6% y 0.5 µg/ml de gentamicina**,** seguidamente, la monocapa de células infectada fue incubada a 37ºC y CO2 al 5% por 72 horas, después de esto, las células se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% y metanol al 70% durante 25 min, se lavó la solución de cristal violeta y se calculó el título del virus usando la fórmula UFP/mL= (número promedio de placas x factor de dilución)/ volumen de inóculo (mL).

Adicionalmente, la capacidad infecciosa de CHIKV en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre, también fue confirmada por la detección de la proteína E de CHIKV por inmunofluorescencia indirecta (IFI), brevemente, 16 horas antes de la infección, se sembraron células vero en portaobjetos de cultivo celular de 8 pozos (MATTEK, ref: CCS-8) a una densidad de $3.0x10^4$ células por pozo, estás células se infectaron con con 200 µL de los sobrenadantes de alícuotas centrifugadas que habían sido obtenidas en 4 (día 0 a día 7) de los

7 días de observación, estás células infectadas fueron incubadas durante 72 horas a 37ºC y CO2 al 5%, después de esto, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min y luego se les adicionó NH_4Cl a 50 mM durante 1 hora, luego, se adicionó a las células una solución de permeabilización y bloqueo de los sitios de unión no específicos y compuesta por suero de cabra al 5% y tritón al 0.3% durante una hora, posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CHIKV en una dilución 1:50 durante 1 hora a temperatura ambiente, estás células se lavaran y se incubaron con un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con FITC en una dilución 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente, los núcleos de las células se tiñeron utilizando DAPI a una dilución 1:1.000 y, finalmente las células se visualizaron con un microscopio Axio Observer e (Carl Zeiss AG., Jena, Germany) y se tomaron fotos utilizando el software Axio Vision 4.5 software.

6.2.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos por las cuantificaciones absolutas de copias genómicas por RT-qPCR fueron caracterizados utilizando medidas de tendencia central, que incluyeron promedio y desviación estándar (DE) o mediana y rangos intercuartílicos (RIQ), esto, basado en el estudio del supuesto de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre las cargas virales obtenidas durante cada uno de los días de observación de plaquetas (7 observaciones, día 0 a día 7) y glóbulos rojos (7 observaciones, día 0, día 7, día 21, día 28, día 35 y día 42) se evaluaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y, las diferencias entre cada uno de estos grupos se evaluaron utilizando la prueba de Dunn ($p < 0.05$, Stata v16).

6.3 Resultados

6.3.1 Equivalencia entre el título viral y el número de copias genómicas de cosechas virales de dengue, Zika y chikungunya utilizadas.

Para infectar las unidades de plaquetas y GR utilizadas en los ensayos descritos en este capítulo, se contempló utilizar cargas virales que se encontraran en el rango de viremias reportadas en DS asintomáticos positivos para DENV, ZIKV o CHIKV; este rango se encuentra entre las 3 a $1.3x10^8$ copias/mL. Se encontraron equivalencias de este rango de cargas virales, en títulos virales de DENV-2 entre $1,6x10^{-1}$ y $1,6x10^2$ UFP/mL, de ZIKV entre $4,6x10^{-1}$y $4,6x10^3$

UFP/mL y, de CHIKV entre $2,5x10^2$ y $2,5x10^5$ UFP/mL (Anexos 3 y 4); esto sugirió los títulos virales que podrían utilizarse para infectar las unidades de plaquetas y GR

6.3.2 El genoma viral de dengue, Zika y chikungunya es estable en plaquetas y glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre

Las infecciones de plaquetas y GR con DENV, ZIKV y CHIKV se llevaron a cabo utilizando títulos virales de $1,6x10^4$, $4,6x10^3$ y $2,5x10^3$ UFP/mL respectivamente. Si bien la cantidad de copias genómicas equivalentes a los títulos virales de ZIKV y CHIKV se encuentran en el rango de viremias arbovirales reportadas en DS asintomáticos, la equivalencia de copias genómicas respecto al título viral de DENV-2 utilizado en el ensayo, se encuentra por encima de este rango ($5,929x10^9$). A pesar de esto, este título viral fue considerado ya que es un título viral que podía ser detectado por ensayos de plaqueo viral o inmunofluorescencias posteriores; utilizar títulos de DENV-2 más bajos podrían no ser detectados por estos ensayos. Los títulos virales representaron en la unidad de plaquetas (que tenía una densidad de plaquetas de $3,83x10^8$ plaquetas/mL) multiplicidades de infección (MOIs) de 0,000041, 0,000012 y 0,00000653 de DENV, ZIKV y CHIKV respectivamente. Durante el seguimiento (día 0 hasta día 6) de las plaquetas infectadas con estos virus y, almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre, se detectó la presencia de copias genómicas de DENV (rango entre $6,7x10^5$ y $1,31x10^7$ copias/ µL), ZIKV (rango entre $3,2x10^3$ y $4,2x10^4$ copias/ µL) y CHIKV (rango entre $1,3x10^2$ y $1,1x10^4$ copias/ µL). Estos resultados sugieren que el genoma de DENV, ZIKV y CHIKV es estable en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre (Figura 12).

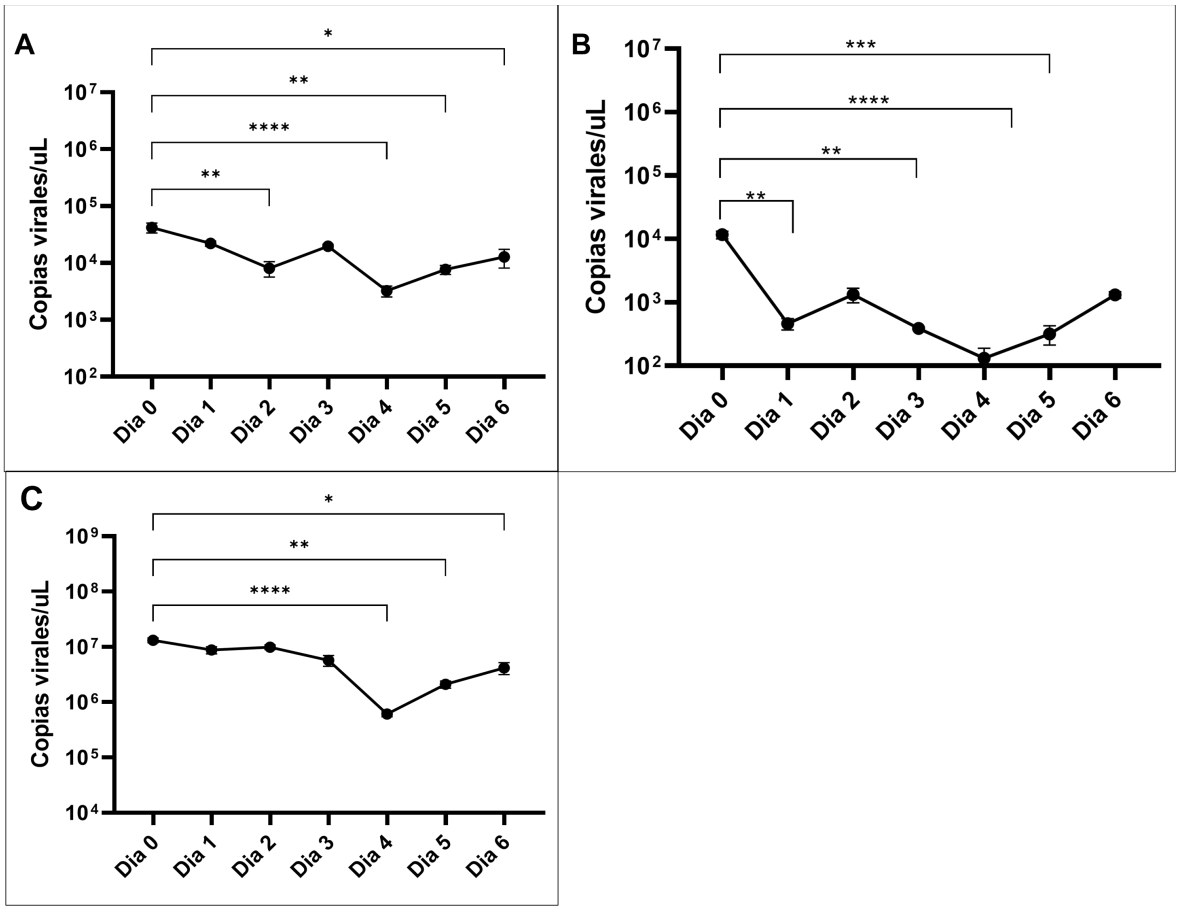


Figura 12. Cuantificación absoluta de copias genómicas de dengue, Zika y chikungunya virus en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre. *Cuantificación absoluta de copias genómicas virales provenientes de cada uno de los días de seguimiento de plaquetas infectadas con ZIKV (A), CHIKV (B) y DENV (C) almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre. Los resultados se presentan como el promedio de copias genómicas de tres réplicas biológicas (analizadas por duplicado), *p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,0005, **** p<0,0001*

Por otro lado, los títulos virales utilizados en la infección de la unidad de GR (que tenía una densidad celular de $6{,}09 \times 10^9$ GR/mL) representaron MOIs de 0,0000026, 0,000000755 y 0,000000411 de DENV, ZIKV y CHIKV respectivamente. Durante cuatro observaciones realizadas en 21 días (días 0,7,14 y 21) a GR infectados con estos virus, se detectaron copias genómicas de DENV (rango entre $6{,}9 \times 10^2$ copias/ µL y $7{,}6 \times 10^3$ copias/ µL), ZIKV (rango entre $3{,}48 \times 10^3$ copias/ µL y $3{,}73 \times 10^4$ copias/ µL) y CHIKV (rango entre $2{,}3 \times 10^1$ copias/ µL y $1{,}03 \times 10^2$ copias/ µL) (Figura 13). En conjunto, estos resultados sugieren que el genoma viral de DENV, ZIKV y CHIKV es estable en GR durante el tiempo analizado. En este diseño experimental no fue posible realizar un seguimiento a los GR durante 42 días, ya que se empezó a evidenciar hemolisis y pérdida de volumen en los pozos de las placas de cultivo celular utilizadas para

almacenar los GR infectados; aunque el genoma viral de estos virus pudo ser detectado, el modelo experimental no permitió mantener los GR en condiciones similares a las que se encontrarían en un banco de sangre, por ende, esto sugiere que este modelo no es adecuado para el análisis de GR bajo condiciones estándar de banco de sangre.

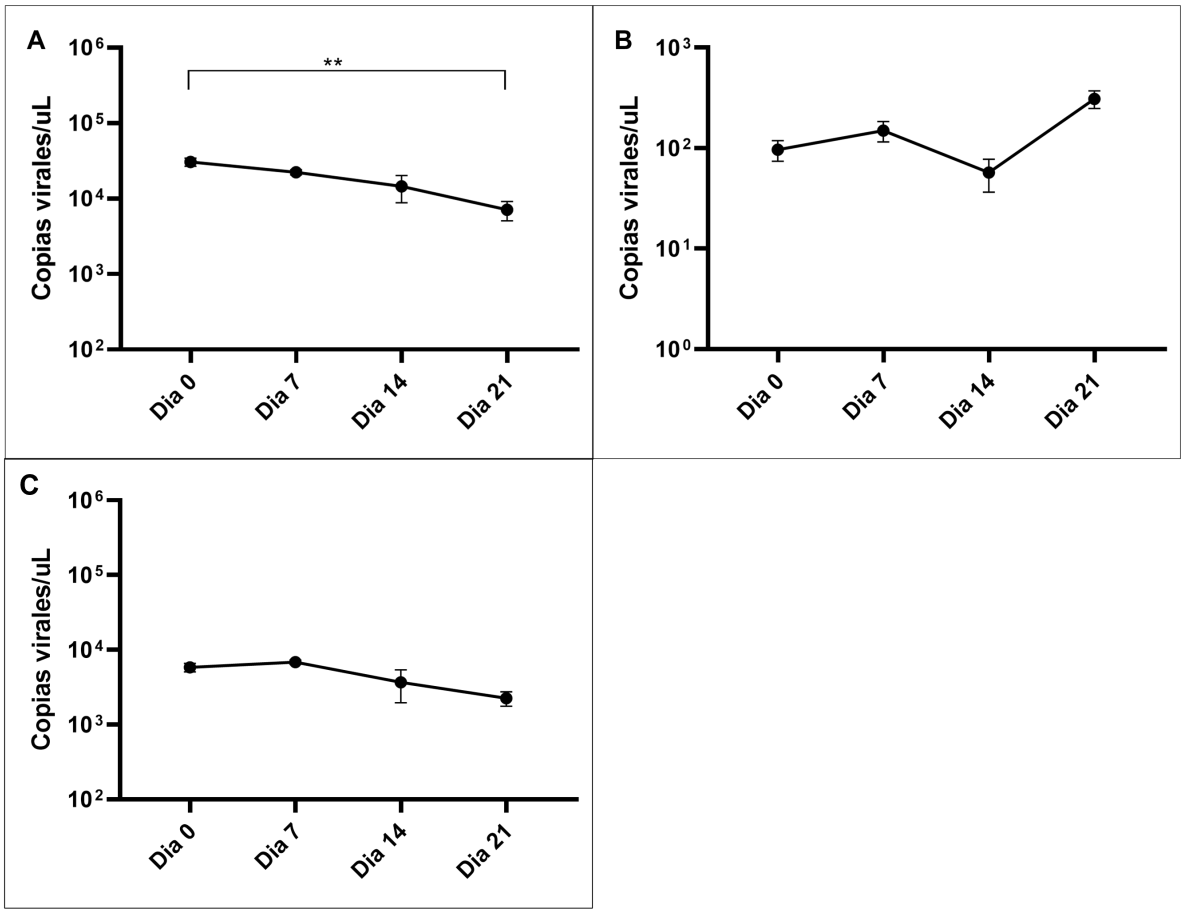


Figura 13. Cuantificación absoluta de copias genómicas de dengue, Zika y chikungunya virus en glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre. *Cuantificación absoluta de copias genómicas virales provenientes de cada uno de los días de seguimiento de glóbulos rojos infectados con ZIKV (A), CHIKV (B) y DENV (C), almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre. Los resultados se presentan como el promedio de copias genómicas de dos réplicas biológicas (analizadas por duplicado), ** p <0,005.*

6.3.3 La capacidad infecciosa del virus chikungunya se mantiene en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre

La evidencia de estabilidad del genoma viral de DENV, ZIKV y CHIKV en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre, planteó la necesidad de analizar la capacidad infecciosa de estos virus, sin embargo, este análisis se realizó solo con CHIKV,

teniendo en cuenta que había sido el virus más prevalente (3.3%, 37/1.119) durante el periodo endémico de dengue. En este sentido, se utilizaron alícuotas provenientes de cada uno de los siete días de seguimiento de plaquetas que fueron infectadas con CHIKV para ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos de plaqueo viral utilizando cultivos adherentes de células vero. Interesantemente, en los ensayos de IFI se identificó cualitativamente la presencia de la proteína E de CHIKV en células vero infectadas con sobrenadantes de alícuotas provenientes de 5 días (día 0 a día 4) de seguimiento (Figura 14).

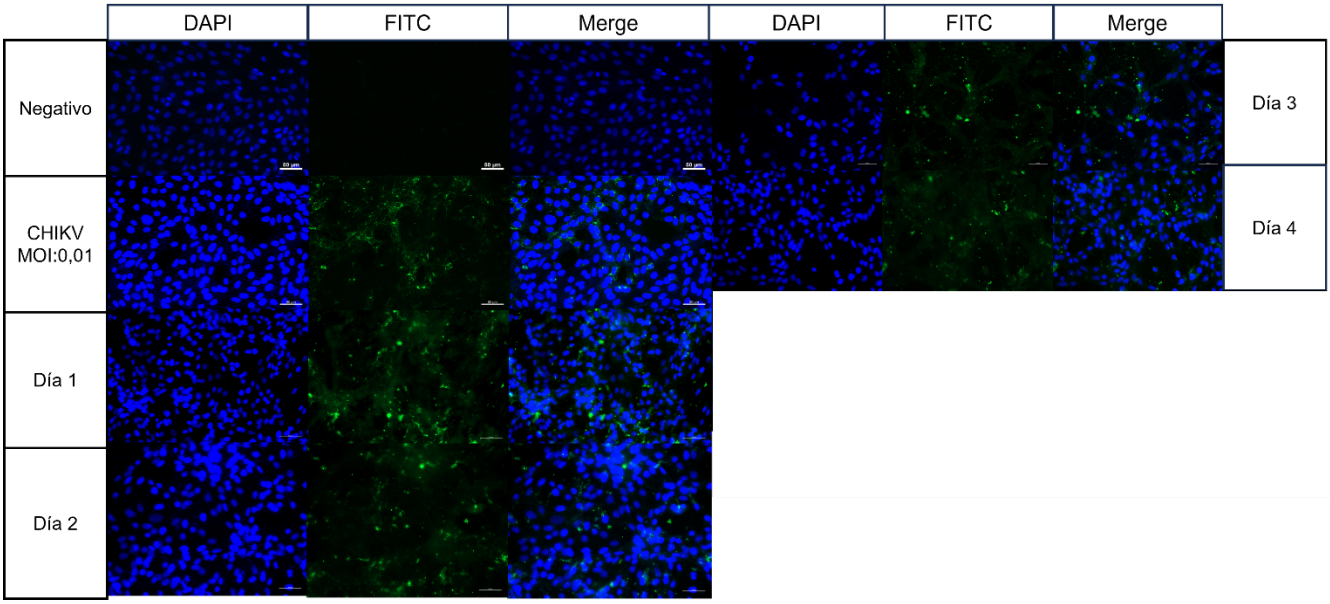


Figura 14. Detección de la proteína E del virus chikungunya. *Detección cualitativa por inmunofluorescencia indirecta de la proteína E del virus chikungunya, proveniente de plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre en células vero infectadas.*

Posteriormente, se utilizaron alícuotas y sobrenadantes (obtenidos por centrifugación) de cada uno de los 7 días de seguimiento de las plaquetas infectadas con CHIKV para determinar la capacidad infecciosa de este virus de manera cuantitativa (título viral), por ensayos de plaqueo viral. . Interesantemente, en los ensayos de plaqueo viral, se detectaron títulos virales en cada uno de los siete días de seguimiento de plaquetas en un rango entre 7,5 y 42,5 UFP/mL (Figura 15), esto sugiere que CHIKV es estable e infeccioso en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre.

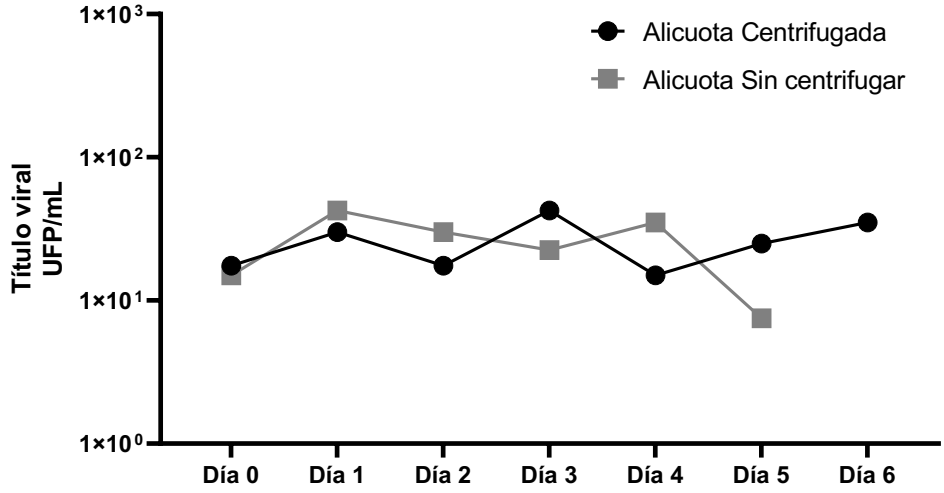


Figura 15. Cuantificación del Título viral de CHIKV, en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre. *Cuantificación del título viral (UFP/mL) de alícuotas (Alícuota Sin centrifugar) y sobrenadantes de alícuotas centrifugadas (Alícuota Centrifugada) provenientes de cada uno de los siete días de seguimiento de plaquetas infectadas con CHIKV, almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre. Los resultados se presentan como el promedio de dos réplicas técnicas provenientes de una muestra.*

6.4 Discusión

Las elevadas prevalencias de ARN de DENV, ZIKV y CHIKV aquí reportadas, durante un brote y un periodo endémico de dengue, que pueden representar hasta el 25.1 y el 5.3% de los DS tamizados en bancos de sangre colombianos, planteó la necesidad de determinar la estabilidad y capacidad infecciosa de estos virus cuando son almacenados en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre y GR almacenados a 4ºC. Interesantemente, el ARN viral de estos virus pudo ser detectado por RT-qPCR durante 7 días en plaquetas y durante 21 días en GR; estos resultados concuerdan con reportes previos en donde se evidencia la persistencia del ARN de DENV-2, ZIKV y CHIKV en plaquetas y GR que se almacenan bajo condiciones estándar de banco sangre (175–177). Aunque la presencia de ARN viral no se relaciona necesariamente con la presencia de virus infecciosos, este ARN viral, hace parte del grupo de moléculas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs), que al ser reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) celulares pueden desencadenar respuestas inmunes adaptativas del huésped (178). Uno de estos RRP, el receptor tipo Toll-3 (TLR3), es un receptor que se ubica en endosomas o membranas celulares y está involucrado en el reconocimiento de ARN de patógenos como

DENV (178,179); este reconocimiento desencadena una cascada de señalización cuyo desenlace es el aumento de la producción de interferones de tipo 1 (IFN-1), que son un conjunto de proteínas con actividades antivirales ya conocidas. En el contexto de las transfusiones sanguíneas, este ARN viral podría desencadenar estas respuestas celulares en el receptor y, se desconoce si esto pudiese afectar el éxito de la transfusión sanguínea; se necesitan más estudios para analizar el impacto que estos ARNs virales puedan generar durante las transfusiones sanguíneas. Aunque en las cuantificaciones absolutas de copias genómicas de DENV, ZIKV y CHIKV obtenidas en los días de seguimiento de las plaquetas y los GR existe una tendencia de disminución de la cantidad de copias genómicas detectadas desde el día 0, en algunos días de observación se evidencian aumentos en la cantidad de copias genómicas virales respecto al día anterior. Por ejemplo, la cantidad de copias genómicas de ZIKV detectadas en el día 3, fue superior a la cantidad de copias detectadas en el día 2, lo que podría atribuirse a la infección y replicación de estos virus en glóbulos blancos que se encuentran en proporciones bajas en estos hemocomponentes; de hecho, ya existe evidencia de la capacidad infecciosa y replicativa de DENV, ZIKV y CHIKV en glóbulos blancos tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos (180–183). Ahora bien, también se confirmó la capacidad infecciosa de CHIKV cuando éste se almacena en plaquetas bajo condiciones estándar de bando de sangre, aunque ya se encuentra reportada la persistencia de este virus infeccioso en concentrados plaquetarios (obtenidos a partir de sangre total)(175). Hasta el momento no existen reportes en unidades de plaquetas obtenidas por aféresis, en este análisis, se identificó que CHIKV puede persistir y permanecer infeccioso en estos concentrados plaquetarios.

Aunque la evidencia de que DENV, ZIKV y CHIKV pueden persistir en plaquetas y glóbulos rojos almacenados bajo condiciones estándar de banco de sangre, en conjunto con los reportes aquí presentados de altas prevalencias, incidencias y riesgos residuales de estos virus en DS durante brotes y periodos endémicos de dengue en Colombia, puede sugerir que estos virus pueden representar un problema en la seguridad transfusional del país. De esta manera, es necesario investigar el impacto que esto puede significar en los receptores de transfusiones sanguíneas que puedan contener estos virus, aunque resulta importante mencionar que la transfusión de hemocomponentes infectados con DENV, ZIKV o CHIKV no necesariamente puede significar el desenlace de una infección sintomática en el receptor. Por ejemplo, en Brasil se ha reportado un índice de transmisión por transfusión de DENV en el 37,5% de los receptores de componentes positivos para DENV y, en estos individuos no se observaron diferencias clínicas significativas respecto a los receptores de hemocomponentes negativos

para DENV(184). Este comportamiento clínico de estas infecciones por transfusión, puede atribuirse a la protección conferida por la inmunidad preexistente de los receptores contra este virus, de hecho en áreas endémicas la seroprevalencia de IgG contra DENV puede ser superior al 90%, esto plantearía la posibilidad de utilizar componentes potencialmente positivos para ARN de DENV, ZIKV o CHIKV en áreas exclusivamente endémicas, donde el riesgo de desarrollar una infección grave por la transfusión de estos virus podría ser relativamente baja; sin embargo, en áreas no endémicas, la transmisión por transfusión sanguínea de estos virus podría representar un riesgo mayor para los receptores que no tengan inmunidad preexistente de estos virus, de hecho, ya se ha descrito que la morbilidad de las infecciones por DENV en áreas no endémicas es mayor(185), lo que plantearía la necesidad de profundizar más en el riesgo de transfusiones de estos virus en áreas no endémicas en futuros estudios.

Por otro lado, aún si se considerase el tamizaje de estos virus en DS en Colombia, la necesidad de descartar las unidades positivas para DENV, ZIKV o CHIKV en Colombia, podría poner en una situación desfavorable al suministro de componentes sanguíneos en el país, en donde se ha reportado un desabastecimiento de estos hemocomponentes respecto a la demanda del país(186). una alternativa para conservar estas unidades potencialmente infecciosas podría estar enfocada en el uso de técnicas de reducción de patógenos antes de las transfusiones, de hecho, se ha descrito el uso de amotosaleno y luz U.V de longitud de onda larga para la reducción de CHIKV en unidades de plaquetas (187), sin embargo, aún no es claro si estas tecnologías se pueden utilizar en otros hemocomponentes como GR y, si esta reducción de patógenos es suficiente para no causar infección en el receptor. Estas, son preguntas que deben ser resueltas, en tanto son útiles para seguir dilucidando el impacto que los arbovirus pueden representar en la seguridad transfusional.

6.5 Conclusiones

En conclusión, el genoma viral de DENV, ZIKV y CHIKV es estable en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre y, en GR almacenados a 4°C, sin embargo, el modelo propuesto para el almacenamiento de los GR genera hemólisis de los eritrocitos, por lo tanto, no es adecuado para simular las condiciones estándar de un banco de sangre. Adicionalmente, se demostró que la capacidad infecciosa de CHIKV permanece estable en plaquetas almacenadas hasta por 6 días, por lo tanto, se hace necesario el estudio de tecnologías de reducción de patógenos, que permitan utilizar hemocomponentes potencialmente infecciosos para estos virus.

7 Conclusiones Generales y Recomendaciones

Aunque es poco lo que se ha estudiado en relación con la probable transmisión por trasfusión sanguínea de arbovirus en el país, en este estudio se reportaron altas prevalencias de ARN de DENV, ZIKV y CHIKV en DS, inclusive en periodos endémicos de dengue, adicionalmente, estos virus circulan en áreas que actualmente se consideran como no endémicas del país, esto, se debe probablemente a la movilización constante por periodos cortos de tiempo de estos DS hacia áreas que son endémicas, no obstante, también es plausible que el vector infectado con estos virus pueda estar circulando ya en áreas que se consideran actualmente como no endémicas, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis. Por otro lado, las altas prevalencias de ARN de ZIKV y CHIKV en DS, podrían sugerir una subestimación de este número de casos en la población general y, los riesgos residuales que estos arbovirus representan en la seguridad transfusional del país, sugieren que inclusive, si estos arbovirus fuesen tamizados de manera rutinaria en el país, algunas donaciones potencialmente infecciosas pudiesen seguir siendo liberadas.

Adicionalmente, el genoma viral de DENV, ZIKV y CHIKV persiste en plaquetas almacenadas bajo condiciones estándar de banco de sangre, e inclusive, la capacidad infecciosa de CHIKV se mantiene bajo estas condiciones, por lo tanto, es necesario investigar el impacto de las transfusiones infecciosas en receptores Colombianos, si bien ya se ha reportado un índice de transmisión por transfusión de DENV en otros países, no está claro si este índice se mantiene igual en áreas no endémicas para estos virus. Finalmente, se espera que los resultados obtenidos en este trabajo sean pilares útiles para iniciar un análisis más exhaustivo de la situación de seguridad transfusional en función de la circulación de arbovirus en el país.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khetarpal N, Khanna I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. J Immunol Res [Internet]. 2016 [citado el 20 de diciembre de 2022];2016. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27525287/

2. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2014 [citado el 20 de diciembre de 2022];8(1):36. Disponible en: /pmc/articles/PMC3888466/
3. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. Nature Reviews Microbiology 2010 8:7 [Internet]. junio de 2010 [citado el 20 de diciembre de 2022];8(7):491–500. Disponible en: https://www.nature.com/articles/nrmicro2368
4. Grange L, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A, Gresh L, Paul R, Harris E. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. Front Immunol [Internet]. 2014 [citado el 31 de octubre de 2023];5(JUN). Disponible en: /pmc/articles/PMC4052743/
5. Petersen LR, Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. Vox Sang [Internet]. 2010 [citado el 11 de julio de 2023];98(4):495–503. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951309/
6. Barreto FK de A, Alencar CH, Araújo FM de C, Oliveira R de MAB, Cavalcante JW, Lemos DRQ, et al. Seroprevalence, spatial dispersion and factors associated with flavivirus and chikungunha infection in a risk area: a population-based seroprevalence study in Brazil. BMC Infect Dis [Internet]. el 1 de diciembre de 2020 [citado el 20 de diciembre de 2022];20(1):1–14. Disponible en: https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-05611-5
7. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. N Engl J Med [Internet]. el 25 de septiembre de 2003 [citado el 1 de abril de 2022];349(13):1236–45. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14500806/
8. Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. Transfusion (Paris) [Internet]. 2002 [citado el 1 de abril de 2022];42(8):1019–26. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12385413/
9. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzel PS, Gregory KR, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. Transfusion (Paris) [Internet]. agosto de 2009 [citado el 1 de abril de 2022];49(SUPPL. 2):1S-29S. Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x
10. Morrison AC, Minnick SL, Rocha C, Forshey BM, Stoddard ST, Getis A, et al. Epidemiology of Dengue Virus in Iquitos, Peru 1999 to 2005: Interepidemic and Epidemic

Patterns of Transmission. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. mayo de 2010 [citado el 11 de mayo de 2022];4(5):e670. Disponible en: https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000670

11. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med [Internet]. el 11 de junio de 2009 [citado el 11 de mayo de 2022];360(24):2536–43. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19516034/
12. Mascarenhas M, Garasia S, Berthiaume P, Corrin T, Greig J, Ng V, et al. A scoping review of published literature on chikungunya virus. PLoS One [Internet]. el 1 de noviembre de 2018 [citado el 11 de mayo de 2022];13(11). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30496207/
13. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. Clin Infect Dis [Internet]. el 15 de diciembre de 2016 [citado el 1 de abril de 2022];63(12):1584–90. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578819/
14. De La Cruz-Hernández SI, Flores-Aguilar H, González-Mateos S, López-Martinez I, Alpuche-Aranda C, Ludert JE, et al. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. Am J Trop Med Hyg [Internet]. marzo de 2013 [citado el 1 de abril de 2022];88(3):446–54. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23339203/
15. Busch MP, Linnen JM, Vinelli E, Sabino EC, Tobler LH, Hyland C, et al. Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de julio de 2008 [citado el 11 de mayo de 2022];48(7):1355–62. Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1537-2995.2008.01772.x
16. Corman VM, Rasche A, Baronti C, Aldabbagh S, Cadar D, Reusken CBEM, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. Bull World Health Organ [Internet]. el 1 de diciembre de 2016 [citado el 1 de abril de 2022];94(12):880. Disponible en: /pmc/articles/PMC5153932/
17. Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, Chapuy-Regaud S, Delobel P, Martin-Blondel G, et al. Zika Virus Infection and Prolonged Viremia in Whole-Blood Specimens. Emerg Infect Dis [Internet]. el 1 de mayo de 2017 [citado el 11 de mayo de 2022];23(5):863–5. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28257281/

18. Riswari SF, Ma'roef CN, Djauhari H, Kosasih H, Perkasa A, Yudhaputri FA, et al. Study of viremic profile in febrile specimens of chikungunya in Bandung, Indonesia. J Clin Virol [Internet]. el 1 de enero de 2016 [citado el 1 de abril de 2022];74:61–5. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26679829/
19. Simmons G, Brès V, Lu K, Liss NM, Brambilla DJ, Ryff KR, et al. High Incidence of Chikungunya Virus and Frequency of Viremic Blood Donations during Epidemic, Puerto Rico, USA, 2014. Emerg Infect Dis [Internet]. el 1 de julio de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];22(7):1221–8. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27070192/
20. Regan DM, Markowitz MA. Updated Recommendations for Zika, Dengue, and Chikungunya Viruses. 2016 sep.
21. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. Euro Surveill [Internet]. el 14 de abril de 2014 [citado el 10 de enero de 2023];19(14). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24739982/
22. Motta IJF, Spencer BR, Cordeiro da Silva SG, Arruda MB, Dobbin JA, Gonzaga YBM, et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. N Engl J Med [Internet]. el 15 de septiembre de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];375(11):1101–3. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27532622/
23. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de julio de 2016 [citado el 28 de junio de 2023];56(7):1684–8. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27329551/
24. Saá P, Proctor M, Foster G, Krysztof D, Winton C, Linnen JM, et al. Investigational Testing for Zika Virus among U.S. Blood Donors. New England Journal of Medicine [Internet]. el 10 de mayo de 2018 [citado el 28 de junio de 2023];378(19):1778–88. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1714977
25. Ashshi AM. The prevalence of dengue virus serotypes in asymptomatic blood donors reveals the emergence of serotype 4 in Saudi Arabia. Virol J [Internet]. el 9 de junio de 2017 [citado el 11 de mayo de 2022];14(1). Disponible en: /pmc/articles/PMC5466713/
26. Beau F, Lastère S, Mallet HP, Mauguin S, Broult J, Laperche S. Impact on blood safety of the last arboviruses outbreaks in French Polynesia (2012–2018). Transfusion Clinique et Biologique. el 1 de febrero de 2020;27(1):4–9.

27. Tambyah PA, Koay ESC, Poon MLM, Lin RVTP, Ong BKC. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. N Engl J Med [Internet]. el 2 de octubre de 2008 [citado el 11 de mayo de 2022];359(14):1526–7. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18832256/
28. Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005 | HKMJ [Internet]. [citado el 3 de diciembre de 2023]. Disponible en: https://www.hkmj.org/abstracts/v14n3/170.htm
29. Magnus MM, Espósito DLA, Costa VA da, Melo PS de, Costa-Lima C, Fonseca BAL da, et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. Hematol Transfus Cell Ther [Internet]. el 1 de julio de 2018 [citado el 20 de diciembre de 2022];40(3):250–4. Disponible en: http://www.scielo.br/j/htct/a/WKm9tfpRsXmZ4QnWdrPyDht/?lang=en
30. Frieden TR, Harold Jaffe DW, Kent CK, Leahy MA, Martinroe JC, Spriggs SR, et al. Chikungunya Cases Identified Through Passive Surveillance and Household Investigations — Puerto Rico, May 5–August 12, 2014. Morbidity and Mortality Weekly Report [Internet]. el 12 de diciembre de 2014 [citado el 28 de junio de 2023];63(48):1121. Disponible en: /pmc/articles/PMC4584601/
31. Rico-Mendoza A, Porras-Ramírez A, Chang A, Encinales L, Lynch R. Co-circulation of dengue, chikungunya, and Zika viruses in Colombia from 2008 to 2018. Revista Panamericana de Salud Pública [Internet]. 2019 [citado el 31 de octubre de 2023];43. Disponible en: /pmc/articles/PMC6548069/
32. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. Biomédica [Internet]. el 29 de marzo de 2017 [citado el 11 de mayo de 2022];37(2):27–40. Disponible en: https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3769/3723
33. Castrillón JC, Castaño JC, Urcuqui S. Dengue en Colombia: diez años de evolución. Revista chilena de infectología [Internet]. 2015 [citado el 28 de junio de 2023];32(2):142–9. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182015000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
34. Gutierrez-Barbosa H, Medina-Moreno S, Zapata JC, Chua J V. Dengue Infections in Colombia: Epidemiological Trends of a Hyperendemic Country. Trop Med Infect Dis [Internet]. el 3 de octubre de 2020 [citado el 31 de octubre de 2023];5(4). Disponible en: /pmc/articles/PMC7709707/

35. Ospina ML, Tong VT, Gonzalez M, Valencia D, Mercado M, Gilboa SM, et al. Zika Virus Disease and Pregnancy Outcomes in Colombia. N Engl J Med [Internet]. el 8 de agosto de 2020 [citado el 28 de junio de 2023];383(6):537. Disponible en: /pmc/articles/PMC7480270/
36. Vidal OM, Acosta-Reyes J, Padilla J, Navarro-Lechuga E, Bravo E, Viasus D, et al. Chikungunya outbreak (2015) in the Colombian Caribbean: Latent classes and gender differences in virus infection. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. el 1 de junio de 2020 [citado el 28 de junio de 2023];14(6):1–18. Disponible en: /pmc/articles/PMC7304630/
37. Young PR, Ng LFP, Hall RA, Smith DW, Johansen CA. Arbovirus Infections. Manson's Tropical Diseases: Twenty-Third Edition. el 1 de enero de 2014;129-161.e3.
38. Young PR. Arboviruses: A Family on the Move. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2018 [citado el 11 de julio de 2023];1062:1–10. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29845521/
39. Anez G, Chancey C, Grinev A, Rios M. Dengue virus and other arboviruses: a global view of risks. ISBT Sci Ser [Internet]. el 1 de julio de 2012 [citado el 11 de julio de 2023];7(1):274–82. Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-2824.2012.01602.x
40. Figueiredo LTM. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. el 1 de septiembre de 2017 [citado el 11 de julio de 2023];50(5):583–4. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29160502/
41. Donalisio MR, Freitas ARR, Zuben APB Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. Rev Saude Publica [Internet]. 2017 [citado el 11 de julio de 2023];51. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28423140/
42. Torres JR, Orduna TA, Piña-Pozas M, Vázquez-Vega D, Sarti E. Epidemiological Characteristics of Dengue Disease in Latin America and in the Caribbean: A Systematic Review of the Literature. J Trop Med [Internet]. 2017 [citado el 11 de julio de 2023];2017. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28392806/
43. Slavov SN, Otaguiri KK, Kashima S, Covas DT. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. Braz J Med Biol Res [Internet]. el 29 de abril de 2016 [citado el 11 de julio de 2023];49(5). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27143174/

44. Jansen CC, Beebe NW. The dengue vector Aedes aegypti: what comes next. Microbes Infect [Internet]. abril de 2010 [citado el 11 de julio de 2023];12(4):272–9. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20096802/
45. Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB, Freier JE, Lien JC. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: Aedes albopictus and Aedes aegypti. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1983 [citado el 11 de julio de 2023];32(5):1108–19. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6625066/
46. Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, Tesh RB. Vertical Transmission of Zika Virus in Aedes aegypti Mosquitoes. Am J Trop Med Hyg [Internet]. el 1 de noviembre de 2016 [citado el 11 de julio de 2023];95(5):1169–73. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27573623/
47. Gardner LM, Chen N, Sarkar S. Global risk of Zika virus depends critically on vector status of Aedes albopictus. Lancet Infect Dis [Internet]. el 1 de mayo de 2016 [citado el 11 de julio de 2023];16(5):522–3. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26997578/
48. Paupy C, Ollomo B, Kamgang B, Moutailler S, Rousset D, Demanou M, et al. Comparative role of Aedes albopictus and Aedes aegypti in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. Vector Borne Zoonotic Dis [Internet]. el 1 de abril de 2010 [citado el 11 de julio de 2023];10(3):259–66. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19725769/
49. Mayer S V., Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. Acta Trop [Internet]. el 1 de febrero de 2017 [citado el 11 de julio de 2023];166:155. Disponible en: /pmc/articles/PMC5203945/
50. Chang HH, Huber RG, Bond PJ, Grad YH, Camerini D, Maurer-Stroh S, et al. Systematic analysis of protein identity between Zika virus and other arthropod-borne viruses. Bull World Health Organ [Internet]. el 7 de julio de 2017 [citado el 11 de julio de 2023];95(7):517. Disponible en: /pmc/articles/PMC5487971/
51. Thurner C, Witwer C, Hofacker IL, Stadler PF. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. J Gen Virol [Internet]. mayo de 2004 [citado el 11 de julio de 2023];85(Pt 5):1113–24. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15105528/
52. Coldbeck-Shackley RC, Eyre NS, Beard MR. The Molecular Interactions of ZIKV and DENV with the Type-I IFN Response. Vaccines (Basel) [Internet]. el 1 de septiembre de

2020 [citado el 11 de julio de 2023];8(3):1–21. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32937990/

53. Guzman MG, Harris E. Dengue. Lancet [Internet]. el 31 de enero de 2015 [citado el 2 de noviembre de 2023];385(9966):453–65. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25230594/
54. Hasan S, Jamdar SF, Alalowi M, Al Ageel Al Beaiji SM. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. J Int Soc Prev Community Dent [Internet]. el 1 de enero de 2016 [citado el 12 de julio de 2023];6(1):1. Disponible en: /pmc/articles/PMC4784057/
55. Salud OM de LE para I y C en ET. Dengue-Guias para el tratamiento, prevención y control. Marco FS, editor. Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology [Internet]. 2002 [citado el 11 de mayo de 2022];23(2):109–15. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44504/9789995479213_spa.pdf
56. Gupta V, Yadav TP, Pandey RM, Singh A, Gupta M, Kanaujiya P, et al. Risk factors of dengue shock syndrome in children. J Trop Pediatr. diciembre de 2011;57(6):451–6.
57. Modhiran N, Kalayanarooj S, Ubol S. Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. diciembre de 2010 [citado el 11 de mayo de 2022];4(12):1–12. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21200427/
58. Kou Z, Lim JYH, Beltramello M, Quinn M, Chen H, Liu S ng, et al. Human antibodies against dengue enhance dengue viral infectivity without suppressing type I interferon secretion in primary human monocytes. Virology [Internet]. el 5 de febrero de 2011 [citado el 11 de mayo de 2022];410(1):240–7. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21131015/
59. Song BH, Yun SI, Woolley M, Lee YM. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. J Neuroimmunol [Internet]. el 15 de julio de 2017 [citado el 11 de mayo de 2022];308:50–64. Disponible en: http://www.jni-journal.com/article/S0165572816304830/fulltext
60. Sirohi D, Kuhn RJ. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. J Infect Dis [Internet]. 2017 [citado el 11 de mayo de 2022];216(Suppl 10):S935. Disponible en: /pmc/articles/PMC5853281/
61. Lazear HM, Diamond MS. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. J Virol [Internet]. el 15 de mayo de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];90(10):4864–75. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26962217/

62. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. New England Journal of Medicine [Internet]. el 15 de diciembre de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];375(24):2321–34. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1602412
63. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. The Lancet [Internet]. el 9 de abril de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];387(10027):1531–9. Disponible en: http://www.thelancet.com/article/S0140673616005626/fulltext
64. Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz OG, Honório NA, Kuper H, et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. Int J Environ Res Public Health [Internet]. el 9 de enero de 2018 [citado el 11 de mayo de 2022];15(1):96. Disponible en: /pmc/articles/PMC5800195/
65. Priyamvada L, Hudson W, Ahmed R, Wrammert J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. Emerg Microbes Infect [Internet]. 2017 [citado el 11 de mayo de 2022];6(5). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28487557/
66. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ, Gorman MJ, et al. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. Cell [Internet]. el 11 de agosto de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];166(4):1016–27. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27475895/
67. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. Nature Immunology 2016 17:9 [Internet]. el 23 de junio de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];17(9):1102–8. Disponible en: https://www.nature.com/articles/ni.3515
68. Liu Y, Yuan Y, Zhang L. Innate immune evasion by alphaviruses. Front Immunol [Internet]. el 12 de septiembre de 2022 [citado el 3 de noviembre de 2023];13. Disponible en: /pmc/articles/PMC9510981/
69. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiol Rev [Internet]. septiembre de 1994 [citado el 4 de diciembre de 2023];58(3):491–562. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7968923/

70. Moizéis RNC, Fernandes TAA de M, Guedes PM da M, Pereira HWB, Lanza DCF, Azevedo JWV de, et al. Chikungunya fever: a threat to global public health. Pathog Glob Health [Internet]. el 19 de mayo de 2018 [citado el 4 de diciembre de 2023];112(4):182–94. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29806537/
71. Law YS, Utt A, Tan YB, Zheng J, Wang S, Chen MW, et al. Structural insights into RNA recognition by the Chikungunya virus nsP2 helicase. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. el 7 de mayo de 2019 [citado el 4 de diciembre de 2023];116(19):9558–67. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31000599/
72. Liu Y, Yuan Y, Zhang L. Innate immune evasion by alphaviruses. Front Immunol [Internet]. el 12 de septiembre de 2022 [citado el 4 de diciembre de 2023];13. Disponible en: /pmc/articles/PMC9510981/
73. Ahola T, McInerney G, Merits A. Alphavirus RNA replication in vertebrate cells. Adv Virus Res [Internet]. el 1 de enero de 2021 [citado el 4 de diciembre de 2023];111:111–56. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34663497/
74. Ramsey J, Mukhopadhyay S. Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. Viruses [Internet]. el 18 de febrero de 2017 [citado el 4 de diciembre de 2023];9(8). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28820485/
75. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1955 [citado el 11 de mayo de 2022];49(1):28–32. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14373834/
76. Ayu SM, Lai LR, Chan YF, Hatim A, Hairi NN, Ayob A, et al. Seroprevalence survey of Chikungunya virus in Bagan Panchor, Malaysia. Am J Trop Med Hyg [Internet]. diciembre de 2010 [citado el 11 de mayo de 2022];83(6):1245–8. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21118929/
77. Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. marzo de 2012 [citado el 11 de mayo de 2022];6(3). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22479654/
78. AbuBakar S, Sam IC, Wong PF, MatRahim NA, Hooi PS, Roslan N. Reemergence of endemic Chikungunya, Malaysia. Emerg Infect Dis. 2007;13(1):147–9.
79. Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. J Clin Invest [Internet]. el 1 de

marzo de 2017 [citado el 11 de mayo de 2022];127(3):737. Disponible en: /pmc/articles/PMC5330729/

80. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Villamil-Gómez W, Paniz-Mondolfi AE. How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America? Rheumatol Int [Internet]. el 1 de diciembre de 2015 [citado el 11 de mayo de 2022];35(12):2091–4. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26045218/
81. Javelle E, Ribera A, Degasne I, Gaüzère BA, Marimoutou C, Simon F. Specific management of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island from 2006-2012. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. el 11 de marzo de 2015 [citado el 11 de mayo de 2022];9(3). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25760632/
82. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. J Clin Invest [Internet]. el 1 de marzo de 2010 [citado el 11 de mayo de 2022];120(3):894–906. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20179353/
83. Lum FM, Couderc T, Chia BS, Ong RY, Her Z, Chow A, et al. Antibody-mediated enhancement aggravates chikungunya virus infection and disease severity. Sci Rep [Internet]. el 1 de diciembre de 2018 [citado el 11 de mayo de 2022];8(1). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29382880/
84. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2023. Informe evento, dengue, Colombia 2023, periodo epidemiológico XI.
85. GW D, SF K, AJ H. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1952 [citado el 12 de julio de 2023];46(5):509–20. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12995440/
86. MacNamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1954 [citado el 4 de diciembre de 2023];48(2):139–45. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13157159/
87. Hayes EB. Zika virus outside Africa. Emerg Infect Dis [Internet]. septiembre de 2009 [citado el 4 de diciembre de 2023];15(9):1347–50. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19788800/
88. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia,

2007. Emerg Infect Dis [Internet]. agosto de 2008 [citado el 4 de diciembre de 2023];14(8):1232–9. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18680646/

89. Cao-Lormeau VM, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. Lancet [Internet]. 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];384(9954):1571–2. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25443481/
90. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. Clin Microbiol Infect [Internet]. el 1 de octubre de 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];20(10):O595–6. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24909208/
91. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastãre S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. Euro Surveill [Internet]. 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];19(9). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24626205/
92. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. Emerg Infect Dis [Internet]. 2015 [citado el 4 de diciembre de 2023];21(2):381–2. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25625687/
93. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. Euro Surveill [Internet]. el 16 de octubre de 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];19(41). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25345518/
94. Pyke AT, Daly MT, Cameron JN, Moore PR, Taylor CT, Hewitson GR, et al. Imported zika virus infection from the cook islands into australia, 2014. PLoS Curr [Internet]. 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];6. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24944843/
95. Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Günther S, et al. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. J Clin Virol [Internet]. el 1 de febrero de 2015 [citado el 4 de diciembre de 2023];63:32–5. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25600600/
96. Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014 [corrected]. Euro Surveill [Internet]. enero de 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];19(4). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24507466/

97. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. Emerg Infect Dis [Internet]. el 1 de septiembre de 2015 [citado el 11 de mayo de 2022];21(10):1885–6. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26401719/
98. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep [Internet]. el 29 de enero de 2016 [citado el 4 de diciembre de 2023];65(3):55–8. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26820163/
99. Victora CG, Schuler-Faccini L, Matijasevich A, Ribeiro E, Pessoa A, Barros FC. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? Lancet [Internet]. el 13 de febrero de 2016 [citado el 4 de diciembre de 2023];387(10019):621–4. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26864961/
100. Pan American Health Organization and World Health Organization. Zika-Epidemiological Update. 2016 nov.
101. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2016. Boletín epidemiológico semanal, número 30 de 2016.
102. Cuevas EL, Tong VT, Rozo N, Valencia D, Pacheco O, Gilboa SM, et al. Preliminary Report of Microcephaly Potentially Associated with Zika Virus Infection During Pregnancy - Colombia, January-November 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep [Internet]. el 16 de diciembre de 2016 [citado el 4 de diciembre de 2023];65(49):1409–13. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27977645/
103. Instituto Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. Informe evento, Zika, Colombia 2023, periodo epidemiológico IX.
104. Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. J Hyg (Lond) [Internet]. 1956 [citado el 4 de diciembre de 2023];54(2):177–91. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13346078/
105. de Lima Cavalcanti TYV, Pereira MR, de Paula SO, Franca RF de O. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. Viruses [Internet]. el 1 de mayo de 2022 [citado el 4 de diciembre de 2023];14(5). Disponible en: /pmc/articles/PMC9147731/
106. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. Lancet [Internet]. el 1 de diciembre de 2007 [citado el 4 de diciembre de 2023];370(9602):1840–6. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18061059/

107. Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, De Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. Lancet [Internet]. 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];383(9916):514. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24506907/
108. Mehta R, Soares CN, Medialdea-Carrera R, Ellul M, da Silva MTT, Rosala-Hallas A, et al. The spectrum of neurological disease associated with Zika and chikungunya viruses in adults in Rio de Janeiro, Brazil: A case series. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. el 12 de febrero de 2018 [citado el 4 de diciembre de 2023];12(2). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29432457/
109. Castellanos JE, Jaimes N, Coronel-Ruiz C, Rojas JP, Mejía LF, Villarreal VH, et al. Dengue-chikungunya coinfection outbreak in children from Cali, Colombia in 2018-2019. Int J Infect Dis [Internet]. el 1 de enero de 2021 [citado el 4 de diciembre de 2023];102:97–102. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33075526/
110. Vista de Estimación del subregistro de casos de enfermedad por el virus del chikungunya en Girardot, Colombia, noviembre de 2014 a mayo de 2015 [Internet]. [citado el 31 de octubre de 2023]. Disponible en: https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3370/3765
111. Franklin IM. Blood transfusion safety: a new philosophy. Transfus Med [Internet]. diciembre de 2012 [citado el 4 de diciembre de 2023];22(6):377–82. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23171300/
112. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2010. Red Nacional de Sangre, Boletín Informativo No.2 “SALUD TRNASFUSIONAL”.
113. Association for the Advancement of Blood and Biotherapies. https://www.aabb.org/home. Donor Safety, Screening and Testing .
114. Medicines Agency E. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on epidemiological data on blood transmissible infections. 2016 [citado el 11 de mayo de 2022]; Disponible en: www.ema.europa.eu/contact
115. Association for the Advancement of Blood & Biotherapies. https://www.aabb.org/. DONOR SAFETY, SCREENING AND TESTING.
116. Levi JE, Nishiya A, Félix AC, Salles NA, Sampaio LR, Hangai F, et al. Real-time symptomatic case of transfusion-transmitted dengue. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de mayo de 2015 [citado el 11 de mayo de 2022];55(5):961–4. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25605570/
117. Oh HB, Muthu V, Daruwalla ZJ, Lee SY, Koay ES, Tambyah PA. Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical

patient. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de julio de 2015 [citado el 11 de mayo de 2022];55(7):1655–61. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25728040/

118. Appassakij H, Promwong C, Rujirojindakul P, Khuntikij P, Silpapojakul K. Risk of transfusion-transmitted chikungunya infection and efficacy of blood safety implementation measures: experience from the 2009 epidemic in Songkhla Province, Thailand. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de agosto de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];56(8):2100–7. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27362275/
119. Liao Q, Shan Z, Wang M, Huang J, Xu R, Huang K, et al. An evaluation of asymptomatic Dengue infections among blood donors during the 2014 Dengue outbreak in Guangzhou, China. J Med Virol [Internet]. el 1 de noviembre de 2017 [citado el 4 de diciembre de 2023];89(11):2037–40. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28639699/
120. Zeng P, Liao Q, Gao Z, He M, Rong X. Sero-prevalence and viremia status of dengue virus among asymptomatic blood donors post epidemic outbreak in Chinese Guangzhou in 2015. Transfus Med [Internet]. el 1 de diciembre de 2018 [citado el 4 de diciembre de 2023];28(6):468–9. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30074281/
121. Ho TS, Lin CF, Liu CC, Yeh TM, Anderson R, Lin YS. Lessons learned from dengue: Focus on Taiwan. Clinical Insights: Dengue: Transmission, Diagnosis & Surveillance [Internet]. el 1 de febrero de 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];49–64. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/295906662_Lessons_learned_from_dengue_Focus_on_Taiwan
122. Ranjan P, Natarajan V, Bajpai M, Gupta E. High Seroprevalence of Dengue Virus Infection in Blood Donors From Delhi: A Single Centre Study. J Clin Diagn Res [Internet]. el 1 de octubre de 2016 [citado el 4 de diciembre de 2023];10(10):DC08-DC10. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27891337/
123. Busch MP, Sabino EC, Brambilla D, Lopes ME, Capuani L, Chowdhury D, et al. Duration of Dengue Viremia in Blood Donors and Relationships Between Donor Viremia, Infection Incidence and Clinical Case Reports During a Large Epidemic. J Infect Dis [Internet]. el 1 de julio de 2016 [citado el 4 de diciembre de 2023];214(1):49–54. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27302934/
124. Saa P, Chiu C, Grimm K, Yu G, Benjamin RJ, Corash L, et al. Acute Zika virus infection in an asymptomatic blood donor at the onset of the Puerto Rico epidemic. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de octubre de 2019 [citado el 4 de diciembre de 2023];59(10):3164–70. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31407817/

125. Stramer SL, Stanley J, Nguyen ML, Bertuzis R, Huynh N, Duncan JR, et al. Duplex nucleic acid test for the detection of chikungunya and dengue RNA viruses in blood donations. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de abril de 2019 [citado el 4 de diciembre de 2023];59(4):1283–90. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30610766/
126. Beau F, Lastère S, Mallet HP, Mauguin S, Broult J, Laperche S. Impact on blood safety of the last arboviruses outbreaks in French Polynesia (2012-2018). Transfus Clin Biol [Internet]. el 1 de febrero de 2020 [citado el 4 de diciembre de 2023];27(1):4–9. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31889619/
127. Zheng X, Zeng J, Xu X, Liu Y, Heng L, Wen X, et al. A preliminary survey of Zika virus infection by nucleic acid test in the volunteer blood donor samples in Shenzhen China. J Med Virol [Internet]. el 1 de agosto de 2020 [citado el 4 de diciembre de 2023];92(8):1326–9. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31829444/
128. Slavov SN, Gonzaga FAC, Pimentel BMS, Ramos D do AR, de Araújo WN, Covas DT, et al. Zika virus RNA surveillance in blood donors in the Federal District of Brazil during the 2016 outbreak. Hematol Transfus Cell Ther [Internet]. el 1 de octubre de 2020 [citado el 4 de diciembre de 2023];42(4):394–6. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31843542/
129. Slavov SN, Hespanhol MR, Rodrigues ES, Levi JE, Ubiali EMA, Covas DT, et al. Zika virus RNA detection in asymptomatic blood donors during an outbreak in the northeast region of São Paulo State, Brazil, 2016. Transfusion (Paris) [Internet]. 2017 [citado el 4 de diciembre de 2023];57(12):2897–901. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28921551/
130. Fedyk CG, Shahin GM, Hill R, Cap AP. Screening for Zika virus in US armed services blood program donors: An opportunity to compare emerging infectious disease risk between the general US population and military donors. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de mayo de 2023 [citado el 4 de diciembre de 2023];63 Suppl 3(S3):S249–55. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37097201/
131. Chiu CY, Bres V, Yu G, Krysztof D, Naccache SN, Lee D, et al. Genomic Assays for Identification of Chikungunya Virus in Blood Donors, Puerto Rico, 2014. Emerg Infect Dis [Internet]. el 23 de julio de 2015 [citado el 4 de diciembre de 2023];21(8):1409–13. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26196378/
132. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2021. Informe evento, dengue, Colombia 2021, periodo epidemiológico XIII.

133. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2022. Informe evento, dengue, Colombia 2022, periodo epidemiológico XIII.
134. Calvo EP, Sánchez-Quete F, Durán S, Sandoval I, Castellanos JE. Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and zika viruses in febrile patients. Acta Trop [Internet]. el 1 de noviembre de 2016 [citado el 11 de mayo de 2022];163:32–7. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27477452/
135. Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, et al. Presence of Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) and its natural infection with dengue virus at unrecorded heights in Colombia. Biomedica [Internet]. 2016 [citado el 31 de octubre de 2023];36(2):303–8. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27622492/
136. Sahai H, Khurshid A. Statistics in epidemiology : methods, techniques, and applications. Boca Raton: CRC Press; 1996.
137. Gimenez-Richarte A, De Salazar MO, Arbona C, Gimenez-Richarte MP, Collado M, Fernandez PL, et al. Prevalence of Chikungunya, Dengue and Zika viruses in blood donors: a systematic literature review and meta-analysis. Blood Transfusion [Internet]. el 1 de julio de 2022 [citado el 4 de diciembre de 2023];20(4):267. Disponible en: /pmc/articles/PMC9256504/
138. Slavov SN, Hespanhol MR, Ferreira AR, Rodrigues ES, Covas DT, Kashima S. Silent dengue virus circulation among asymptomatic blood donors from a hyperendemic Brazilian region. Transfus Med [Internet]. el 1 de diciembre de 2018 [citado el 21 de octubre de 2023];28(6):465–7. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29542218/
139. Slavov SN, Cilião-Alves DC, Gonzaga FAC, Moura DR, de Moura ACAM, de Noronha LAG, et al. Dengue seroprevalence among asymptomatic blood donors during an epidemic outbreak in Central-West Brazil. PLoS One [Internet]. el 1 de marzo de 2019 [citado el 21 de octubre de 2023];14(3). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30908528/
140. Sharma R, Costa Santos L, da Silva RA, Gonçalves C V., de Melo Calado S, Santos DP, et al. Surveillance of donated blood during the 2016 arbovirus outbreak in Brazil. J Med Virol [Internet]. el 1 de agosto de 2018 [citado el 21 de octubre de 2023];90(8):1406–10. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29667206/
141. Schmid P, Tong M, Conrad A, McHutchison J, Blatt LM. Analysis of the viability of freezer stored serum samples for hepatitis C virus RNA analysis by the SUPERQUANT®

method: results of a 16 year retrospective study. J Virol Methods. el 1 de octubre de 1999;82(2):201–6.

142. Halfon P, Khiri H, Gerolami V, Bourliere M, Feryn JM, Reynier P, et al. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. J Hepatol [Internet]. 1996 [citado el 21 de octubre de 2023];25(3):307–11. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8895009/
143. Sharifdini M, Mirhendi H, Ashrafi K, Hosseini M, Mohebali M, Khodadadi H, et al. Comparison of Nested Polymerase Chain Reaction and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Parasitological Methods for Detection of Strongyloides stercoralis in Human Fecal Samples. Am J Trop Med Hyg [Internet]. el 12 de diciembre de 2015 [citado el 25 de octubre de 2023];93(6):1285. Disponible en: /pmc/articles/PMC4674247/
144. Comparison of the Specificity and Sensitivity of PCR, Nested PCR, and Real-Time PCR for the Diagnosis of Histomoniasis on JSTOR [Internet]. [citado el 25 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.jstor.org/stable/4099101
145. Manuel CS, Suther C, Moore MD, Jaykus LA. Comparison of a one-step real-time RT-PCR and a nested real-time RT-PCR for a genogroup II norovirus reveals differences in sensitivity depending upon assay design and visualization. PLoS One [Internet]. el 1 de abril de 2021 [citado el 25 de octubre de 2023];16(4):e0248581. Disponible en: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0248581
146. Jalal S, Hwang SY, Kim CM, Kim DM, Yun NR, Seo JW, et al. Comparison of RT-PCR, RT-nested PCRs, and real-time PCR for diagnosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome: a prospective study. Scientific Reports 2021 11:1 [Internet]. el 18 de agosto de 2021 [citado el 25 de octubre de 2023];11(1):1–8. Disponible en: https://www.nature.com/articles/s41598-021-96066-4
147. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2021. Informe evento, chikungunya, Colombia 2021, periodo epidemiológico XIII.
148. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2022. Informe evento, chikungunya, Colombia 2022, periodo epidemiológico XIII.
149. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2021. Informe evento, Zika, Colombia 2021, periodo epidemiológico XIII.
150. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2022. Informe evento, Zika, Colombia 2022, periodo epidemiológico XIII.

151. Martinez JD, Garza JAC de la, Cuellar-Barboza A. Going Viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue. Dermatol Clin [Internet]. el 1 de enero de 2019 [citado el 31 de octubre de 2023];37(1):95–105. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30466692/
152. Gurevitz JM, Antman JG, Laneri K, Morales JM. Temperature, traveling, slums, and housing drive dengue transmission in a non-endemic metropolis. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. el 1 de junio de 2021 [citado el 31 de octubre de 2023];15(6). Disponible en: /pmc/articles/PMC8221794/
153. Rueda JC, Santos AM, Angarita JI, Giraldo RB, Saldarriaga EL, Ballesteros Muñoz JG, et al. Demographic and clinical characteristics of chikungunya patients from six Colombian cities, 2014–2015. Emerg Microbes Infect [Internet]. el 1 de enero de 2019 [citado el 31 de octubre de 2023];8(1):1490. Disponible en: /pmc/articles/PMC6819954/
154. Cáceres M BA. ANÁLISIS DE LA PREVALENCIA DE DENGUE, ZIKA Y CHIKUNGUNYA EN DONANTES PROVENIENTES DE LA RED NACIONAL DE BANCOS DE SANGRE DE LA CRUZ ROJA COLOMBIANA. [Bogotá]: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca ; 2020.
155. Simmons G, Brès V, Lu K, Liss NM, Brambilla DJ, Ryff KR, et al. High Incidence of Chikungunya Virus and Frequency of Viremic Blood Donations during Epidemic, Puerto Rico, USA, 2014. Emerg Infect Dis [Internet]. el 1 de julio de 2016 [citado el 5 de diciembre de 2023];22(7):1221–8. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27070192/
156. Chevalier MS, Biggerstaff BJ, Basavaraju S V., Bañez Ocfemia MC, Alsina JO, Climent-Peris C, et al. Use of Blood Donor Screening Data to Estimate Zika Virus Incidence, Puerto Rico, April-August 2016. Emerg Infect Dis [Internet]. el 1 de mayo de 2017 [citado el 5 de diciembre de 2023];23(5):790–5. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28263141/
157. Busch MP, Sabino EC, Brambilla D, Lopes ME, Capuani L, Chowdhury D, et al. Duration of Dengue Viremia in Blood Donors and Relationships Between Donor Viremia, Infection Incidence and Clinical Case Reports During a Large Epidemic. J Infect Dis [Internet]. el 1 de julio de 2016 [citado el 5 de diciembre de 2023];214(1):49–54. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27302934/
158. Sabino E, Loureiro P, Lopes M, Capuani L, Oliveira C, Oliveira L, et al. Dengue RNA Among Blood Donors and Recipients During Large Epidemics of Denv-4 in Rio de Janeiro and Recife, Brazil [Internet]. RTI International. P.O. Box 12194, Research Triangle Park, NC 27709-2194. Tel: 919-541-6000; e-mail: publications@rit.org; Web

site: http://www.rti.org; 2013 [citado el 19 de agosto de 2023]. Disponible en: https://www.rti.org/publication/dengue-rna-among-blood-donors-and-recipients-during-large-epidemics-denv-4-rio-de-0

159. Mohammed H, Linnen JM, Muhoz-Jorddn JL, Tomashek K, Foster G, Broulik AS, et al. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. Transfusion (Paris) [Internet]. julio de 2008 [citado el 15 de octubre de 2023];48(7):1348–54. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18503611/
160. Dias LL, Amarilla AA, Poloni TR, Covas DT, Aquino VH, Figueiredo LTM. Detection of dengue virus in sera of Brazilian blood donors. Transfusion (Paris) [Internet]. 2012 [citado el 15 de octubre de 2023];52(8):1667–71. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22670858/
161. Tsai JJ, Lin PC, Tsai CY, Wang YH, Liu LT. Low frequency of asymptomatic dengue virus-infected donors in blood donor centers during the largest dengue outbreak in Taiwan. PLoS One [Internet]. el 1 de octubre de 2018 [citado el 15 de octubre de 2023];13(10). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30296301/
162. Escoval MASGFBSAPAMJNMSMKCR. Dengue outbreak in Madeira Island (Portugal). Blood safety measures. Vox Sang. 2013;105:192–3.
163. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2019. Informe evento, dengue, Colombia 2019 .
164. Carrillo-Hernández MY, Ruiz-Saenz J, Villamizar LJ, Gómez-Rangel SY, Martínez-Gutierrez M. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. BMC Infect Dis [Internet]. el 30 de enero de 2018 [citado el 31 de octubre de 2023];18(1):1–12. Disponible en: https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-2976-1
165. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2019. Informe evento, Zika y chikungunya, Colombia 2019 .
166. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2020. Informe evento, Zika, Colombia 2020.
167. Instituo Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/Paginas/Inicio.aspx. 2020. Informe evento, chikungunya, Colombia 2020 .
168. Frota CC, Correia FGS, Alves Vasconcelos LR, de Sousa PRC, Ferreira ML da S, Saraiva SP, et al. Positivity of dengue, chikungunya, and Zika infections in women in Northeast Brazil post-Zika epidemic. Pathog Glob Health [Internet]. 2023 [citado el 31 de

octubre de 2023];117(5):485–92. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36316985/

169. More MDPM, Castañeda C, Suyón M. [New altitudinal registration of Aedes aegypti in the region of Piura, Peru]. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. el 1 de julio de 2018 [citado el 31 de octubre de 2023];35(3):536–7. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30517515/
170. Mercier A, Obadia T, Carraretto D, Velo E, Gabiane G, Bino S, et al. Impact of temperature on dengue and chikungunya transmission by the mosquito Aedes albopictus. Scientific Reports 2022 12:1 [Internet]. el 28 de abril de 2022 [citado el 31 de octubre de 2023];12(1):1–13. Disponible en: https://www.nature.com/articles/s41598-022-10977-4
171. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis [Internet]. agosto de 2008 [citado el 10 de diciembre de 2023];14(8):1232–9. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18680646/
172. Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, Peyrefitte CN. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. J Virol Methods [Internet]. marzo de 2005 [citado el 10 de diciembre de 2023];124(1–2):65–71. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15664052/
173. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2013 [citado el 10 de diciembre de 2023];7(7). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23875046/
174. Instituo de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue . Habana, Cuba; 2011. 30–34 p.
175. dos Anjos Souza AB, Thomazelli V, Figueiredo LTM. Chikungunya and Mayaro infective viruses in components of blood. Transfus Med [Internet]. el 1 de junio de 2022 [citado el 14 de diciembre de 2023];32(3):252–5. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35266221/
176. Roth H, Schneider L, Eberle R, Lausen J, Modlich U, Blümel J, et al. Zika virus infection studies with CD34+ hematopoietic and megakaryocyte-erythroid progenitors, red blood cells and platelets. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de marzo de 2020 [citado el 14 de diciembre de 2023];60(3):561–74. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32086956/

177. Sutherland MR, Simon AY, Serrano K, Schubert P, Acker JP, Pryzdial ELG. Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units. Transfusion (Paris) [Internet]. el 1 de mayo de 2016 [citado el 14 de mayo de 2022];56(5):1129–37. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26779802/
178. Jain A, Mittal S, Tripathi LP, Nussinov R, Ahmad S. Host-pathogen protein-nucleic acid interactions: A comprehensive review. Comput Struct Biotechnol J [Internet]. el 1 de enero de 2022 [citado el 14 de diciembre de 2023];20:4415. Disponible en: /pmc/articles/PMC9420432/
179. Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2002 [citado el 14 de diciembre de 2023];293(5):1364–9. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12054664/
180. Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. Nat Microbiol [Internet]. el 1 de noviembre de 2017 [citado el 14 de diciembre de 2023];2(11):1462. Disponible en: /pmc/articles/PMC5997390/
181. Vielle NJ, Zumkehr B, García-Nicolás O, Blank F, Stojanov M, Musso D, et al. Silent infection of human dendritic cells by African and Asian strains of Zika virus. Scientific Reports 2018 8:1 [Internet]. el 3 de abril de 2018 [citado el 14 de diciembre de 2023];8(1):1–12. Disponible en: https://www.nature.com/articles/s41598-018-23734-3
182. Felipe VLJ, Paula A V, Silvio UI. Chikungunya virus infection induces differential inflammatory and antiviral responses in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Acta Trop. el 1 de noviembre de 2020;211:105619.
183. Fernandes-Santos C, de Azeredo EL. Innate Immune Response to Dengue Virus: Toll-like Receptors and Antiviral Response. Viruses [Internet]. el 1 de mayo de 2022 [citado el 14 de diciembre de 2023];14(5). Disponible en: /pmc/articles/PMC9147118/
184. Sabino EC, Loureiro P, Esther Lopes M, Capuani L, McClure C, Chowdhury D, et al. Editor's choice: Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. J Infect Dis [Internet]. el 3 de marzo de 2016 [citado el 19 de diciembre de 2023];213(5):694. Disponible en: /pmc/articles/PMC4747611/
185. Liu CC, Huang KJ, Huang MC, Lin JJ, Wang SM, Liu JJ, et al. High Case-Fatality Rate of Adults With Dengue Hemorrhagic Fever During An Outbreak In Non-Endemic Taiwan: Risk Factors For Dengue-Infected Elders. Am J Infect Dis [Internet]. el 31 de marzo de

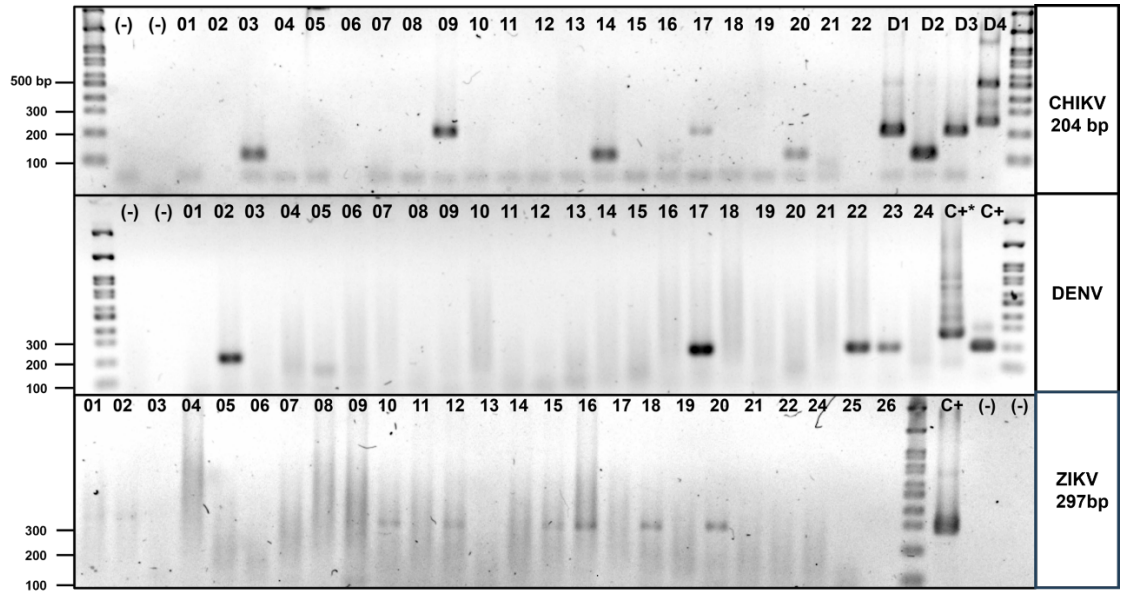
2008 [citado el 19 de diciembre de 2023];4(1):10–7. Disponible en: https://thescipub.com/abstract/ajidsp.2008.10.17

186. Oliveros J. DISPONIBILIDAD Y USO DE SANGRE Y SUS HEMOCOMPONENTES EN LA CIUDAD DE VALLEDUPAR. [Bucaramanga]: Universidad de Santander, UDES; 2017.

187. Tsetsarkin KA, Sampson-Johannes A, Sawyer L, Kinsey J, Higgs S, Vanlandingham DL. Photochemical Inactivation of Chikungunya Virus in Human Apheresis Platelet Components by Amotosalen and UVA Light. Am J Trop Med Hyg [Internet]. el 6 de junio de 2013 [citado el 14 de diciembre de 2023];88(6):1163. Disponible en: /pmc/articles/PMC3752818/

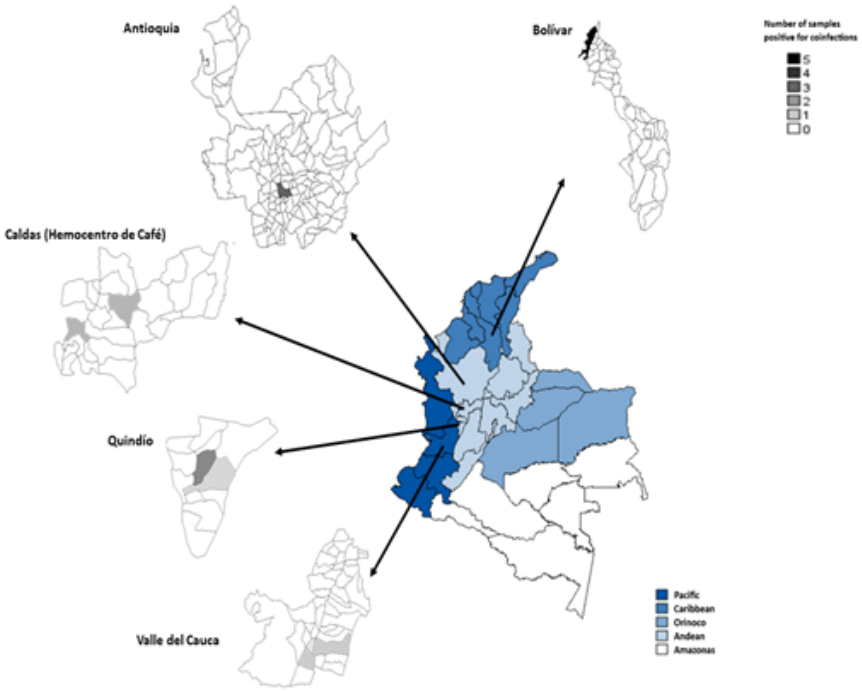
Anexos

Anexo 1. Detección de DENV, ZIKV y CHIKV en sueros de donantes de sangre por RT-PCR Semi-Anidada multiplex.



Detección de DENV, ZIKV y CHIKV en sueros de donantes de sangre por RT-PCR Semi-Anidada multiplex. *Los productos específicos de DENV, ZIKV y CHIKV se separaron en un gel de agarosa al 2% y fueron teñidos con bromuro de etidio, se utilizó un marcador de peso molecular de ADN (escalera de 100 pb) para verificar el tamaño del amplicón. Los sueros de pacientes se encuentran entre los carriles 01-26, controles negativos: (-), controles positivos: D1, D2, D3, D4 y C+. C+* DNA plasmídico utilizado como control interno de laboratorio.*

Anexo 2. Mapa político de las regiones colombianas resaltando los departamentos y municipios en los que se observaron coinfecciones arbovirales durante el brote de dengue 2019-2020).



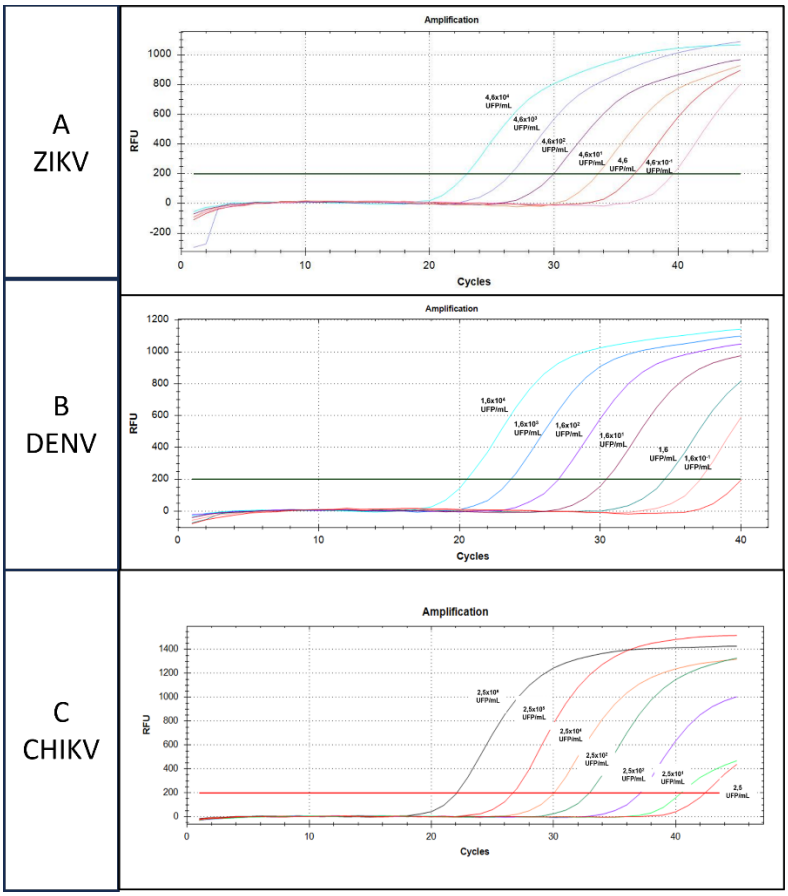
Los colores del gradiente en el mapa representan el número de muestras positivas para la coinfección.

Anexo 3. Relación entre el titulo viral expresado en UFP/mL y el número de copias genómicas de cosechas virales de DENV, ZIKV y CHIKV

Virus	Titulo viral (UFP/mL)	Copias genómicas/ mL
DENV-2	1,6X104	$5{,}929 \times 10^{9}$
	1,6X103	$6{,}851 \times 10^{8}$
	1,6X102	$6{,}559 \times 10^{7}$
	1,6X101	$6{,}31 \times 10^{6}$
	1,6	$3{,}6 \times 10^{5}$
	1,6X10-1	$6{,}2 \times 10^{4}$

ZIKV	4,6X104	5.84 $x10^{8}$
	4,6X103	4,67 $x10^{7}$
	4,6X102	3,89 $x10^{6}$
	4,6X101	3,069 $x10^{5}$
	4,6	3,78 $x10^{4}$
	4,6X10-1	3,98$x10^{3}$
CHIKV	2,5x106	1,7$x10^{10}$
	2,5x105	6,18$x10^{8}$
	2,5x104	7,17$x10^{7}$
	2,5x103	1,05$x10^{7}$
	2,5x102	6,7$x10^{2}$
	2,5x101	3,83$x10^{1}$
	2,5	2,7$x10^{1}$

Anexo 4. Amplificación de virus dengue, Zika y chikungunya por RT-qPCR



Anexo 5. Conteos celulares y parámetros hematológicos de la unidad de plaquetas y glóbulos rojos enviada al Instituto de Virología de la Universidad el Bosque

Nombre:
ID muest: 230151951CUP
Dpt.:
Apellido:
Tipo de paciente:
Tiempo de análisis: 24/08/2023 10:39
Sexo:
ID pac:
Modo:

	Módulos		Result	Unid	Grupo de ref.
1	WBC	B	0.1	10^3/uL	4.1 - 12.0
2	Lymph#		*****	10^3/uL	0.9 - 4.2
3	Mid#		*****	10^3/uL	0.1 - 1.7
4	Gran#		*****	10^3/uL	1.8 - 7.9
5	Lymph%		*****	%	18.0 - 45.0
6	Mid%		*****	%	1.0 - 17.0
7	Gran%		*****	%	40.0 - 78.0
8	RBC	B	0.02	10^6/uL	4.20 - 6.20
9	HGB	B	0.0	g/dL	14.3 - 19.8
10	HCT	B	0.0	%	41.5 - 59.0
11	MCV		*****	fL	80.0 - 100.0
12	MCH		*****	pg	27.0 - 32.0
13	MCHC		*****	g/dL	32.0 - 36.0
14	RDW-CV		*****	%	11.8 - 16.2
15	RDW-SD		*****	fL	35.0 - 56.0
16	PLT		383	10^3/uL	150 - 500
17	MPV		*****	fL	6.4 - 12.0
18	PDW		*****		15.6 - 17.7
19	PCT		*****	%	0.200 - 0.360
20	P-LCC		*****	10^3/uL	30 - 90
21	P-LCR		*****	%	11.0 - 45.0

Unidad de Plaquetas filtrada por aféresis

Nombre:
ID muest: 230180383A
Dpt.:
Apellido:
Tipo de paciente:
Tiempo de análisis: 24/08/2023 14:58
Sexo:
ID pac:
Modo:

	Módulos		Result	Unid	Grupo de ref.
1	WBC	B	0.0	10^3/uL	3.8 - 12.6
2	Lymph#	B	0.0	10^3/uL	0.9 - 4.2
3	Mid#	B	0.0	10^3/uL	0.1 - 1.7
4	Gran#	B	0.0	10^3/uL	1.8 - 7.9
5	Lymph%		30.3	%	20.0 - 46.5
6	Mid%		14.5	%	1.0 - 17.0
7	Gran%		55.2	%	40.0 - 78.0
8	RBC	A	6.09	10^6/uL	3.70 - 5.60
9	HGB		17.8	g/dL	13.3 - 17.8
10	HCT	A	53.3	%	38.5 - 53.0
11	MCV		87.6	fL	80.0 - 100.0
12	MCH		29.3	pg	27.0 - 32.0
13	MCHC		33.4	g/dL	32.0 - 36.0
14	RDW-CV		12.6	%	11.8 - 16.8
15	RDW-SD		38.7	fL	35.0 - 56.0
16	PLT	B	7	10^3/uL	150 - 500
17	MPV		9.2	fL	6.8 - 11.2
18	PDW	A	19.7		15.5 - 17.7
19	PCT	B	0.007	%	0.300 - 0.360
20	P-LCC		*****	10^3/uL	30 - 90
21	P-LCR		*****	%	11.0 - 45.0

Unidad de Glóbulos Rojos

20211690083661

DIRGCS

Bogotá D.C., 01-03-2021

Doctor
FÉLIX GIOVANNI DELGADO TIRIA
Investigador principal
fdelgadot@unbosque.edu.co
Universidad El Bosque
Bogotá

Asunto: Supervisión Proyecto: "Detección de virus dengue y otros arbovirus en donantes de sangre en Colombia: prevalencia de la infección y caracterización genómica de cepas virales aisladas". Código: 130884467713. Contrato 898-2019 – Vinculación de personal

Respetado doctor Delgado,

En atención a su solicitud radicada en Minciencias con el número 20212430060942, del 24 de febrero de 2021, relacionada con el proyecto del asunto investigación, con la que se solicita la vinculación del estudiante de maestría Brian Alejandro Cáceres Munar, el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación le informa que aprueba la solicitud, teniendo en cuenta que el profesional que se relaciona cumple con lo técnica y presupuestalmente establecido.

Los cambios aprobados y condiciones de contratación son las siguientes:

www.minciencias.gov.co

Nombres y apellidos	Rol	Dedicación	Financiación			
		Meses	MINCIENCIAS	Contrapartida	Rubro	Remuneración mensual
Brian Alejandro Cáceres Munar	Vinculación estudiante de maestría	12	$15.000.000	$0	Personal científico	$1.250.000

Agradecemos de antemano la participación en el seguimiento de este proyecto de investigación, y quedamos atentos a sus comentarios e inquietudes.

Cordialmente,

NELSON DAVID GUTIÉRREZ OLAYA
Director de Inteligencia de Recursos de la CTeI

Revisó: Mónica Castiblanco / Contratista / Dirección de Inteligencia de Recursos de la CTeI
Elaboró: Liliana Rosero / Contratista / Dirección de Inteligencia de Recursos de la CTeI

Vigilada Mineducación

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Facultad de Ciencias
EL SUSCRITO DIRECTOR DE LA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
Registro Calificado Ministerio de Educación 52068
(Resolución 15460 de diciembre 18 de 2019)

Hace constar que **BRIAN ALEJANDRO CACERES MUNAR,** identificado con Cédula de Ciudadanía No. 1233898046 de Bogotá, se encuentra cursando el cuarto semestre del programa de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad El Bosque.

El estudiante se encuentra vinculado al proyecto: "*Detección de virus dengue y otros arbovirus en donantes de sangre en Colombia: prevalencia de la infección y caracterización genómica de cepas virales aisladas"* (Código 130884467713, Convocatoria 844 de 2019 Número de Contrato 898-2019, Minciencias) en el grupo de Virología de la Universidad El Bosque, proyecto dirigido por el profesor Félix Giovanni Delgado, PhD, como investigador principal.

En el marco de este proyecto el estudiante desarrolla su trabajo de grado titulado: ANÁLISIS DEL RIESGO EN LA SEGURIDAD TRANSFUSIONAL DEBIDO A LA CIRCULACIÓN DE ARBOVIRUS EN COLOMBIA.

La presente certificación se expide a solicitud de la interesada, en Bogotá D.C., el veintitrés (23) de enero (01) del año dos mil veinticuatro (2024).

FACULTAD DE CIENCIAS POSTGRADOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

JAIME EDUARDO CASTELLANOS P.
Director
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
mcienciasb@unbosque.edu.co

20221690096421

DIRGCS

Bogotá D.C., 25-03-2022

Doctor
FÉLIX GIOVANNI DELGADO TIRIA
Investigador principal
fdelgadot@unbosque.edu.co
Universidad El Bosque
Bogotá, D.C.

Asunto: Supervisión proyecto "Detección de virus dengue y otros Arbovirus en donantes de sangre en Colombia: prevalencia de la infección y caracterización genómica de cepas virales aisladas", código: 130884467713, contrato 898-2019. Respuesta a vinculación de personal.

Respetado Doctor:

En atención a su comunicación con radicado 20222430014172 del 19-01-2022, en la cual solicita autorización para vincular a la estudiante de maestría Lenny Marcela Hernández Rico por un periodo de doce meses en el proyecto de la referencia, el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación – Minciencias, le informa que una vez estudiada su solicitud, autoriza la vinculación de la estudiante de maestría Lenny Marcela Hernández, teniendo en cuenta que su perfil se ajusta a las actividades por desarrollar en el marco del proyecto y que hace parte de los productos establecidos en el memorando de solicitud de elaboración del contrato con radicado 20197140419383 del 04-12-2019. Sin embargo, se aclara que solo es posible autorizar su financiación por un periodo de nueve meses, considerando que el proyecto finaliza el 27-12-2022. En la siguiente tabla se detallan las condiciones de participación:

Nombre	CVLAC	Rol / Perfil	Funciones	Dedicación	Vinculación		Financiación			
				Meses	Inicio	Fin	Minciencias	Contrapartida	Rubro	Asignación mensual
Lenny Marcela Hernández Rico	Hoja de vida	Estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas	Procesamiento de muestras, análisis y discusión de resultados y preparación de manuscritos para publicación. Producto: Documento que certifique que el trabajo de grado se realiza en el marco del proyecto, expedido por la autoridad en investigación de la Institución educativa y el informe de las actividades realizadas.	9	Abril 2022	Diciembre 2022	$11.250.000	$0	Personal científico	$1.250.000

Se precisa que se genera un saldo disponible para el financiamiento de la estudiante de maestría por valor de $3.750.000, cuya ejecución deberá ser autorizada previamente por Minciencias. Se recuerda que según los términos de referencia de la Convocatoria 807-2018, los recursos asignados para la formación de Alto Nivel (Maestría en el rubro de "Personal

científico" o Doctorado en el rubro de "Apoyo a la formación de estudiante de doctorado"), deben ser ejecutados exclusivamente en estas destinaciones.

Asimismo, se recuerda que todo cambio, ya sea en la conformación del equipo de investigación, personal administrativo, rubros, metodológico y/o en los compromisos contractualmente adquiridos, debe ser consultado oportunamente y aprobado por Minciencias antes de su ejecución a través de comunicación formal.

Agradezco la atención prestada y el compromiso con el desarrollo del proyecto.

Cordialmente,

JUAN DE JESÚS REYES RODRÍGUEZ
Director de Inteligencia de Recursos de la CTeI

Elaboró: Katherine León /Contratista/ Dirección Inteligencia de Recursos de la CTeI
Revisó: Katherine León /Contratista/ Dirección Inteligencia de Recursos de la CTeI

Copia: Eduard Alberto García Galeano / Vicerrector de Investigación y Extensión Académica / eduardgarcia@itm.edu.co

Vigilada Mineducación

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
Facultad de Ciencias
EL SUSCRITO DIRECTOR DE LA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
Registro Calificado Ministerio de Educación 52068
(Resolución 15460 de diciembre 18 de 2019)

Hace constar que **LENNY MARCELA HERNANDEZ RICO,** identificado con cédula de ciudadanía No. 1014188008 de Bogotá, se encuentra cursando el cuarto semestre del programa de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas de la Universidad El Bosque.

El estudiante se encuentra vinculado al proyecto: "*Detección de virus dengue y otros arbovirus en donantes de sangre en Colombia: prevalencia de la infección y caracterización genómica de cepas virales aisladas"* (Código 130884467713, Convocatoria 844 de 2019 Número de Contrato 898-2019, Minciencias) en el grupo de Virología de la Universidad El Bosque, proyecto dirigido por el profesor Félix Giovanni Delgado, PhD, como investigador principal.

En el marco de este proyecto el estudiante desarrolla su proyecto titulado: Caracterización Genómica de aislados colombianos de virus Dengue.

La presente certificación se expide a solicitud de la interesada, en Bogotá D.C., el veintitrés (23) de enero (01) del año dos mil veinticuatro (2024).

FACULTAD DE CIENCIAS POSTGRADOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

JAIME EDUARDO CASTELLANOS P.
Director
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
mcienciasb@unbosque.edu.co

UNIVERSIDAD
EL BOSQUE

EN ATENCIÓN A QUE:

OSCAR LEONARDO VANEGAS MONCADA

CÉDULA DE CIUDADANÍA No. 1.032.494.908 EXPEDIDA EN BOGOTA D.C.

CUMPLIÓ CON LOS REQUISITOS LEGALES Y ACADÉMICOS EXIGIDOS POR LA INSTITUCIÓN,
LE CONFIERE EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

DADO EN BOGOTÁ D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA, EL DÍA 12 DE OCTUBRE DE 2022

RECTORA

PRESIDENTE DEL CONSEJO DIRECTIVO

DECANO

SECRETARIA GENERAL

Personería Jurídica Resolución No. 11153 del 4 de agosto de 1978 expedida por el Ministerio de Educación Nacional.

31552

Registro 31710 Folio 1915 Vigilada Mineducación

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido

ACTA DE GRADO

El Consejo Directivo de la Universidad El Bosque, en su sesión del día 12 de octubre del año 2022, según consta en el Acta No. 1251 y Acuerdo No. 17505 de la misma fecha, estudió y aprobó la solicitud del aspirante a grado, alumno (a)

OSCAR LEONARDO VANEGAS MONCADA
C.C. No. 1.032.494.908 DE BOGOTA D.C.

quien cumplió satisfactoriamente con todos los requisitos académicos y legales exigidos por la Institución, motivo por el cual autorizó se le otorgue el título de:

BIÓLOGO

En la Secretaría General de la Universidad, se le hace entrega del diploma No. 31552, el cual aparece registrado con el No. 31710, al folio 1915 del libro de registro de títulos de la Universidad, correspondiente al año 2022.

En testimonio de lo anterior, se firma el presente extracto de acta de grado, en Bogotá, D.C, a los diecinueve (19) días del mes de octubre del año dos mil veintidos (2022).

MARIA CLARA RANGEL GALVIS
RECTORA

CRISTINA MATIZ MEJIA
SECRETARIA GENERAL

Personería Jurídica Resolución No. 1153 de 1978, Reconocimiento Institucional como Universidad Resolución No. 477 de 1997
Ministerio de Educación Nacional

UNIVERSIDAD **EL BOSQUE**

Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido

Referencia: Constancia Tutor de Trabajo de grado

Vigilada Mineducación

Por medio de la presente el Comité de Trabajos de Grado del Programa de Química Farmacéutica de la universidad El Bosque,
Informa:

El profesor Felix Giovanni, vinculado al Departamento de Química, se desempeñó como tutor en el siguiente trabajo de grado del departamento de Química Farmacéutica, en asociación con el grupo de Investigación en Virología de la Universidad El Bosque:

1. **"DETERMINACIÒN DE LA ESTABILIDAD DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN HEMOCOMPONENTES ALMACENADOS EN CONDICIONES ESTÀNDAR DE BANCO DE SANGRE"** a cargo del estudiante Laura Catalina González Torres y Laura Valentina López Sarmiento aprobado el 09 de noviembre de 2023 con el **acta N. 125**, bajo la modalidad de investigación según el reglamento de Trabajos de grado del Programa de Química Farmacéutica en calidad de tutor.

La presente constancia se expide a solicitud del interesado (a), en Bogotá D.C., a los veinticinco (25) días del mes de enero del año dos mil veinticuatro (2024).

Atentamente,

William Giovanni Cortés
Director del Departamento de Química
Facultad de Ciencias
Universidad El Bosque

Leonardo Fernández Rodríguez
Director del programa de Química Farmacéutica
Facultad de Ciencias
Universidad El Bosque

Diana Marcela Vargas Oviedo
Coordinadora de Trabajos de Grado
Programa de Química Farmacéutica
Universidad el Bosque

UNIVERSIDAD **EL BOSQUE**

Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido

Referencia: Constancia Tutor de Trabajo de grado

Vigilada Mineducación

Por medio de la presente el Comité de Trabajos de Grado del Programa de Química Farmacéutica de la universidad El Bosque,
Informa:

El profesor Felix Giovanni, vinculado al Departamento de Química, se desempeñó como tutor en el siguiente trabajo de grado del departamento de Química Farmacéutica, en asociación con el grupo de Investigación en Virología de la Universidad El Bosque:

1. **"ANÁLISIS DE LA REPLICACIÓN Y CARGA VIRAL QUE TIENE EL VIRUS ZIKA EN GLÓBULOS ROJOS Y PLAQUETAS EN MUESTRAS DE SANGRE DE DONANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA COLOMBIANA"** a cargo del estudiante Valerie Cárdenas Sánchez y Axel Vergel Hernández aprobado el 08 de noviembre de 2023 con el **acta N. 126**, bajo la modalidad de investigación según el reglamento de Trabajos de grado del Programa de Química Farmacéutica en calidad de tutor.

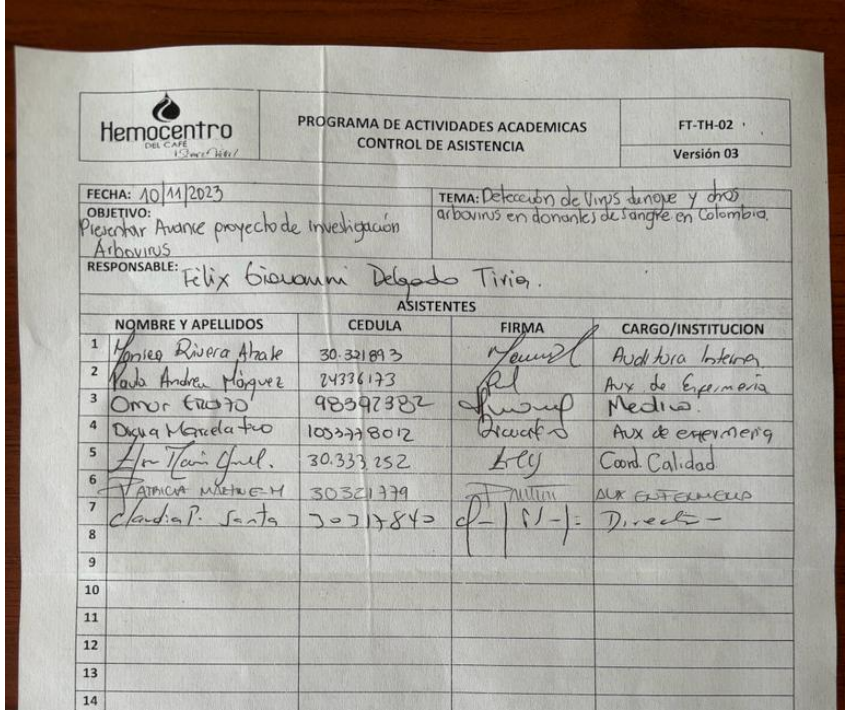
La presente constancia se expide a solicitud del interesado (a), en Bogotá D.C., a los veinticinco (25) días del mes de enero del año dos mil veinticuatro (2024).

Atentamente,

William Giovanni Cortés
Director del Departamento de Química
Facultad de Ciencias
Universidad El Bosque

Leonardo Fernández Rodríguez
Director del programa de Química Farmacéutica
Facultad de Ciencias
Universidad El Bosque

Diana Marcela Vargas Oviedo
Coordinadora de Trabajos de Grado
Programa de Química Farmacéutica
Universidad el Bosque



Hemocentro DEL CAFÉ

PROGRAMA DE ACTIVIDADES ACADEMICAS
CONTROL DE ASISTENCIA

FT-TH-02
Versión 03

FECHA: 10/11/2023
TEMA: Detección de Virus dengue y otros arbovirus en donantes de sangre en Colombia.
OBJETIVO: Presentar Avance proyecto de Investigación Arbovirus
RESPONSABLE: Félix Giovanni Delgado Tiria.

ASISTENTES

	NOMBRE Y APELLIDOS	CEDULA	FIRMA	CARGO/INSTITUCION
1	Monica Rivera Abate	30.321893	[illegible]	Auditora Interna
2	Paula Andrea Márquez	24336173	[illegible]	Aux de Enfermería
3	Omar Erazo	98392382	[illegible]	Medico
4	Diana Marcelatto	1033778012	[illegible]	Aux de enfermería
5	[illegible]	30.333.252	[illegible]	Coord. Calidad
6	Patricia Martinez M	30321779	[illegible]	Aux Enfermería
7	Claudia P. Santa	30317840	[illegible]	Director
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				