



**DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN
HEMOCOMPONENTES ALMACENADOS EN CONDICIONES ESTÁNDAR 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

**DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN
HEMOCOMPONENTES ALMACENADOS EN CONDICIONES ESTÁNDAR DE BANCO DE
SANGRE**

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

Químico Farmacéutico

Investigación

Director: Félix Giovanni Delgado Tiria

Co-director: Sandra Johanna Morantes Medina

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:	Grupo de Virología Investigación en química aplicada
Línea de Investigación:	Patogénesis viral Bioprospección y Biotecnología Farmacéutica-BioFarma
Institución (es) Participante (s):	Universidad El Bosque
Tipo de Investigación:	Experimental
Estudiantes:	Valerie Cárdenas Sánchez Axel Vergel Hernández
Director:	Félix Giovanni Delgado Tiria Sandra Johanna Morantes Medina

Dedicatoria o lema

En medio del invierno descubrí que había, dentro de mí, un verano invencible.

Albert Camus

A mis padres, Eduardo y Myriam, por su apoyo permanente y por nunca perder la confianza que han depositado en mí.

A María mi abuela y Harrison mi tío, por estar presentes desde siempre en todos los aspectos de mi vida.

A Felipez y Muzska por el apoyo en los días difíciles.

A mis padres y hermana, Mónica, Ricardo y Julieta, por su apoyo incondicional desde el comienzo, por brindarme ánimo y fuerzas cada vez que lo necesite.

A Fabiola mi abuela, Angie y Ronald mis tíos, por siempre estar al pendiente de mí y brindarme apoyo en diversos aspectos.

A Diego quien se ha convertido en un apoyo incondicional durante el proceso, quien ha estado presente en las noches largas, los días buenos y también los malos, recordándome mis capacidades como persona y estudiante.

Agradecimientos

En el desarrollo de nuestro proyecto para la obtención del título de Químico Farmacéutico han participado personas clave, sin ellos este logro no podría ser cumplido, primeramente, agradecemos a nuestros padres por su infinita paciencia y apoyo incondicional en nuestro desarrollo como personas integrales, por otra parte, agradecemos a la Universidad el Bosque, por brindarnos los conocimientos necesarios, junto a los espacios y recursos para lograr nuestro desarrollo profesional, junto a esto agradecemos a los docentes Felix Giovanni Delgado Tiria y Sandra Johanna Morantes Medina, por brindarnos el tiempo, conocimiento y dedicación para el desarrollo del presente proyecto. Además, queremos agradecer al grupo de virología de la Universidad el Bosque por acogernos y darnos la oportunidad de vivir esta bonita experiencia llena de conocimientos, nuestros agradecimientos más grandes son para Brian Alejandro Cáceres Munar, por permitirnos participar en su proyecto, por guiarnos paso a paso al desarrollo de las actividades necesarias y por la actitud que tuvo siempre hacia nosotros junto a su disposición.

Tabla de contenido

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.....	3
2.2.2 Epidemiología.....	4
2.2.3 Patogénesis	5
2.3 Situación actual en bancos de sangre.....	6
2.4 Seguridad transfusional.....	7
2.5 Transfusiones y arbovirus	7
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
6.4 Análisis estadístico.....	17
7. Resultados y análisis de resultados	18
7.1 Generación de curvas estándar para cuantificación de Chikungunya en la unidad de plaquetas y glóbulos rojos.....	18
7.2 Cuantificación absoluta y relativa de Chikungunya en plaquetas	20
7.3 Cuantificación absoluta y relativa de Chikungunya en glóbulos rojos	23
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 R ²	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
Tabla 9	Cuantificación relativa en glóbulos rojos	39

Listado de figuras

		Pág.
Figura 1	Fase aguda y crónica por infección de CHIKV	6
Figura 2	Curva estándar para cuantificación de virus en plaquetas	18
Figura 3	Curva estándar para cuantificación de virus en glóbulos rojos. [OBJ]	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

RBC: 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 circula en regiones tropicales y subtropicales del planeta, en las últimas décadas ha aumentado su incidencia donde se destaca su adaptación a entornos urbanos generando una mayor propagación, el cual se convierte en un foco de atención para la salud pública, llevando a establecer estrategias para contener la expansión. 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, indicando que existe un riesgo considerable de transmisión por esta vía. Es de conocimiento que 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, podrían donar sangre con una carga viral significativa para infectar a un paciente.

Según lo mencionado se evaluó las posibles variaciones de la carga viral del virus Chikungunya en hemocomponentes almacenados en condiciones estándar de banco de sangre, 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 $2,5 \times 10^3$ UFP/mL de virus Chikungunya para posteriormente medir la carga viral en diferentes tiempos por medio de la técnica de RT-qPCR. Los resultados obtenidos permitieron determinar que en la mayoría de los días la carga viral de Chikungunya tuvo una tendencia a decrecer, acentuándose en los días 4 y 5 en las plaquetas, el análisis estadístico indicó diferencias significativas exceptuando el día 6. En glóbulos rojos la tendencia tuvo un comportamiento con variaciones leves a comparación de las plaquetas, donde existió un aumento significativo del genoma viral entre el día 14 y 21.

Palabras Clave:

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

Abstract

The Chikungunya virus circulates in tropical and subtropical regions of the planet, in recent decades has increased its incidence where its adaptation to urban environments is highlighted generating a greater spread, which becomes a focus of attention for public health, leading to establish strategies to contain the expansion. In addition to this concern, studies have been carried out in different parts of the world to determine whether arboviruses can be transmitted through blood transfusions, indicating that there is a considerable risk of transmission by this route. It is known that Colombia is an endemic country and does not have information or reports that determine the great risk to which the population receiving hemocomponents is exposed, the concern is focused on those patients who become asymptomatic or have mild symptoms, could donate blood with a significant viral load to infect a patient.

According to the aforementioned, we evaluated the possible variations of the viral load of Chikungunya virus in hemocomponents stored under standard blood bank conditions, to fulfill our objective, we used units of red blood cells and platelets supplied by the blood bank, which were infected with 2.5×10^3 PFU/mL of Chikungunya virus to subsequently measure the viral load at different times by means of the RT-qPCR technique. The results obtained allowed determining that on most days the Chikungunya viral load had a tendency to decrease, accentuated on days 4 and 5 in platelets, the statistical analysis indicated significant differences except on day 6. In red blood cells, the trend had a behavior with slight variations compared to platelets, where there was a significant increase in the viral genome between days 14 and 21.

Keywords:

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

1. Introducción

Desde hace décadas el virus Chikungunya es un arbovirus que ha tenido una expansión considerable durante los últimos años alrededor del mundo, pertenece al género alfavirus el cual se transmite a través de la picadura de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Este virus se caracteriza por causar fiebre, dolor muscular, cefalea y brotes, aunque con una predominancia importante poliartralgias, siendo éstas de gran preocupación, ya que tiene la capacidad de ser inhabilitante y dolorosa por largos periodos de tiempo, lo cual afecta en la calidad de vida de los pacientes. Del mismo modo es importante recalcar la dificultad que conlleva un diagnóstico oportuno entre los arbovirus, debido a la similitud en la sintomatología que presentan en fases tempranas de la infección[1].

Debido a la expansión acelerada del virus Chikungunya, se tiene un gran desconocimiento acerca del comportamiento de este en transfusiones sanguíneas, debido al poco tiempo que ha estado en circulación en los países latinoamericanos, así como en Colombia existen pocos mecanismos de vigilancia en arbovirus, ya que la atención la acapara el virus Dengue.

Junto a lo anterior existen estudios que notifican que en Colombia hasta el 25% de los donantes poseen algún tipo de arbovirus, lo cual es preocupante, debido a que personas con afecciones de salud graves como: cáncer, trombocitopenia y anemia pueden ser transfundidas con unidades infectas, deteriorando en gran medida su salud[2].

A partir de los resultados obtenidos se brinda información pertinente acerca de la estabilidad del virus Chikungunya reconociendo la importancia de controlar y vigilar, el comportamiento del virus en las condiciones estándar del Banco de Sangre de la Cruz Roja

2. Marco teórico

2.1 Arbovirus

Los arbovirus constituyen un grupo diverso de alrededor de 537 virus diferentes. Estos virus se transmiten principalmente por artrópodos como mosquitos, garrapatas y moscas de la fruta, llamados vectores virales. Estos vectores se caracterizan por su alimentación de tejido sanguíneo, por lo que se les denomina hematófagos [3], [4]. 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[3].

La 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 [5],[7].

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 [8].

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 $5,2 \times 10^6$ 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[9].

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 regular la expresión de las proteínas estructurales ubicadas en el extremo 3' del genoma, que incluyen la cápside, así como las proteínas de envoltura E1, E2 y E3 [9].

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' [9].

En relación con las proteínas que facilitan la entrada del virus en la célula, E1 y E2 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 [9],[11].

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[12],[13],[14].

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 [3].

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[15].
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[15].

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[15].

4. Glucosaminoglicanos (GAG), como el heparán sulfato: Estos componentes de la superficie celular también pueden servir como puntos de entrada para el virus[15].

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 las 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 [11], [14], [16].

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 [17].

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[18].

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[19].

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 [20].

Desde entonces, en el contexto colombiano, el Chikungunya ha mostrado un comportamiento similar al del Dengue, ya que se establece en áreas geográficas similares[6]. 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[19].

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 [21].

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 [13], [22], [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[9], [10], [15].

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 como se observa en la figura 1. Estas características hacen que el 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].

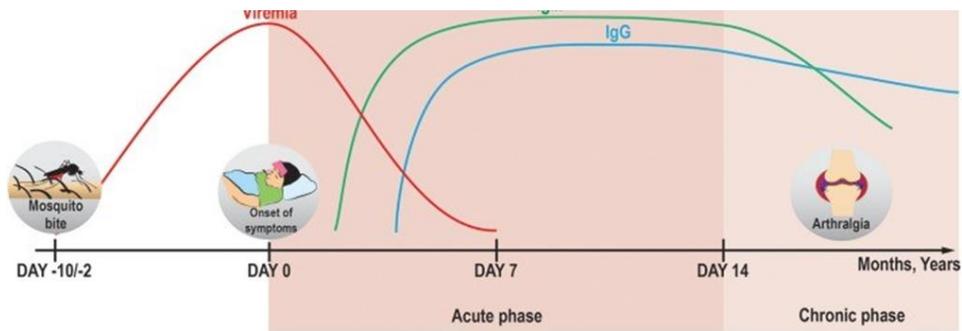


Figura 1 Fase aguda y crónica por infección de CHIKV [25]

2.3 Situación actual en bancos de sangre

Debido a la expansión del virus a través de los continentes se han realizado diferentes estudios sobre la seroprevalencia del CHIKV, los cuales han arrojado resultados diversos debido a los diferentes países donde se han llevado a cabo, ya que algunos cuentan con las condiciones aptas para el desarrollo de los vectores virales, mientras que otros dificultan en gran medida su supervivencia, lo anterior se ve reflejado en que varios estudios arrojan una seroprevalencia de CHIKV de 0 % mientras un estudio realizado en Rwanda en 2015 encontró una seroprevalencia del 63.0%. Lo cual se ve reflejado en la relación de los estudios realizados en una zona endémica o durante un brote y los realizados en regiones no endémicas que son del 24,4. Con toda la información recolectada por las diferentes investigaciones, el meta análisis arroja una seroprevalencia global del 21,6%[26].

Junto a lo anterior por RT-qPCR se obtuvo una prevalencia de 1.9% durante pico de infecciones en Puerto Rico, cabe recalcar, que la detección molecular del CHIKV no es un procedimiento estandarizado, es decir, el paciente debe tener una serie de criterios para llevarse a cabo, por

otra parte el diagnóstico en etapas tempranas es complicado por la similitud con otras patologías[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[29].

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 paciente receptor. Además, no se ha establecido una correlación clara entre una viremia baja y 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 [32].

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, [33], [34] 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[10].

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* [19]. Además, este virus puede ser transmitido por diversas vías, siendo las principales a través de los mosquitos vectores *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*[11][35]. 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 [36], [37].

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 [21].

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 puede 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*

- Evaluar posibles variaciones de la carga viral del virus Chikungunya 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 Chikungunya en glóbulos rojos obtenidos de donantes de sangre.
- Analizar cambios en el tiempo de la carga viral del virus Chikungunya 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 de tipo experimental. 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 todos los proyectos surgidos tras este convenio cuentan con la aprobación y el respaldo del comité de ética, como se evidencia en el Acta 003-2021, del 23 de febrero de 2021. Estas unidades, originarias de donantes de sangre sanos y suministrados por el Banco de Sangre de la Cruz Roja Colombiana, se enviaron al Grupo de Virología de la Universidad El Bosque, donde se realizaron 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 en el caso de la unidad de plaquetas.

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 llevó 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 [38].

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 2.5×10^7 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 2.5×10^5 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 50.00 mL, en el cual se depositaron 34.65 mL de plaquetas y se añadió un volumen de 0.35 mL de virus CHIKV con una concentración de 2.5×10^5 UFP/mL obteniendo un volumen total de 35.00 mL de plaquetas infectadas con CHIKV a una concentración de 2.5×10^3 UFP/mL. Este procedimiento se repitió una segunda vez para obtener dos tubos Falcon que contenían cada uno 35.00 mL dando un total de 70.00 mL de plaquetas infectadas con CHIKV a una concentración de 2.5×10^3 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 2.5×10^3 UFP/mL en cada caja t12.5, en total se obtuvieron 21 cajas t12.5 con plaquetas infectadas. Las cajas se almacenaron a una temperatura de 22 °C 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].

En cuanto a los glóbulos rojos, el proceso comenzó con un título inicial de CHIKV de 2.5×10^7 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 2.5×10^7 UFP/mL, resultando en un título final de CHIKV de 2.5×10^5 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 2.5×10^5 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 2.5×10^3 UFP/mL.

Posteriormente se tomaron los tubos falcon con glóbulos rojos infectados con un título de 2.5×10^3 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 2.5×10^3 UFP/mL. En total se prepararon dos placas de 6 pozos, lo que resultó en 12 pozos infectados con CHIKV a una concentración de 2.5×10^3 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°C , 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 (ref: 52906) siguiendo el procedimiento y 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 .

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 consistió 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, el alineamiento se llevó a cabo en una temperatura de 55°C durante 30 segundos y la 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)[9][39]. 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 1.02×10^7 copias genómicas por microlitro (μL), mientras que el CDZ-7 tenía 1.02×10^2 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 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 $\Delta\Delta\text{Ct}$ ". 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 [40].

Tabla 1 Primers usados en la investigación[41]

Primers							
Virus	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Probe 5'-3'	Label 5'	Quencher 3'	Gene	Amplicon size bp
CHIKV	TCACTCCCTGTTGGACTTG ATAGA	TTGACGAACAGAGTTAGGAACAT ACC	AGGTACGCGCTTCAAGTTC GGCG	TR	BHQ2	E1	125
hACT	GGATGCAGAAGGAGATCA CTG	CGATCCACACGGAGTACTTG	CCCTGGCACCCAGCACAAAT G	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 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 el test de Kruskal-Wallis según fuera pertinente. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete estadístico GraphPad versión 10.0.2.

7. Resultados y análisis de resultados

7.1 Generación de curvas estándar para cuantificación de Chikungunya en 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 (Figura 2) como en las de glóbulos rojos (Figura 3). Estas curvas se basaron en un plásmido de referencia denominado CDZ, al cual se le realizaron diversas diluciones. Además, se empleó 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 4 y 7).

Tabla 3. Curva estándar CHIKV para cuantificación en plaquetas

CURVA ESTANDAR PL TEXAS RED							
Well	Fluor	Target	Sample	Cq	Copias genómicas/ μ L	LOG copias genómicas/ μ L	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

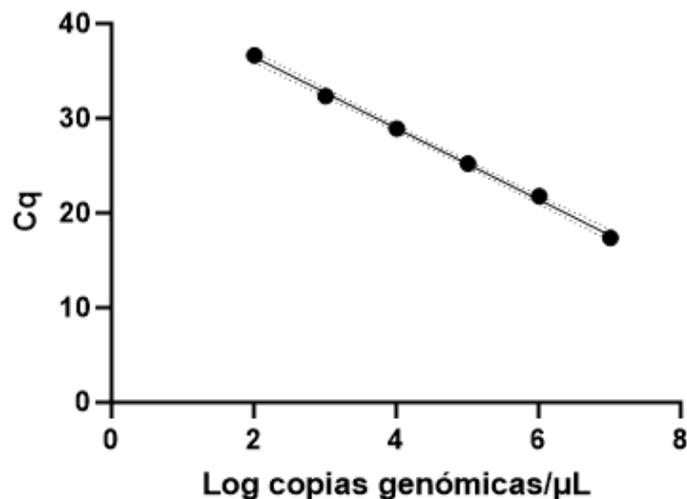


Figura 2 Curva estándar TEXAS RED para cuantificación en plaquetas

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

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

CURVA ESTANDAR BC TEXAS RED						
Well	Fluor	Sample	Cq	copias genómicas/ μ L	Log copias genómicas/ μ L	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

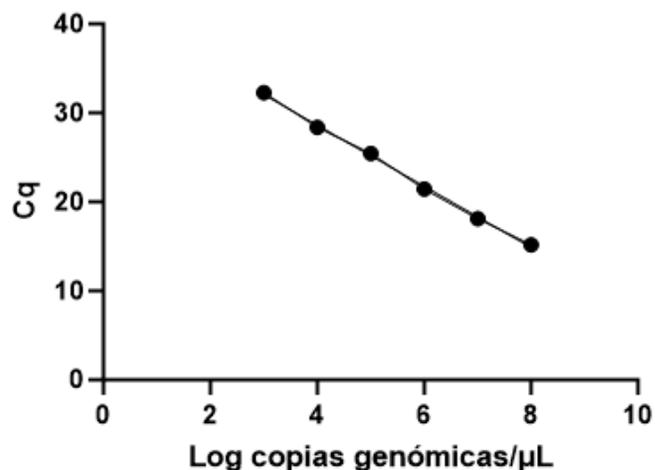


Figura 3 Curva estándar TEXAS RED para cuantificación en glóbulos rojos.

Tabla 7 Ecuación de la gráfica junto a correlación R^2

Datos	
Ecuación de la recta	$y=-3,4372x+42,41$
R^2	0,998

7.2 Cuantificación absoluta y relativa de Chikungunya en plaquetas

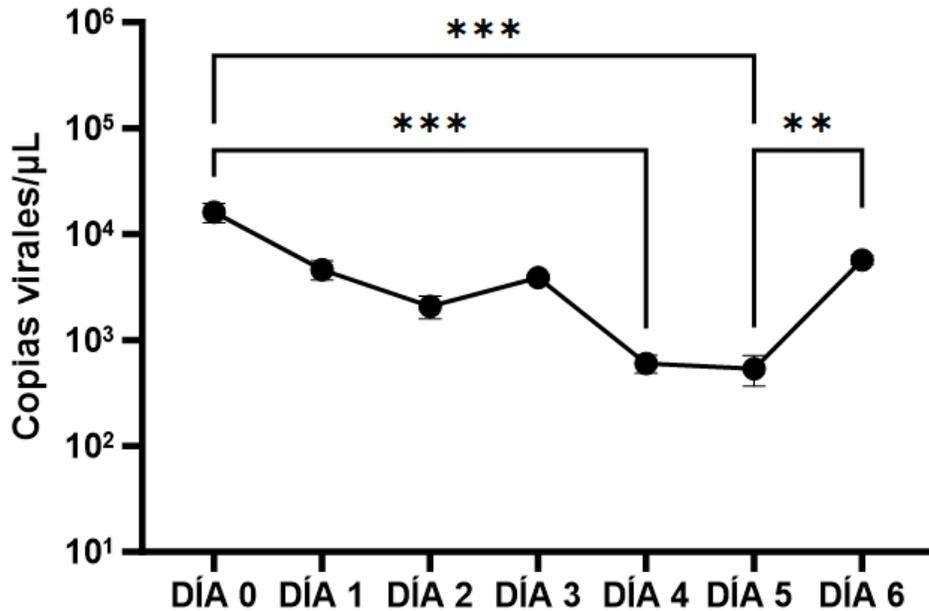


Figura 4 Evolución de carga viral de CHIKV en plaquetas.

Al inocular las células con CHIKV purificado, se determinó que el MOI (Multiplicity of infection) fue 6.52×10^{-6} es decir, la cantidad de viriones que son agregados para la infección de las células, esto con el objetivo de simular las viremias asintomáticas 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 [42].

Durante el seguimiento diario de las mediciones (figura 4), 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 indicó que las copias virales/μL 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. La situación se presenta por la presencia de glóbulos blancos, ya que la familia de células inmunitarias son una de las principales células blancas del CHIKV como los macrófagos y las células dendríticas, además poseen la maquinaria celular para la replicación viral. El Banco de Sangre de la Cruz Roja generó un reporte donde indicó que la concentración era de $0,1 \times 10^3$ glóbulos blancos/μL. Por tanto, más glóbulos blancos podrían contribuir a la replicación viral.

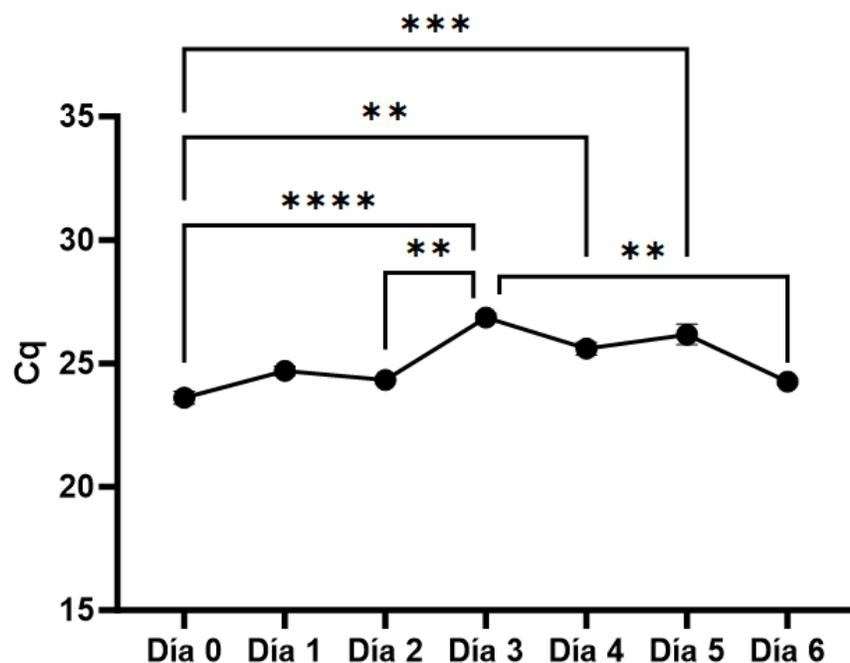


Figura 5 Cq de β -Actina en el desarrollo experimental en plaquetas

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 (Figura 5). 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 5), donde se destaca que en los días 3, 4 y 5 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.

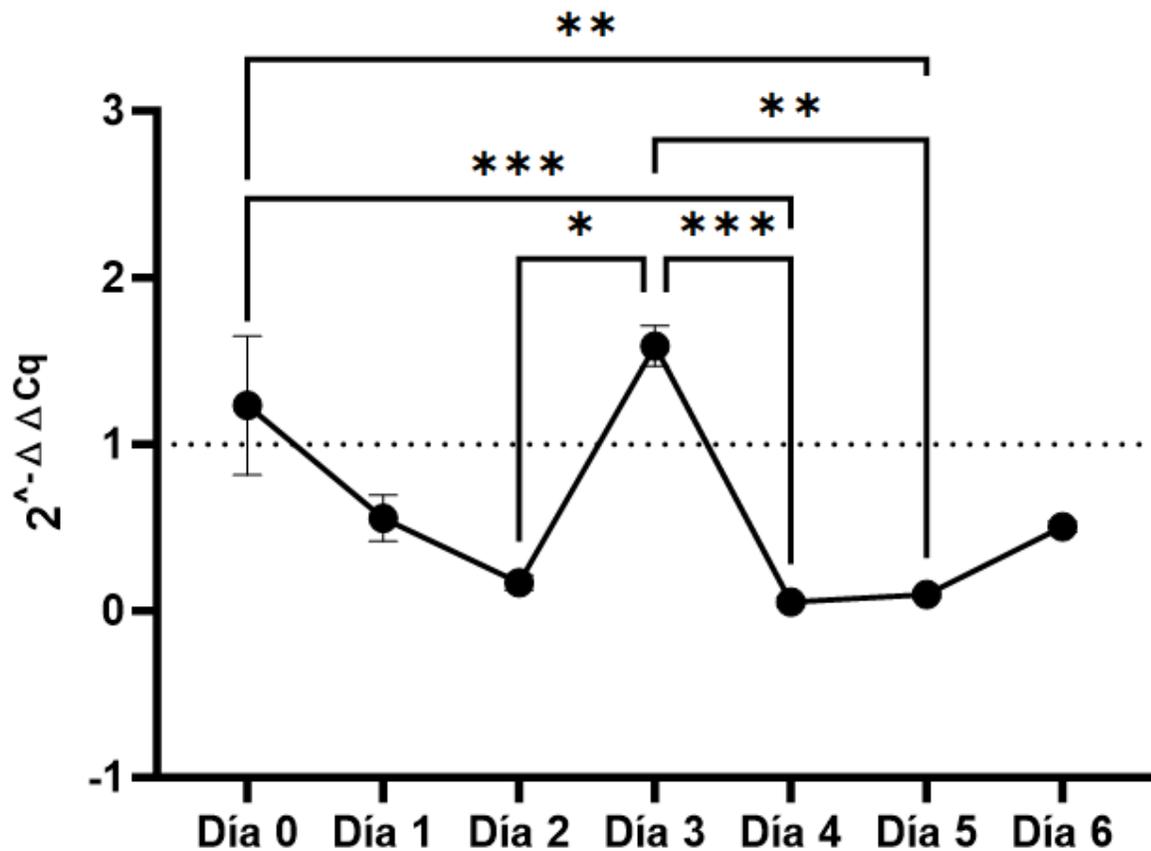


Figura 6 Cuantificación relativa del CHIKV

Visualizando la (Figura 6) 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/ μ L, 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. Aunque estos dos virus comparten similitudes en su estructura y patogenia, es crucial destacar que pertenecen a géneros y familias virales diferentes.

7.3 Cuantificación absoluta y relativa de Chikungunya en glóbulos rojos

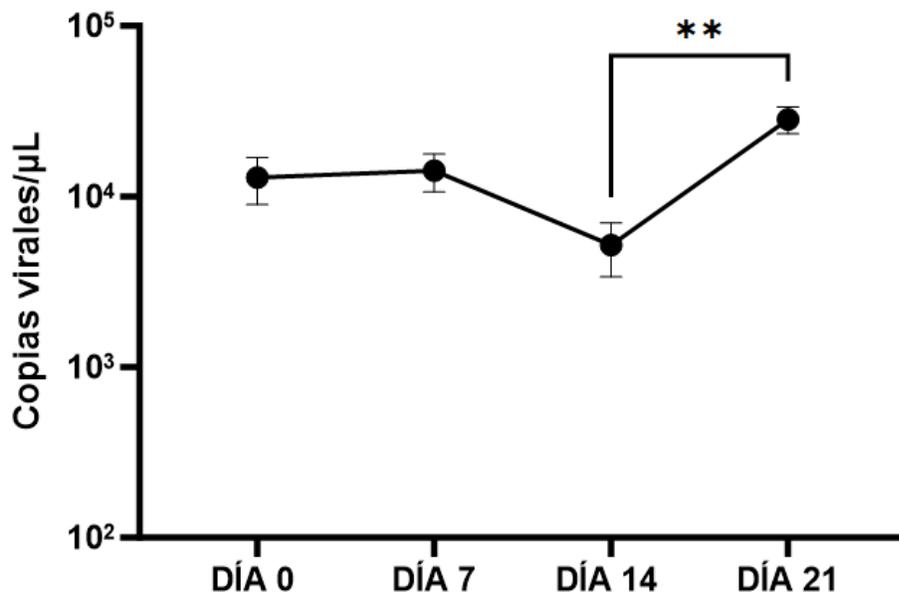


Figura 7 Evolución absoluta de carga viral de CHIKV en glóbulos rojos

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 4.1×10^{-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 4 grados Celsius. Respecto a los resultados obtenidos en la parte experimental con glóbulos rojos, se observó un comportamiento más estable que 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 sugiere que el genoma viral se replica.

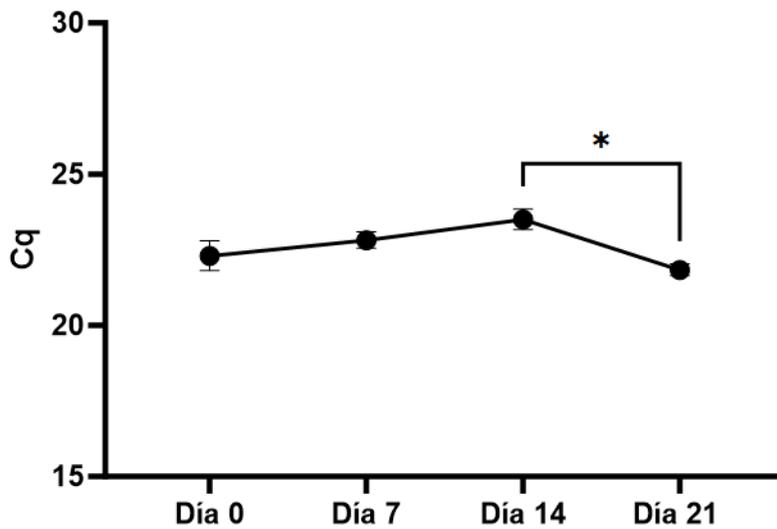


Figura 8 Cq de β -Actina en el desarrollo experimental en glóbulos rojos

En la cuantificación de β -Actina (Figura 8) 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.

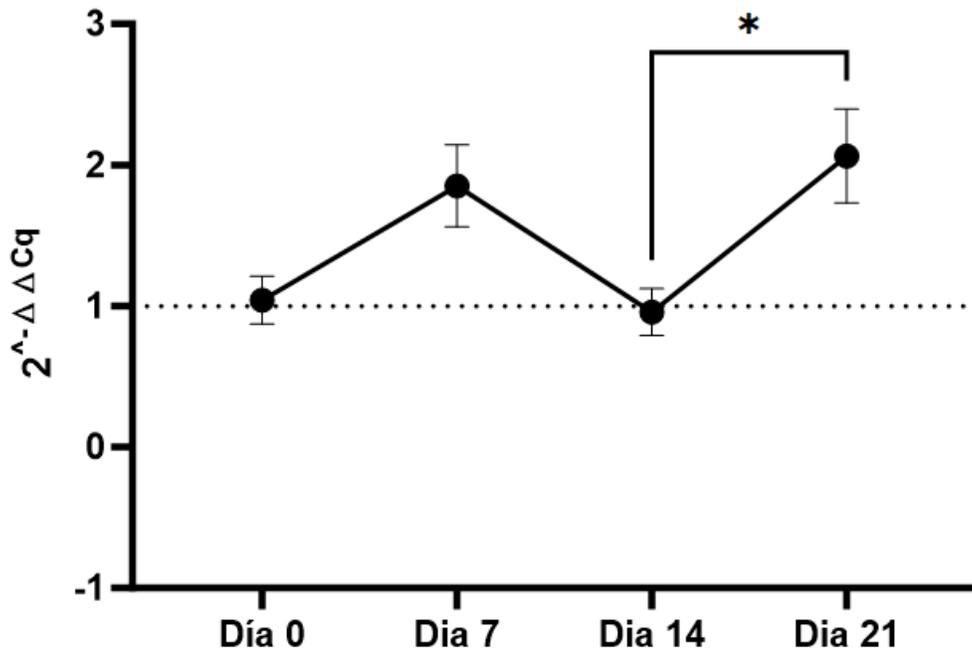


Figura 9 Evolución relativa de carga viral del CHIKV con respecto a la β -Actina en glóbulos rojos.

Para finalizar se desarrolló la cuantificación relativa (Figura 9), la cual, arrojó como resultado que el virus permanece estable los días ,7 y 14 con respecto al día 0, confirmando 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[34]. 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[43]. Estos resultados plantean interrogantes importantes que requieren una investigación más profunda para comprender completamente el comportamiento del virus en este contexto.

8. Consideraciones éticas

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

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

- Según los resultados obtenidos en la investigación, se concluye que el genoma viral del Chikungunya tiene la capacidad de persistir a lo largo del tiempo, experimentando fluctuaciones leves en su carga viral tanto al aumentar como al disminuir en condiciones de almacenamiento de bancos de sangre, tanto en plaquetas como en glóbulos rojos, lo que indica un riesgo en términos de seguridad transfusional, pero se requiere un estudio más a profundidad para observar si la capacidad de infección se mantiene a través del tiempo en condiciones de banco de sangre.
- Gracias a la revisión bibliográfica, se concluyó 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 el propósito 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 se recomienda el uso de bolsas pediátricas para el almacenamiento de los hemocomponentes, 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 estabilidad del virus 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, únicamente se identificó la presencia del ARN viral de Chikungunya en las muestras, lo cual no permite concluir si el virus se mantiene con la capacidad de infectar nuevas células, para ello es necesario utilizar metodologías como el ensayo de placa viral en futuras investigaciones.

11. Anexos

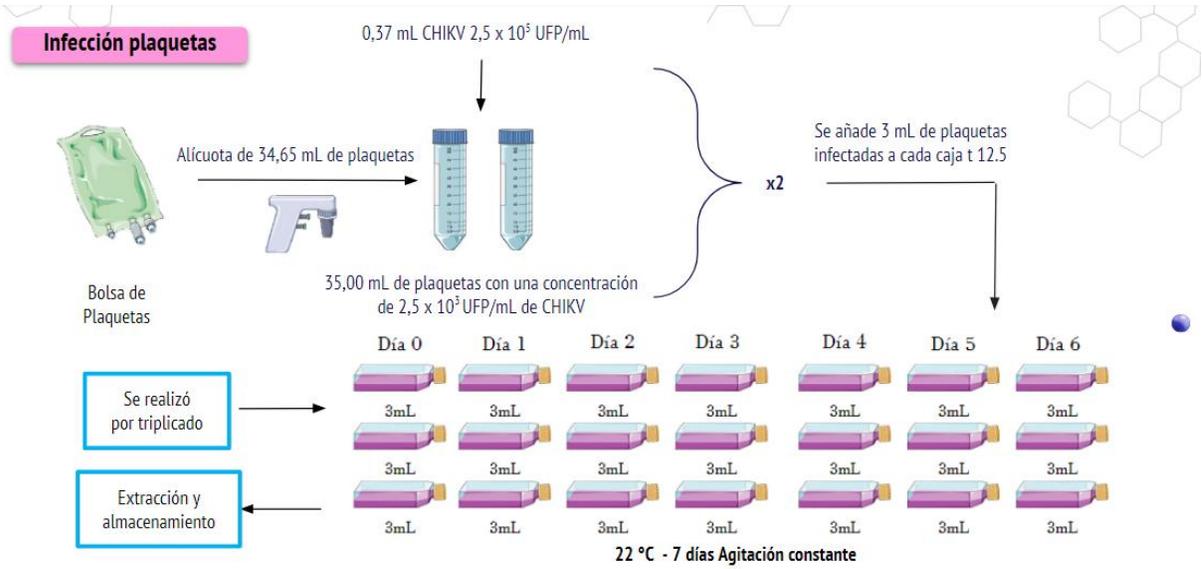


Figura 10 Proceso para la infección de plaquetas con CHIKV

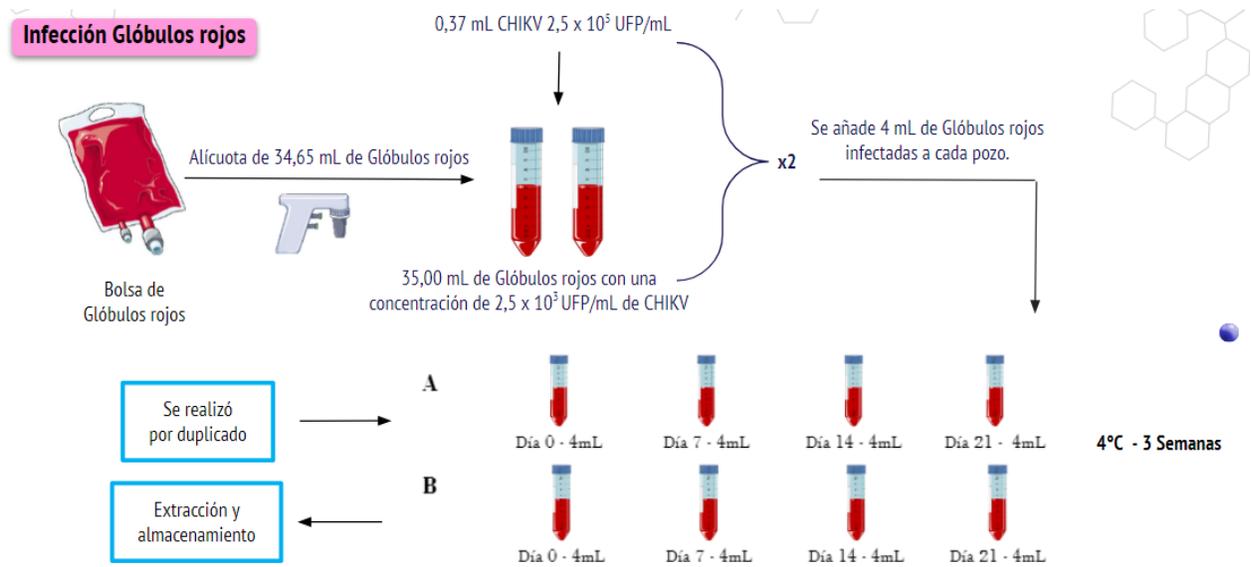


Figura 11 Proceso para la infección de glóbulos rojos con CHIKV

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

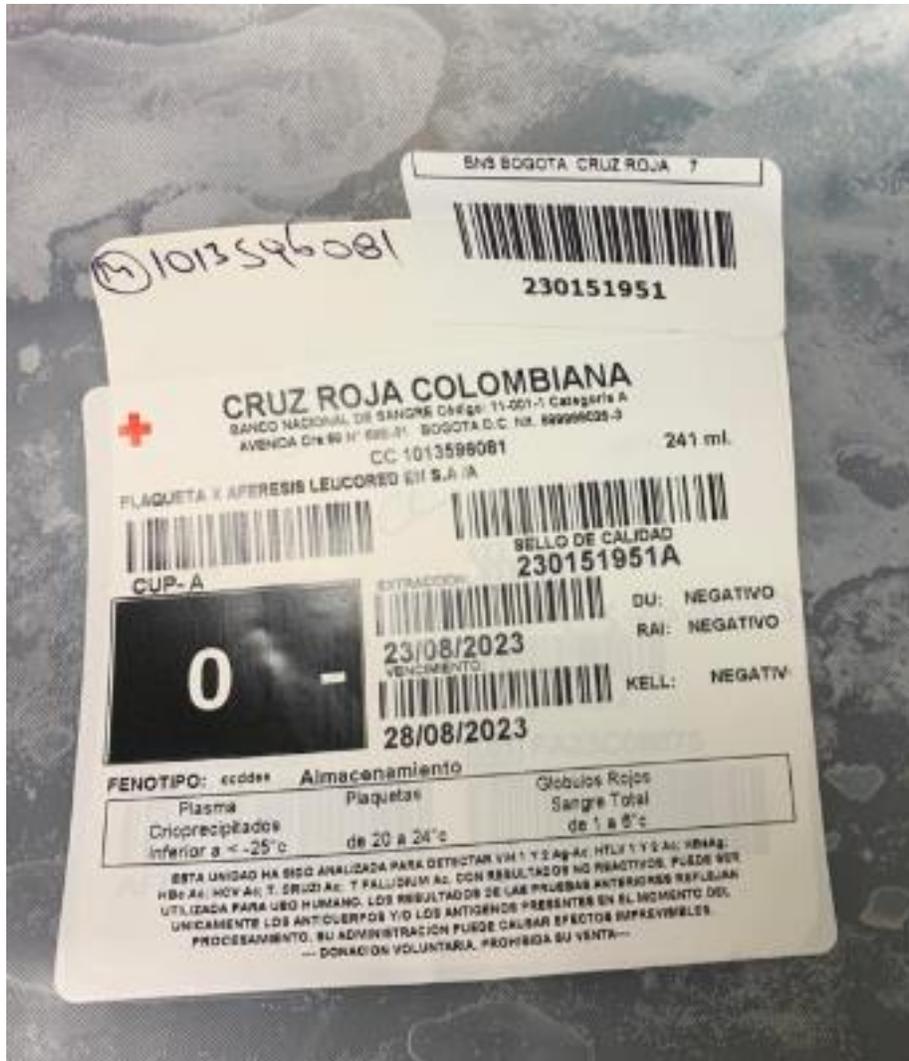
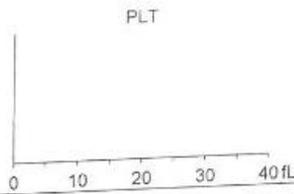
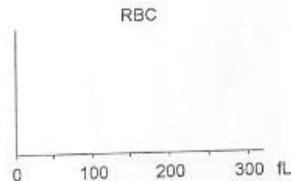
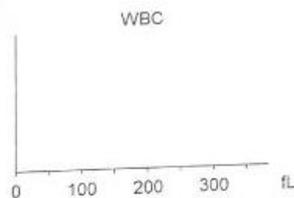


Figura 12 Rotulo de unidad de plaquetas

Informe análisis hematología

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

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 - 58.0
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: Operador: Administrator Revisado por:
 Hora de trazado: Hora entrega: Hora de impresión: 24/08/2023 10:40
 Comentarios:
 [Este informe solo se aplica a la muestra analizada correspondiente]

Figura 13 Parámetros hematológicos de la unidad de plaquetas recibida

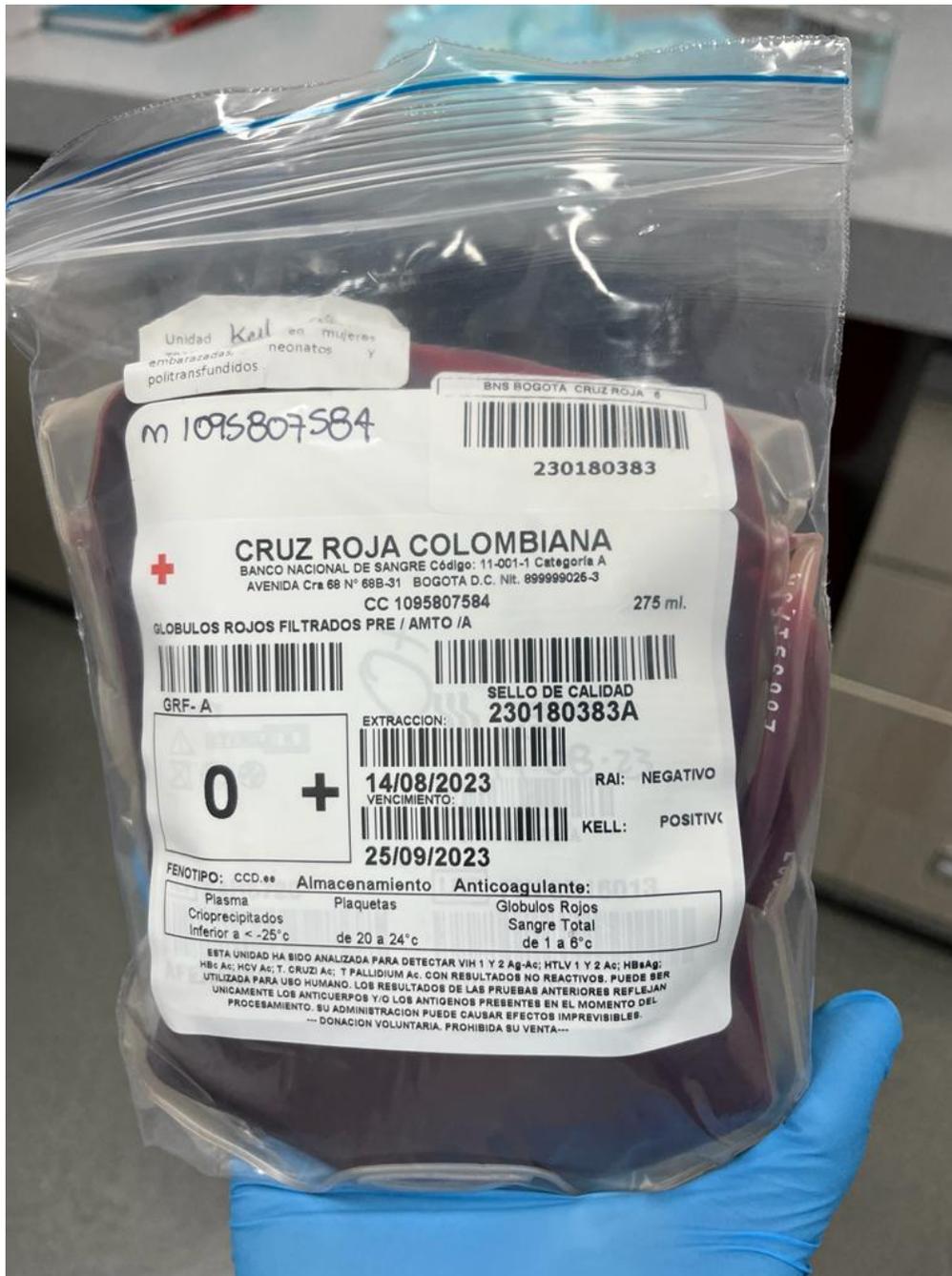


Figura 14 Rótulos e información de unidad de plaquetas recibida por parte de la Cruz Roja Colombiana

Informe análisis hematología

Nombre: _____ Apellido: _____ Sexo: _____ Edad: _____
 ID muestr: 230100383A Tipo de paciente: _____ ID pac: _____
 Dpt.: _____ Tiempo de análisis: 24/08/2023 14:58 Modo: WB

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

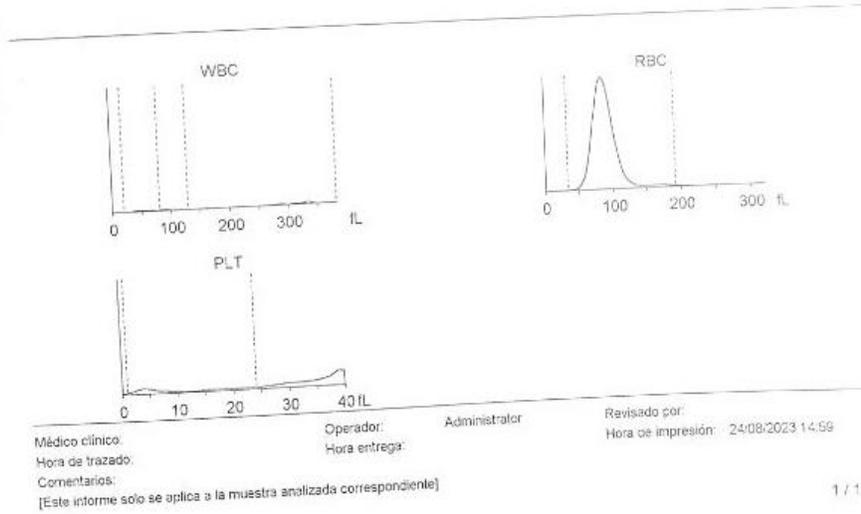


Figura 15 Parámetros hematológicos de la unidad de plaquetas recibida

Tabla 6 Cuantificación absoluta de CHIKV en plaquetas

Carga viral Plaquetas							
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	LOG copias genómicas/ μ L	copias genómicas/ μ L
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°	Días Vs Replica	Cq Virus	Cq Beta Actina	ΔCq	$\Delta\Delta Cq$	$2^{\Delta-\Delta\Delta Cq}$	Promedio Dia 0
1	DÍA 0 R1	27,63	24,69	2,94	-1,70	3,24	4,64
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	
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/ μ L
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							Promedio Dia 0
Nº	Días Vs Replica	Cq Virus	Cq Beta Actina	Δ Cq	$\Delta\Delta$ Cq	$2^{\Delta\Delta}$ Cq	
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] 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.
- [2] F. 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.
- [3] R. Hasbun, D. van de Beek, M. C. Brouwer, and A. R. Tunkel, *Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica - ClinicalKey*. 2020.
- [4] 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.
- [5] CDC, “Ciclos de la vida de los mosquitos de la especie *Aedes* | Mosquitos | CDC,” 2022. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/es/about/life-cycles/aedes.html> (accessed Sep. 30, 2023).
- [6] M. Benitez, M. Cortes, M. Eg, G. Vh, and M. Díaz, “Influencia de la temperatura ambiental en el mosquito *Aedes spp* y la transmisión del virus del dengue,” *CES Medicina*, pp. 42–50, 2019.
- [7] P. Zanotto and L. 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.
- [8] A. Trilla García, J. Arribas López, M. Martínez Yoldi, H. Gómez Dantés, and J. 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.
- [9] E. Calvo, E. Archila, Lady López, and J. Castellanos, “Reconociendo el virus del chikunguña,” *Biomédica*, vol. 41, no. 2, pp. 353–373, Jun. 2021, doi:

10.7705/BIOMEDICA.5797.

- [10] K. Galán-Huerta, A. Rivas-Estilla, I. Fernández-Salas, J. 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.
- [11] 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.
- [12] S. Khongwichit, J. Chansaenroj, C. Chirathaworn, and Y. Poovorawan, "Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries," *J. Biomed. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–17, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12929-021-00778-8/FIGURES/5.
- [13] 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.
- [14] L. Markoff, "Alfavirus (chikungunya, encefalitis equina oriental) - Mandell, Douglas, Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica - ClinicalKey Student," in *Mandell, Douglas, Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*, 9th ed., 2020, p. 4056.
- [15] G. Matusali *et al.*, "Tropism of the chikungunya virus," *Viruses*, vol. 11, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.3390/v11020175.
- [16] 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.
- [17] O. Bennett, R. Dolin, and M. Blaser, *Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*, 9th ed., vol. 2. Elsevier, 2020.
- [18] OMS, "Chikungunya," 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>.
- [19] Grupo de Vigilancia y Control de enfermedades transmisibles endoepidémicas y relacionadas con salud sexual, "Protocolo de Vigilancia de Chikungunya (217)," pp. 1–21, 2022, [Online]. Available: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/SitePages/Evento.aspx?Event=2>.

- [20] S. Ferreira Barijhó, V. 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.
- [21] Organización Panamericana de la Salud, “Alerta Epidemiológica: Aumento de casos y defunciones por chikunguña en la Región de las Américas,” *OPS*, pp. 1–7, 2023.
- [22] 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-chikunguna-zika-10-junio-2023> (accessed Sep. 30, 2023).
- [23] M. 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. 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 Protección Social, “Decreto 1571 de 1993.” <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/decreto-1571-de-1993.pdf>.
- [32] A. CÁCERES MUNAR, “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,” 2020.
- [33] 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.
- [34] M. Sutherland, A. Simon, K. Serrano, P. Schubert, J. 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.
- [35] 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.
- [36] OPS, “Chikungunya - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.” <https://www.paho.org/es/temas/chikungunya> (accessed Oct. 01, 2023).
- [37] 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.
- [38] Red Distrital de Sangre, “Boletín Red Distrital de Sangre 2020,” *Boletín Red Dist. Sangre*, vol. 9, 2022, doi: 10.56085/26656663.578.
- [39] E. Calvo, F. Sánchez-Quete, S. Durán, I. Sandoval, and J. 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.
- [40] K. Livak and T. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [41] R. 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.

- [42] 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.
- [43] 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.