INFECCION POR VIRUS ZIKA EN CASOS DE SÍNDROME FEBRIL AGUDO CON SOSPECHA DE OTRAS ARBOVIROSIS

VAZQUEZ CYNTHIA; GÓMEZ DE LA FUENTE ANDREA; VILLALBA; TORALES JUAN; GAMARRA MARIA LIZ; ORTEGA MARIA JOSÉ; DUNJO PAMELA.
Asunción, Paraguay
e-mail: cynthiavlm@yahoo.com

RESUMEN

Con el objetivo de investigar la presencia de virus zika en casos de síndrome febril agudo, fueron analizadas 580 muestras recibidas en el Laboratorio Central de Salud Pública de Paraguay durante el año 2016 para el diagnóstico de dengue y chikungunya, pero sin sospecha clínica de zika. Las muestras negativas para dengue y chikungunya, fueron analizadas por RT-PCR en Tiempo Real específica para virus Zika. Los datos demográficos, clínicos y epidemiológicos fueron obtenidos de formularios llenados en cada servicio de salud. Para el análisis estadístico fue utilizado el programa Epi Info 7. En el 8% (45/580) de las muestras se confirmó la infección por zika. El 62% de los casos confirmados fueron mujeres, siendo el grupo de 20 a 29 años el más afectado. Fueron confirmados casos en 9 de los 18 departamentos del país. La mayoría de los casos se registraron entre las semanas epidemiológicas 1 y 12 del 2016. Los síntomas más frecuentes en los casos confirmados, además de la fiebre, fueron cefalea, mialgias y artralgias. El 91% de los casos fueron ambulatorios, y no se registraron muertes. En conclusión, la detección de virus zika en pacientes sin sospecha de la infección, evidencia la complejidad del diagnóstico en el contexto de circulación de otros arbovirus, resaltando la necesidad de agudizar la sospecha clínica sin limitarse a síntomas muy específicos. Demuestra además la importancia de contar con métodos de laboratorio específicos y fiables, así como algoritmos que aseguren una adecuada sensibilidad en la confirmación de casos.

Palabras Clave: arbovirus, síndrome febril agudo, zika.

ABSTRACT

In order to investigate the presence of Zika virus in cases of febrile syndrome, were analyzed 580 samples received at the Central Public Health Laboratory of Paraguay during 2016, for the diagnosis of dengue and chikungunya, but without clinical suspicion of Zika. The negative samples for dengue and chikungunya were analyzed by Real Time RT-PCR specifically for the Zika virus. The demographic, clinical and epidemiological data were obtained from forms filled in each health service. For the statistical analysis, the Epi Info 7 program was used. In 8% (45/580) of the samples, Zika infection was confirmed. 62% of the confirmed cases were women, being the group of 20 to 29 years more affected. Cases were confirmed in 9 of the 18 departments of the country. The majority of cases were recorded between epidemiological weeks 1 and 12 of 2016. The most frequent symptoms in confirmed cases, in addition to fever, were headache, myalgias and arthralgias. 91% of the cases were ambulatory, and no deaths were recorded. In conclusion, the detection of viruses in patients without suspicion of infection, shows the complexity of the diagnosis in the context of the circulation of other arboviruses, highlighting the need to improve clinical suspicion without limiting itself to very specific symptoms. This study demonstrate the

importance of having specific and reliable laboratory methods, as well as algorithms that ensure adequate sensitivity in the confirmation of cases.

Keywords: arbovirus, febril syndrome, zika.

1. INTRODUCCIÓN

El virus Zika (ZIKV) es un arbovirus transmitido principalmente por mosquitos del género Aedes, aunque también ha sido reportada la transmisión persona a persona por vía sexual (1) y vertical (2). Este virus pertenece al género Flavivirus, familia Flaviviridae, y está cercanamente relacionado a otros flavivirus de importancia en Salud Pública incluyendo al virus del dengue (DENV) y el virus de la fiebre amarilla (3, 4). El ZIKV emergió en África y ha ocasionado epidemias de enfermedad febril en Micronesia, Polinesia Francesa y Oceanía (5, 6). En mayo del 2015, la Organización Mundial de la Salud reportó por primera vez la transmisión local de ZIKV en la región de las Américas, con casos autóctonos identificados en Brasil (7, 8) y posteriormente en varios países de Sudamérica, América Central y el Caribe (9).

Aunque la mayor parte de las infecciones por ZIKV son asintomáticas o causan síntomas leves, existe evidencia de que puede producir complicaciones neurológicas, como el Síndrome de Guillain Barré (SGB) (10) y defectos congénitos incluyendo microcefalia durante el desarrollo del feto (2, 11, 12), probablemente a través de su capacidad para infectar células progenitoras neurales humanas (13). Esta asociación con la incidencia de defectos de nacimiento que afectan al sistema nervioso central y la aparente mayor incidencia de SGB, llevó a la Organización Mundial de la Salud a declarar una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional (ESPII) (14).

El complejo contexto epidemiológico de co-circulación de DENV, Chikungunya (CHIKV) y ZIKV no puede ser ignorado. En muchos casos, el cuadro clínico de la infección por ZIKV puede confundirse con aquellos ocasionados por el DENV y CHIKV en zonas endémicas donde estos virus co-circulan y comparten los mismos vectores (15). Este hecho resalta el desafío de la diferenciación clínica de estas infecciones durante los brotes, sumado a la dificultad para la confirmación laboratorial de ZIKV debido a los aparentemente breves y bajos niveles de viremia (16). La adecuada diferenciación clínica y laboratorial entre la infecciones agudas por DENV, CHIKV y ZIKV son fundamentales tanto para el manejo de pacientes como para orientar las acciones de vigilancia (7).

Paraguay es un país endémico para DENV, donde la introducción de CHIKV fue confirmada en febrero del 2015 (17). La transmisión autóctona de ZIKV fue también

detectada en noviembre de 2015, durante la investigación de un brote de Síndrome Febril Exantemático en la ciudad de Pedro Juan Caballero que limita con Brasil al Noreste del país (18). En este brote fueron confirmados por laboratorio 6 casos de infección por ZIKV, y durante el año 2016, a pesar de la alta notificación de Síndrome Febril solamente fueron confirmados 8 casos adicionales de ZIKV. Sin embargo desde marzo del 2016 empezaron a reportarse casos sospechosos de microcefalia asociados a ZIKV además de un aparente aumento en la notificación de SGB (19). Según estimaciones realizadas mediante modelos matemáticos, ante la primera detección de un caso de microcefalia, o anormalidades fetales similares, una proporción considerable (entre 0,4% y 4,8%) de la población ya habría sido infectada por ZIKV (20). Sin embargo en Paraguay el número de casos confirmados en el año 2016 no llega a estas proporciones (19).

El algoritmo de detección de arbovirus en el Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP) de Paraguay se inicia siempre por la detección de DENV, y solamente por indicación expresa de sospecha clínica consignada en la ficha epidemiológica, se realiza la búsqueda de CHIKV y/o ZIKV. A fin de asegurar el uso racional y eficiente de los recursos disponibles, la búsqueda se detiene ante un resultado positivo para algún agente viral específico. La excepción de este algoritmo son los casos de microcefalia y SGB, en los cuales el proceso se inicia siempre por la detección de ZIKV. Siguiendo el algoritmo descripto y ante la similitud del cuadro clínico producido por los arbovirus investigados, se podría estar perdiendo la oportunidad de detectar ZIKV en muestras que no ingresaron con esa sospecha específica.

Actualmente existe escasa información sobre la magnitud y distribución del ZIKV en Paraguay, debido a la complejidad para la diferenciación clínica específica en escenarios de circulación simultánea de varios arbovirus con sintomatología similar, sumado a la elevada proporción de casos asintomáticos y a las limitaciones de los métodos de confirmación laboratorial.

La detección retrospectiva del ZIKV en pacientes con sospecha de otras arbovirosis, aportará información relevante sobre la transmisión viral en una población no sospechada del país. Estos datos resultan cruciales para orientar las medidas de control así como para la planificación de los servicios de salud considerando la potencial aparición de complicaciones neurológicas que requieren hospitalización incluyendo unidades de cuidados intensivos, medicamentos costosos y rehabilitación prolongada.

Objetivos General

- Investigar la infección por VZIK en pacientes con Síndrome Febril Agudo notificados como sospechosos de padecer Dengue y/o Chikungunya en Paraguay durante el año 2016.

Objetivos Específicos

- Caracterizar los pacientes estudiados según aspectos socio-demográficos.
- Determinar la frecuencia de casos confirmados de infección por virus Zika en pacientes febriles sin sospecha específica de Zika dentro de la población estudiada
- Describir la distribución geográfica y temporal de los casos confirmados de Zika en la población estudiada
- Identificar las características clínicas más frecuentes de los casos confirmados de Zika en la población estudiada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Fue realizado un estudio observacional descriptivo de corte transversal, con enfoque cuantitativo, pues los resultados fueron presentados en forma numérica, luego de los análisis estadísticos.

Se incluyeron pacientes con síndrome febril de todas las edades residentes en Paraguay, cuyas muestras ingresaron al LCSP para el diagnóstico de VDEN y/o VCHIK entre Enero y Diciembre de 2016; con resultados negativos para los virus sospechados. Fueron seleccionadas las muestras de pacientes en etapa de viremia (1 a 5 días de evolución desde el inicio de los síntomas), correspondiente al periodo en el cual las pruebas virológicas confirmatorias son capaces de detectar virus en sangre. Como muestra fueron seleccionadas aleatoriamente 580 especímenes de suero, que corresponde al 34% de los 1712 disponibles en el LCSP.

Para la obtención de datos demográficos, clínicos y epidemiológicos; fue utilizada la ficha epidemiológica de Vigilancia de Síndrome Febril, que es llenada en cada servicio de salud durante la entrevista con el paciente o familiar.

Procedimientos de Laboratorio: todas las muestras de sangre de los pacientes estudiados fueron previamente analizadas por RT-PCR en tiempo real para la detección de DENV y CHIKV según protocolos publicados por Santiago et al 2013 (21) y Lanciotti R. et al 2006 (22), resultando negativas para ambos virus. La detección de ZIKV en muestras de suero fue realizada mediante una RT-PCR en tiempo real en un solo paso según el protocolo descripto por Lanciotti R. et al 2008 (16).

Plan de Análisis de datos: Los resultados laboratoriales obtenidos y los datos de las fichas clínico-epidemiológicas fueron ingresados en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel. Posteriormente fueron analizados con herramientas de Estadística Descriptiva utilizando el programa Epi Info 7 y fue aplicado el test de chi-cuadrado para análisis de significancia estadística en cuanto a características clínicas, grupos de edades, y distribución geográfica; considerando estadísticamente significante los valores de P menor de 0,05.

3. **RESULTADOS**

Los 580 casos de síndrome febril seleccionados correspondieron a pacientes con inicio de síntomas entre la semana 50 del año 2015 y la semana 52 del año 2016, todos reportados entre enero y diciembre del 2016. En 45 (8%) de los 580 pacientes estudiados fue confirmada la infección por ZIKV mediante RT-PCR en tiempo real.

El tiempo promedio entre la toma de muestras y la recepción de las mismas para su procesamiento en el laboratorio, fue de 4 días con un rango de 0 a 14 días en los casos confirmados, mientras que en los no confirmados el promedio fue de 5 días con un rango de 0 a 50 días. El tiempo promedio entre el inicio de síntomas y la toma de muestras fue de 3 días tanto para los casos confirmados como para los no confirmados.

En la tabla 1 se describen las características demográficas de los pacientes estudiados. El 62 % de los casos confirmados fueron mujeres. La mediana de edad fue de 24 años (rango de 2 a 54 años), siendo el grupo de 20 a 29 años el más afectado seguido por el de 10 a 19 (Figura 1).

TABLA 1. DATOS DEMOGRÁFICOS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

Característica del Paciente	**Confirmados (%) N= 45**	**No confirmados %) N=535**	**Total (%) N=580**
Sexo			
Femenino	28 (62.2)	301 (56.3)	329 (56.7)
Masculino	17 (37.8)	234 (43.7)	251 (43.3)
Rango de Edades			
0 – 9	7 (15.6)	85 (15.9)	92 (15.9)
10 – 19	10 (22.2)	123 (23.0)	133 (22.9)
20 – 29	12 (26.7)	106 (19.8)	118 (20.3)
30 – 39	5 (11.1)	86 (16.1)	91 (15.7)
40 – 49	8 (17.8)	54 (10.1)	62 (10.7)
50 – 59	3 (6.7)	37 (6.9)	40 (6.9)
> = 60	0 (0)	44 (8.2)	44 (7.6)
Región Sanitaria			
I Concepción	0 (0.0)	2 (0.4)	2 (0.3)
II San pedro	1 (2.2)	11 (2.1)	12 (2.1)
III Cordillera	1 (2.2)	12 (2.2)	13 (2.2)
IV Guaira	1 (2.2)	5 (0.9)	6 (1.0)
V Caaguazu	0 (0.0)	18 (3.4)	18 (3.1)
VI Caazapa	2 (4.4)	16 (3.0)	18 (3.1)
VII Itapua	0 (0.0)	30 (5.6)	30 (5.2)
VIII Misiones	0 (0.0)	7 (1.3)	7 (1.2)
IX Paraguari	25 (55.6)*	126 (23.6)	151 (26.0)
X Alto Parana	1 (2.2)	6 (1.1)	7 (1.2)
XI Central	5 (11.1)	119 (22.2)	124 (21.4)
XII Pilar	0 (0.0)	16 (3.0)	16 (2.8)

XIII Amambay	0 (0.0)	18 (3.4)	18 (3.1)
XIV Canindeyu	0 (0.0)	4 (0.7)	4 (0.7)
XV Presidente Hayes	0 (0.0)	7 (1.3)	7 (1.2)
XVI Boquerón	2 (4.4)	29 (5.4)	31 (5.3)
XVIII Asunción	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

***** P< 0,05 (0,00000613)

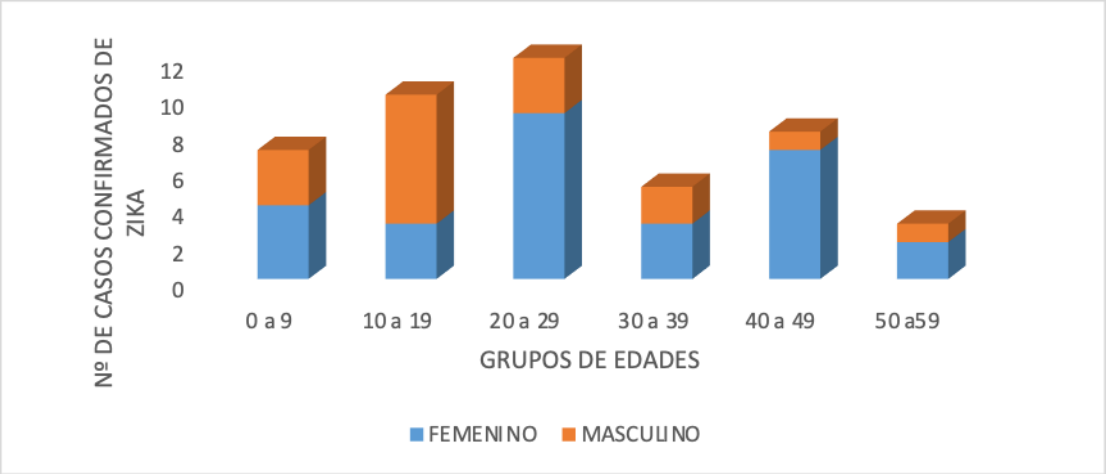


Figura 1. Distribución de casos confirmados de ZIKV por grupos de edades y sexo. Paraguay 2016

Fueron confirmados casos en 9 de las 18 Regiones Sanitarias del país, la mayoría de los casos provenían de los Departamentos de Paraguarí, Central y de la Capital (Figura 2). Ninguno de los casos confirmados reporta haber viajado fuera del país en las 2 semanas anteriores al inicio de síntomas.

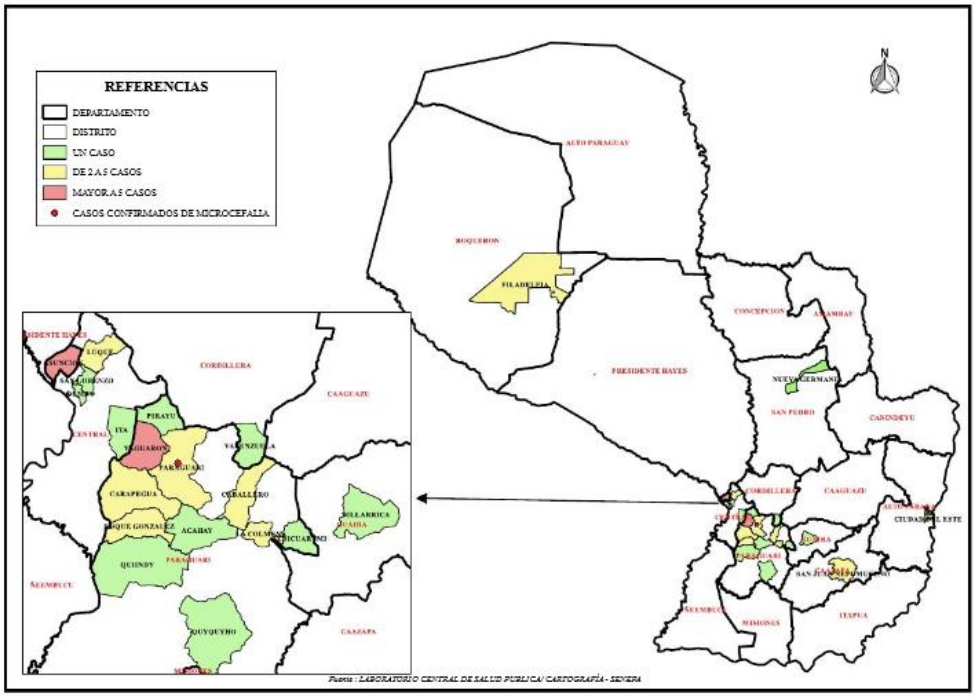


Figura 2. Distribución geográfica de Casos confirmados de ZIKV. Paraguay 2016.
Las capitales departamentales se muestran en letras rojas, y los distritos en letras negras.

La mayoría de los casos detectados se registraron entre las semanas epidemiológicas 1 y 12 del año 2016 con un pico en la semana epidemiológica 5, aunque también se detectaron casos aislados en la semana 46 y 52 del 2016 (fig 3).

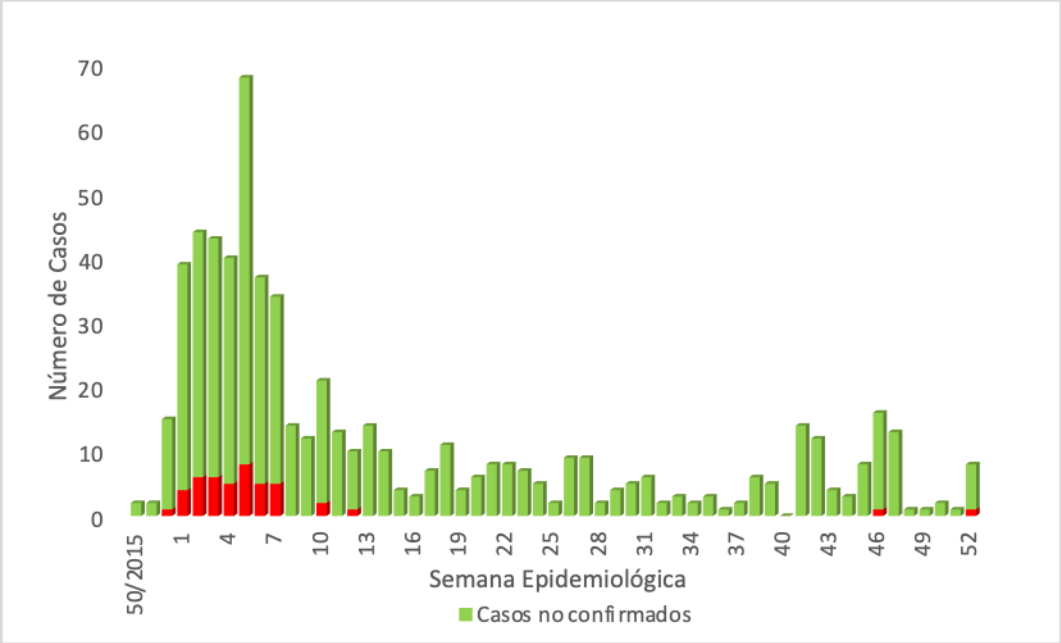


Figura 3. Distribución de casos confirmados de ZIKV por semana epidemiológica. Paraguay 2016

Entre los casos confirmados de ZIKV, el 9% (4/45) fueron hospitalizados y 41% fueron ambulatorios, mientras que entre los casos no confirmados el 14% fueron hospitalizados y el 86% ambulatorios; sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Tratándose de casos notificados en la Vigilancia de Síndrome febril agudo, la fiebre graduada o referida estuvo presente prácticamente en todos los pacientes. Los síntomas más comúnmente reportados en los casos confirmados se detallan en la tabla 2, entre los que destacan cefalea, mialgias y artralgias. Ningún síntoma en particular se encontró significativamente relacionado a ZIKV. No se reportaron muertes entre los pacientes estudiados.

TABLA 2. SIGNOS Y SINTOMAS DE CASOS CONFIRMADOS DE ZIKV. PARAGUAY 2016

Síntomas / Signos	Total (%) n=580	Positivos (%) n= 45	Valor de P
Fiebre	572 (98.6)	44 (97.8)	0,614
Cefalea	457 (78.8)	36 (80.0)	0,837
Mialgia	421 (72.6)	31 (68.9)	0,563
Artralgias	351 (60.5)	30 (66.7)	0,380
Dolor Retro Ocular	276 (47.6)	22 (48.9)	0,855
Nauseas	223 (38.4)	14 (31.1)	0,292
Exantema	165 (28.4)	10 (22.2)	0,335
Dolor Abdominal	134 (23.1)	8 (17.8)	0,377
Prurito	100 (17.2)	6 (13.3)	0,470
Tos	29 (5.0)	3 (6.7)	0,593
Inyección Conjuntival	59 (10.2)	2 (4.4)	0,186

4. **DISCUSIÓN**

Confirmamos en este estudio la circulación de ZIKV en 9 de las 18 Regiones Sanitarias del Paraguay durante el año 2016. La mayor parte de los casos fue detectada en el Departamento de Paraguarí, donde durante el mismo periodo se registró un brote de CHIKV (23), lo que podría haber solapado la sospecha clínica de las infecciones por ZIKV. Durante el mismo año fueron también confirmados en todo el país más de 2.000 casos de DENV (24).

Consistentemente con estos hallazgos, en 8 de las 9 regiones sanitarias en las cuales hemos confirmado los casos de ZIKV, hubo reportes de casos sospechosos de microcefalia asociada a ZIKV durante el año 2016 (25). En efecto, los 2 casos confirmados de microcefalia asociada a ZIKV en el 2016, se registraron en regiones en las cuales también encontramos casos positivos de ZIKV en el presente estudio.

Los casos confirmados se registraron principalmente durante los 3 primeros meses del año 2016, aunque también fueron detectados casos aislados en noviembre y diciembre, lo que sugiere que no hubo corte de la transmisión viral en todo el año. Es probable que los meses sin detección viral, la transmisión se haya mantenido a expensas de casos leves o asintomáticos, que según publicaciones pueden llegar hasta el 75% de todos los casos (5).

Los adultos jóvenes y adolescentes, así como el sexo femenino, fueron los grupos más afectados en la población estudiada. Patrones similares de distribución por edad y sexo han sido reportados en otras investigaciones, que encontraron las mayores tasas de enfermedad por ZIKV en mujeres de 20 a 29 años (26, 27), en coincidencia con los resultados de este estudio. Aunque se desconoce la causa de la mayor incidencia de la enfermedad por ZIKV entre las mujeres mayores de 20 años, se estima que podría estar relacionada a una mayor exposición a los mosquitos Aedes en el hogar, síntomas más severos entre las mujeres en ciertos grupos de edad, mayor búsqueda de atención sanitaria, transmisión sexual, entre otras (27, 28).

En relación al cuadro clínico, es importante mencionar que al seleccionar pacientes de la vigilancia de síndrome febril, es evidente la introducción del sesgo de la fiebre resultando este el síntoma más frecuente. De hecho, a diferencia de otros estudios publicados en los cuales el exantema y el prurito fueron los síntomas más frecuentes (5, 7, 29), aquí encontramos con mayor frecuencia cefalea, mialgias y artralgias además de la

fiebre. Sin embargo resultados similares a los nuestros fueron encontrados en una investigación realizada en pacientes febriles detectados por Vigilancia hospitalaria en Indonesia (30). Debe también ser considerado que la población aquí enfocada fueron personas que buscaron asistencia médica, probablemente debido a una sintomatología moderada a severa. Por otro lado, los casos leves, con síntomas no percibidos por la población como importantes para recurrir a los servicios, pudieron haber pasado desapercibidos.

Cabe también resaltar que los pacientes estudiados fueron justamente aquellos en quienes los médicos tratantes no sospecharon infección por ZIKV, por lo tanto, es de esperarse que los síntomas más comunes encontrados aquí no correspondan a lo habitualmente reportado en esta enfermedad (5, 7, 29). Estos hallazgos sugieren una presentación clínica muy variable en pacientes con infección por ZIKV, y no debería descartarse la sospecha ante la ausencia de exantema y/o prurito, especialmente durante brotes simultáneos de otros arbovirus con sintomatología similar, que imponen el reto de diferenciar clínicamente estas infecciones.

Una de las limitaciones de este estudio fue el tiempo prolongado entre la recolección de algunas muestras y su recepción en el laboratorio (hasta 50 días en algunos casos), sin poder garantizar la correcta conservación de las mismas, principalmente las que provenían de zonas alejadas de la capital. Este hecho sumado a las dificultades para el diagnóstico de ZIKV debido a los niveles breves y bajos de viremia reportados en otras investigaciones (16), podría incidir en la sensibilidad de detección de los casos por RT-PCR. Esta presunción es reforzada por el hecho de que a excepción de residir en Paraguarí (p= 0,00000613), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las características generales y síntomas registrados entre casos confirmados y descartados por RT-PCR, lo que hace suponer que una proporción de las muestras que resultaron negativas podrían haber correspondido a verdaderos casos de ZIKV.

Por otro lado en este estudio solamente fueron analizadas muestras negativas para DENV y CHIKV, por lo tanto no fueron investigadas las coinfecciones. En consecuencia es esperable que la proporción de casos de infección por ZIKV en la población general sea mayor a la encontrada en la población estudiada.

5. CONCLUSIÓN

En conclusión, aunque las limitaciones descriptas podrían conducir a resultados que no reflejen con exactitud la magnitud y distribución real de la enfermedad en Paraguay, queda demostrada la transmisión del ZIKV en gran parte del territorio paraguayo durante varios meses del año 2016. Se refleja además la complejidad del diagnóstico de ZIKV en el contexto de circulación de DENV y CHIKV, resaltando la necesidad de agudizar la sospecha clínica sin limitarse a síntomas muy específicos. Esto cobra vital importancia en el caso de las mujeres en edad fértil, que fueron el grupo más afectado en este estudio, ante el riesgo de las anomalías congénitas atribuidas a ZIKV.

No podemos desconocer el impacto que podría tener en el contexto de la vigilancia, el hecho de no detectar los casos de ZIKV que llegan a los servicios de salud, ya que se estaría perdiendo la oportunidad de establecer medidas de prevención y control oportunas, sobre todo considerando las diversas vías de transmisión para este virus. El principal hallazgo del presente estudio es la demostración de casos confirmados de infección por ZIKV que no fueron detectados por la Vigilancia Regular de Síndrome febril agudo, lo cual indica la necesidad de fortalecer la Vigilancia incluyendo sus componentes epidemiologico, clínico y laboratorio.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. D. Musso, C. Roche, E. Robin, T. Nhan, A. Teissier, V. M. Cao-Lormeau, Potential sexual transmission of Zika virus. Emerg. Infect. Dis. 21, 359–361 (2015). Medline doi:10.3201/eid2102.141363

2. J. Mlakar, M. Korva, N. Tul, M. Popović, M. Poljšak-Prijatelj, J. Mraz, M. Kolenc, K. Resman Rus, T. Vesnaver Vipotnik, V. Fabjan Vodušek, A. Vizjak, J. Pižem, M. Petrovec, T. Avšič Županc, Zika Virus Associated with Microcephaly. N. Engl. J. Med. 374, 951–958 (2016). Medline doi:10.1056/NEJMoa1600651

3. Pierson TC, Diamond MS 2013. Flaviviruses. In DM Knipe, PM Howley (eds.), Fields virology, 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 747-794.

4. Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, Oliveira JVC, Diallo M, Zanotto PMA, Sall AA 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. PLOS Negl Trop Dis 8: e2636.

5. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med. 2009;360:2536–43. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715

6. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. Emerg Infect Dis. 2014;20:1085–6. http://dx.doi.org/10.3201/ eid2011.141380

7. Zanluca C, de Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015;110:569–72.

8. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. Emerg Infect Dis. 2015;21:1885–6. http://dx.doi.org/ 10.3201/eid2110.150847

9. Epidemiological Update Zika virus infection 17 February 2016. Pan American Health Organization .www.paho.org. PAHO/WHO, 2016. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=33296&lang=en

10. V.-M. Cao-Lormeau, A. Blake, S. Mons, S. Lastère, C. Roche, J. Vanhomwegen, T. Dub, L. Baudouin, A. Teissier, P. Larre, A. L. Vial, C. Decam, V.

Choumet, S. K. Halstead, H. J. Willison, L. Musset, J. C. Manuguerra, P. Despres, E. Fournier, H. P. Mallet, D. Musso, A. Fontanet, J. Neil, F. Ghawché, Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. Lancet 387, 1531–1539 (2016). 10.1016/S0140-6736(16)00562-6 Medline doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6

11. E. J. Rubin, M. F. Greene, L. R. Baden, Zika Virus and Microcephaly. N. Engl. J. Med. 374, 984–985 (2016). 10.1056/NEJMe1601862 Medline doi:10.1056/NEJMe1601862

12. G. Calvet, R. S. Aguiar, A. S. Melo, S. A. Sampaio, I. de Filippis, A. Fabri, E. S. Araujo, P. C. de Sequeira, M. C. de Mendonça, L. de Oliveira, D. A. Tschoeke, C. G. Schrago, F. L. Thompson, P. Brasil, F. B. Dos Santos, R. M. Nogueira, A. Tanuri, A. M. de Filippis, Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. Lancet Infect. Dis. 16, 653– 660 (2016). Medline doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5

13. H. Tang, C. Hammack, S. C. Ogden, Z. Wen, X. Qian, Y. Li, B. Yao, J. Shin, F. Zhang, E. M. Lee, K. M. Christian, R. A. Didier, P. Jin, H. Song, G. L. Ming, Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. Cell Stem Cell 18, 587–590 (2016). Medline doi:10.1016/j.stem.2016.02.016

14. World Health Organization. Weekly epidemiological record. No 7, 2016, 91, 73-88. http://www.who.int/entity/wer/2016/wer9107.pdf?ua=1

15. Faria NR, Azevedo RS, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. Science. 2016;352:345–349. doi: 10.1126/science. aaf5036. Epub 2016 Mar 24.

16. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis 2008; 14:1232–9. doi: 10.3201/eid1408.080287.

17. Boletín epidemiológico Semanal. Dirección General de Vigilacia de la Salud Paraguay. Edición Nro. 5- Año 2015.

18. Boletín epidemiológico Semanal. Dirección General de Vigilacia de la Salud Paraguay. Edición Nro. 48- Año 2015.

19. Boletín epidemiológico Semanal. Dirección General de Vigilacia de la Salud Paraguay. Edición Nro. 45- Año 2016.

20. Saad-Roy CM, van den Driessche P, Ma J. Estimation of Zika virus prevalence by appearance of microcephaly. BMC Infectious Diseases. 2016;16:754. doi:10.1186/s12879-016-2076-z.

21. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, et al. (2013) Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. PLoS Negl Trop Dis 7(7): e2311. doi:10.1371/journal.pntd.0002311

22. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL 2007. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. Emerg Infect Dis 13: 764-767.

23. Boletín epidemiológico Semanal. Dirección General de Vigilacia de la Salud Paraguay. Edición Nro. 13- Año 2016.

24. Boletín epidemiológico Semanal. Dirección General de Vigilacia de la Salud Paraguay. Edición Nro. 48- Año 2016.

25. Boletín epidemiológico Semanal. Dirección General de Vigilacia de la Salud Paraguay. Edición Nro. 47- Año 2016.

26. Lozier M, Adams L, Febo MF, Torres-Aponte J, Bello-Pagan M, Ryff KR, Munoz-Jordan J, Garcia M, Rivera A, Read JS, Waterman SH, Sharp TM, Rivera-Garcia B. Incidence of Zika Virus Disease by Age and Sex - Puerto Rico, November 1, 2015-October 20, 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016 Nov 11;65(44):1219-1223. doi: 10.15585/mmwr.mm6544a4.

27. dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, et al. Zika virus and the GuillainBarré Syndrome—case series from seven countries. N Engl J Med 2016;375:1598–601. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1609015

28. Coelho FC, Durovni B, Saraceni V, et al. Higher incidence of Zika in adult women than adult men in Rio de Janeiro suggests a significant contribution of sexual transmission from men to women. Int J Infect Dis 2016;51:128–32. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.023

29. Cardoso CW, Paploski IAD, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MMO, Campos GS. 514 Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and 515 dengue viruses, Salvador, Brazil. Emerg Infect Dis 2015;21:2274–6.

30. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981;75(3):389-93.