



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

“INFECCIÓN POR VIRUS ZIKA Y SÍNDROME DE GUILLAIN BARRÉ”.

Lina María Villa Sánchez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia
2017

“INFECCIÓN POR VIRUS ZIKA Y SÍNDROME DE GUILLAIN BARRÉ”.

Lina María Villa Sánchez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Especialista en infectología

Director (a):

Jorge Alberto Cortés Luna MD

Profesor asociado
Departamento de Medicina Interna
Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Medicina Tropical

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia

2017

“No puedo dormir ya. El desesperante sonido de la campanilla que precede al sacerdote portador del viático, ha penetrado para siempre en la paz de mi alma. Todos los horrores, de los que diariamente soy impotente testigo, me hacen la vida imposible. No puedo permanecer en la situación actual, donde todo es oscuro, donde lo único categórico es el número de muertos”.

Ignaz Semmelweis

Agradecimientos

Quiero expresar mis más profundos agradecimientos a mis maestros, quienes han compartido conmigo sus conocimientos, no solo en lo académico sino también en la vida y sus vicisitudes, gracias por su tiempo, dedicación y la pasión que le imprimen cada día a la docencia.

A mis padres por cuidarme y apoyarme siempre en lo que me he propuesto.

A mi esposo Alejandro, quien ha emprendido conmigo este camino, gracias por la paciencia, el amor y la ayuda constantes, sin tu apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también tuyo.

Resumen

Introducción: en los últimos años junto a la pandemia producida por la infección por virus Zika, se ha evidenciado un aumento en complicaciones neurológicas potencialmente asociadas, entre ellas la microcefalia neonatal en relación con la infección durante el embarazo y el síndrome de Guillain Barré (SGB). **Objetivo:** identificar el rol de la infección por virus Zika en los nuevos casos de síndrome de Guillain Barré presentados durante el brote de Zika en Valledupar, Colombia. **Diseño:** Estudio analítico de casos y controles para la identificación de factores de riesgo de SGB. La población fueron pacientes hospitalizados en las Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) de cinco instituciones de tercer nivel de Valledupar con Síndrome de Guillain-Barré durante la epidemia de Zika en Colombia. Se establecieron dos grupos de control emparejados por residencia, el primero paciente adulto que haya presentado síndrome febril sin síntomas neurológicos durante el brote por virus Zika en la región y el segundo familiares de los casos con Síndrome de Guillain Barré pertenecientes a la misma zona del caso. Se recolectaron muestras de sangre y se realizaron estudios diagnósticos. **Resultados:** 25 pacientes fueron diagnosticados con SGB durante el periodo de estudio, catorce de ellos (56%) presentaron síndrome febril 7 a 14 días previos al ingreso y la mediana de tiempo transcurrido entre el síndrome febril y el inicio de los síntomas neurológicos fue de 10 días (IQR 10-14). Se realizaron pruebas serológicas en 21 pacientes. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los casos y controles (control familiar) en la frecuencia de positividad para Zika (90% vs 61%, $p < 0.05$). Están pendientes los anticuerpos neutralizantes por reducción de placas y correr el modelo final para evaluar el impacto de Zika en GB. **Conclusión:** Este estudio proporciona evidencia de que la infección por el virus del Zika es un desencadenante del síndrome de Guillain-Barré.

Palabras clave: Infección por virus Zika, Síndrome de Guillain Barré, Colombia, Valledupar, Brote

Abstract

Introduction: in recent years, in addition to the marked spread of Zika virus infection, there has been an increase in associated neurological complications, including neonatal microcephaly in relation to infection during pregnancy and Guillain Barré syndrome (GBS).

Objective: To identify the role of Zika virus infection in the new cases of Guillain Barré syndrome presented during the Zika outbreak in Valledupar, Colombia. **Design:** Analytical case and control study to identify GBS risk factors. The population was hospitalized patients in the Intensive Care Units (ICU) of five third level institutions of Valledupar with Guillain-Barré syndrome during the initial phase of the Zika epidemic in Colombia. Two control groups matched by residence were established, the first group were adult patients who presented febrile syndrome without neurological symptoms during the Zika virus outbreak in the region and the second control group were family members of cases with Guillain Barré syndrome belonging to the same area of the case. Blood samples were collected and diagnostic studies were performed. **Results:** 25 patients were diagnosed with GBS during the study period, fourteen of them (56%) presented febrile syndrome 7 to 14 days before admission and the median time between febrile syndrome and onset of neurological symptoms was 10 days (IQR 10-14). Serological tests were performed in 21 patients. A statistically significant difference was observed between cases and controls (family control) in the frequency of positivity for Zika (90% vs 61%, $p < 0.05$). Neutralizing antibodies are pending by plate reduction and run the final model to evaluate the impact of Zika in GB. **Conclusion:** This study provides evidence that infection with Zika virus is a trigger for Guillain-Barré syndrome.

Keywords: Zika Virus Infection, Guillain-Barré Syndrome, Outbreak, Colombia, Valledupar

Contenido

Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Objetivos	5
1.1 Objetivo general	5
1.2 Objetivos específicos	5
2. Métodos	7
2.1 Tipo de estudio	7
Estudio analítico de casos y controles para la identificación de factores de riesgo	7
2.2 Población y muestra	7
2.2.1 Población	7
2.2.2 Muestra	7
2.3 Criterios de inclusión	8
2.3.1 Para los casos:	8
2.3.2 Para los controles	8
2.4 Criterios de exclusión	8
2.4.1 Para los casos	8
2.4.2 Para los controles	8
2.5 Métodos de laboratorio	9
2.6 Aspectos éticos	11
2.7 Análisis estadístico	11
3. Resultados	13
4. Discusión	20
5. Limitaciones	26
6. Conclusiones	27
A. Anexo: Formato de recolección de datos	28

B. Anexo: Formulario de consentimiento informado para pacientes a incluir en el estudio.....	30
C. Anexo: Clinical Follow-up of Patients with Guillain-Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection.....	32
Bibliografía	41

Lista de figuras

Figura 3-1. Casos confirmados y sospechosos de enfermedad por virus Zika, Cesar, semanas epidemiológicas 32 de 2015 a 28 de 2016, y casos de SGB en nuestro estudio

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1. Datos generales pacientes con Síndrome de Guillain Barré	13
Tabla 3-2. Valoración neurológica inicial e intervenciones terapéuticas pacientes con Síndrome de Guillain Barré	14
Tabla 3-3. Resultados de estudios: LCR y neuroconducción	15
Tabla 3-4. Detección de ARN ZIKV, IgM e IgG para ZIKV y Dengue	16
Tabla 3-5. Detección IgM para CMV, E. barr, Herpes I y II, CHIKV, Elisa VIH 1-2.....	17
Tabla 3-6. Examen físico de control pacientes con SGB y ZIKV	18

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura Término

1. <i>C.jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
2. <i>CHIKV</i>	Chikungunya
3. <i>CMV</i>	Citomegalovirus
4. <i>Dx</i>	Diagnóstico
5. <i>EBV</i>	Virus de Epstein barr
6. <i>Ig</i>	Inmunoglobulina
7. <i>IQR</i>	Rango intercuartil
8. <i>LCR</i>	Líquido cefalorraquideo
8. <i>n</i>	Número
10. <i>PRNT</i>	Prueba de anticuerpos neutralizantes por reducción de placas
11. <i>RT-PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
12. <i>SGB</i>	Síndrome de Guillain Barré
13. <i>UCI</i>	Unidad de Cuidados Intensivos
14. <i>VHS-1 y 2</i>	Virus Herpes simple 1 y 2
15. <i>VIH</i>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
16. <i>ZIKV</i>	Virus Zika

Introducción

El virus Zika (ZIKV) es un flavivirus emergente poco conocido, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, estrechamente relacionado con el serocomplejo Spondweni (1). Como otros miembros del género *Flavivirus*, ZIKV contiene un ARN genómico positivo de una sola cadena que codifica una poliproteína que se procesa en tres proteínas estructurales, a saber, la proteína de la cápside, el precursor de la membrana, y la proteína de la envoltura, además de siete proteínas no estructurales (2). La confirmación de la infección por ZIKV se realiza por la identificación de los productos genómicos en muestras de sangre u orina de fase aguda por RT-PCR (3, 4) o por anticuerpos contra el virus que deben ser confirmados por ensayos de neutralización ya que presentan reacción cruzada con otros flavivirus (5).

Tradicionalmente reconocida como una infección de curso benigno presentándose habitualmente como una enfermedad similar a la influenza con fiebre y rash cutáneo, en los últimos años esta arbovirosis ha cobrado especial interés dado su extensión geográfica y la expresión en algunos casos de complicaciones neurológicas como microcefalia y síndrome de Guillain-Barré (SGB) (6,7,8).

El síndrome de Guillain-Barré es una polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, su incidencia mundial es 0.6-4 / 100.000 personas/año. En dos tercios de los pacientes, el SGB se produce después de una infección (9). Desde hace varias décadas el SGB se ha asociado al antecedente de infecciones gastrointestinales y respiratorias. Uno de los primeros estudios llevados a cabo fue el de Rens y col. en 1996 que demostró la asociación entre la infección previa por *Campylobacter jejuni* y el desarrollo posterior de Guillain Barré, además una recuperación lenta y severa incapacidad residual (10). Posteriormente se ha demostrado asociación con virus de la familia herpes, hepatitis E, sarampión y rubiola (11,12,13). Con respecto a las arbovirosis se han descrito casos

posteriores a infección por Virus del Nilo Occidental, Dengue y Chikungunya y en los últimos meses por Zika (14, 15, 18).

Después del primer brote de Zika documentado en el Pacífico en la isla Yap en 2007, la cepa asiática del virus reapareció en la Polinesia francesa, en octubre de 2013, y desde entonces ha causado grandes brotes en Nueva Caledonia (1.400 casos confirmados), Islas Cook (más de 900 casos) e Isla de Pascua. En la Polinesia Francesa, la extrapolación de los 8.746 casos sospechosos reportados por la red de vigilancia permite inferir que más de 30.000 consultas médicas se deben a la propagación del virus Zika en todo el archipiélago. Entre noviembre de 2013 y febrero de 2014, se evidenció un aumento de la incidencia de complicaciones neurológicas, incluyendo 42 casos de síndrome de Guillain – Barré (16,17). Lormeau y col. publicaron un estudio de casos en controles en el que encontraron que el 98% de los casos con síndrome de Guillain-Barré presentaron Zika vs 56% en los controles (18).

En las Américas la circulación autóctona del virus ha sido detectada desde 2014. En febrero de 2014, las autoridades nacionales de Chile confirmaron el primer caso de transmisión autóctona de ZIKV en la Isla de Pascua localizada en el Océano Pacífico sudoriental. En mayo de 2015, el Ministerio de Salud de Brasil confirmó la transmisión autóctona de ZIKV en el noreste parte del país. Esta fue el primer brote documentado en Brasil y en las Américas (19).

En octubre de 2015, el Ministerio de Salud de Colombia reportó el primer caso autóctono de la infección ZIKV en el Departamento de Bolívar. A partir de la declaración de la fase epidémica de la enfermedad por virus Zika en el país (semana epidemiológica 40 de 2015) hasta la semana epidemiológica 28 de 2016 la cual fue el cierre de epidemia, se han notificado 8.826 casos confirmados y 90.895 sospechosos por clínica (20). Adicionalmente, desde que se inició la vigilancia especial de los síndromes neurológicos con antecedente de enfermedad compatible con infección por virus Zika hasta la semana 28 de 2016 se han notificado al sistema de vigilancia epidemiológica del país 599 casos de síndromes neurológicos (Síndrome de Guillain-Barré, polineuropatías ascendentes, entre otras afecciones neurológicas similares) con antecedente de enfermedad febril compatible con infección por virus Zika, los cuales se encuentran en proceso de verificación (20)

Debido a este escenario clínico y epidemiológico, es de iimportancia crítica confirmar o disipar con investigación rigurosa e intensiva un vínculo causal entre la infección de Zika y el desarrollo de complicaciones neurológicas entre ellas el síndrome de Guillain Barré, además se necesitan mejores estrategias de salud pública para controlar la diseminación del brote, continuar en la búsqueda de nuevas posibilidades terapéuticas y enfrentar de manera apropiada las complicaciones de la infección en nuestros países.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Identificar el rol de la infección por virus Zika en los nuevos casos de síndrome de Guillain Barré (SGB) presentados durante el brote de Zika en Valledupar, Colombia

1.2 Objetivos específicos

- Establecer las características clínicas y epidemiológicas específicas del síndrome de Guillain Barré en pacientes de Valledupar durante el brote de Zika
- Evaluar la relación entre infección previa por Zika y desarrollo de Guillain Barré
- Ajustar el modelo de asociación teniendo en cuenta variables confusoras identificadas en los controles durante el brote.
- Mostrar las características neurológicas de los pacientes seis meses después de un episodio de Guillain-Barré (SGB) relacionado con la infección por ZIKV

2. Métodos

2.1 Tipo de estudio

Estudio analítico de casos y controles para la identificación de factores de riesgo

2.2 Población y muestra

2.2.1 Población

Pacientes hospitalizados en las Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) de cinco instituciones de tercer nivel de Valledupar con Síndrome de Guillain-Barré durante la etapa inicial de la epidemia Zika en Colombia.

2.2.2 Muestra

Se identificaron a partir de la base de datos suministrada por las UCI de las siguientes instituciones prestadoras de servicios en salud de Valledupar: Clínica Médicos, Clínica Laura Daniela, Clínica Valledupar, Clínica Erasmo, y Hospital Rosario Pumarejo de López, los pacientes con diagnóstico de síndrome de Guillain-Barré, definidos por los criterios clínicos y de LCR expuestos en la definición de caso de Brighton (21) entre septiembre de 2015 hasta julio de 2016. De las historias clínicas se obtuvieron los datos necesarios. Se identificaron los pacientes y se asignaron dos grupos de control en relación 1:1, consistentes en el primer grupo pacientes adultos residentes de Valledupar que hayan presentado síndrome febril sin síntomas neurológicos durante el brote por virus Zika en la región y que hayan consultado o no al servicio de urgencias, el segundo familiares de los casos con Síndrome de Guillain Barré o docentes de una escuela pertenecientes a la misma zona del caso. Los controles fueron apareados por área geográfica y fecha. La información de los casos y los controles fue tomada de las historias clínicas y de una entrevista a través de un instrumento (anexo 1). Fueron recolectadas muestras de sangre para los pacientes con SGB y para los controles y se realizaron serologías IgM e IgG para Zika y Dengue y anticuerpos neutralizantes para Zika y Dengue, IgM para CMV, EBV, VHS 1 y 2, *Campylobacter jejuni*, y ELISA para VIH. Con dos controles por caso, y en el supuesto de que 100 % de los pacientes con el síndrome de Guillain-Barré y el 56% de los

controles reportarán una reciente infección por el virus Zika (18), se calculó el tamaño de muestra con un poder del 90% y un error alfa de 0.05. Se estableció una base de datos usando el programa Stata versión 11.0

2.3 Criterios de inclusión

2.3.1 Para los casos:

- Paciente adulto con diagnóstico clínico de Síndrome de Guillain Barré que ingresó a la UCI de las instituciones incluidas en el estudio durante el periodo de estudio. Los pacientes fueron categorizados de acuerdo los criterios de Brighton en niveles de certeza para el diagnóstico.

2.3.2 Para los controles

- Paciente adulto residente de Valledupar que haya presentado síndrome febril sin síntomas neurológicos durante el brote por virus Zika en la región y que haya consultado o no al servicio de urgencias.
- Familiares de los casos con Síndrome de Guillain Barré o docentes de una escuela, en ambas situaciones pertenecientes a la misma zona del caso.

2.4 Criterios de exclusión

2.4.1 Para los casos

- Pacientes en los que no se disponga la información completa en las historias clínicas.
- Mujeres embarazadas
- Población pediátrica

2.4.2 Para los controles

- Se excluirá pacientes en los que no se disponga la información completa en las historias clínicas.
- Se excluirá población pediátrica
- Se excluirán pacientes con compromiso neurológico

2.5 Métodos de laboratorio

El grupo del estudio se encargó de la toma de muestras para su posterior procesamiento según las técnicas aceptadas internacionalmente

Se realizó el envío de las muestras al Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud INS a través de un servicio de mensajería contratado para este fin con los datos de identificación: (fecha, hora de envío, número de la muestra, historia clínica, sitio de proveniencia etc.) con un número consecutivo y código (asignado a cada institución) correspondiente a un paciente diferente cada vez, siguiendo las normas de bioseguridad para dicho envío.

Fueron recolectadas muestras de sangre para los pacientes con SGB y para los controles y se realizaron serologías IgM e IgG para Zika y Dengue y anticuerpos neutralizantes para Zika y Dengue, IgM para CMV, EBV, VHS 1 y 2, *Campylobacter jejuni*, y ELISA para VIH. La detección de IgM e IgG contra el virus Zika se realizó con dos kits de pruebas que contienen tiras de microtitulación cada una con 8 pocillos de reactivo de ruptura cubiertos con antígeno NS1 específico para el virus Zika (Euroimmun AG, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la primera etapa de la reacción, las muestras diluidas de los pacientes se incuban en los pozos. En el caso de muestras positivas, los anticuerpos IgG específicos (IgA e IgM) se unirán a los antígenos. Para detectar los anticuerpos unidos, se lleva a cabo una segunda incubación usando una enzima marcada anti-IgG humana (conjugado enzimático) y en el caso del Kit de medición de IgM anti Zika, anti IgM humana, que cataliza una reacción de color (Anti-Zika Virus ELISA IgG Test EUROIMMUN AG, Germany; Anti-Zika Virus ELISA IgM EUROIMMUN AG, Germany). Adicionalmente, se realizó RT-PCR para virus Zika en suero (Protocolo Triplex en tiempo real-CDC, tomado en el momento del ingreso del paciente a la institución con sospecha de Guillain Barré en los casos, en los controles en el momento de la aplicación del instrumento).

A los pacientes con IgG o IgM positiva para Zika o para Dengue se les realizó prueba de anticuerpos neutralizantes por reducción en placas (PRNT), para este ensayo se emplearon células Vero (ATCC® CCL-81™) y un aislado clínico Colombiano del virus Zika (ZIKV). Se sembraron monocapas de células Vero en placa multiwell de 24 pozos (8×10^4 células/pozo) en 500µL de medio MEM (Gibco-Thermo Scientific, Carlsbad-US) suplementado (HEPES 100mM [Sigma, Darmstadt-GE], bicarbonato de sodio 0.75%, suero fetal bovino y mezcla de antibióticos/antimicóticos 1X) y se incubaron durante una noche en atmósfera de CO₂ al 5% para garantizar la adherencia. Al día siguiente, se

prepararon 500 µL de diluciones (1:80, 1:160, 1:320, 1:640 y 1280) de sueros de pacientes (previamente inactivados a 56°C por 30 min) con 125 unidades formadoras de placas (PFUs) del ZIKV para cada dilución. Adicionalmente, se empleó un control de plaqueo (125 PFUs de ZIKV en 500 µL sin sueros humanos) y un suero control (1:80 en 500 µL con 125 PFUs de ZIKV) previamente seleccionado mediante pruebas de ELISA por carecer de anticuerpos contra virus Dengue, ZIKV y CHIKV. Las mezclas de diluciones de sueros y ZIKV se incubaron a 37°C por 1 hora para facilitar la formación de inmunocomplejos. Posteriormente se adicionaron 100 µL de cada dilución por triplicado sobre las monocapas de células Vero y se incubaron a 37°C por 1 hora en atmosfera de CO₂ al 5%. Luego, se retiró el inóculo y adicionaron 1.5mL de medio MEM con carboximetil-celulosa (CMC) al 3% suplementado (HEPES 100mM, bicarbonato de sodio 0.75%, suero fetal bovino y mezcla de antibióticos/antimicóticos 1X) y las células se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% durante 5 días al cabo de los cuales se retiró la mezcla de MEM/CMC y las monocapas fueron teñidas con solución de cristal violeta al 0.2% en formaldehído 3.5% y etanol 70% (1:1). Los títulos PRNT para cada paciente se reportaron como el recíproco de la última dilución del suero que mostró una reducción mayor o igual al 50% con respecto al control de plaqueo de acuerdo a lo reportado previamente (22). En caso de presentar neutralización para virus Zika, para descartar falsos positivos se realizó el mismo procedimiento para los serotipos 2 y 3 del virus Dengue, los cuales explican más del 90% de los casos de Dengue en Colombia. Se consideró infección por virus Zika reciente si la prueba de neutralización para este virus fue positiva y la Dengue negativa; en caso de que ambas pruebas resultaran positivas se interpretó como infección reciente por virus Zika si sus títulos de anticuerpos neutralizantes eran cuatro o más veces mayores que los del virus Dengue.

Para las pruebas de diagnóstico diferencial se usaron Kits comerciales de inmunoensayo enzimático. La detección de IgM contra VHS-1 y 2 se realizó usando una prueba inmunoenzimática indirecta para determinar anticuerpos frente a herpes simplex en suero/plasma humano (Mircell, Microbiologist, España); esta prueba usa como antígenos la glucoproteína recombinante gG-1 y gG-2. Para la detección de IgM contra Epstein Barr se usó el kit para identificación de IgM frente al antígeno de la cápside (Mircell, Microbiologist, España). La detección de IgM contra CMV se realizó con el kit de inmunoensayo enzimático de Mircell, Microbiologist, España.

La determinación de IgM contra *C. Jejuni* se realizó con un kit de inmunoensayo enzimático comercial que usa antígenos de la membrana externa del microorganismo (Virion/Serion, multianalyt, Alemania). La detección de anticuerpos contra VIH-1 y 2 se hizo a través de enzimoimmunoanálisis que detecta anticuerpos IgG, IgM e IgA frente a las glucoproteínas de la envoltura y frente a las proteínas del core del VIH-1 y VIH-2 (Murex HIV-1.2.0. Diasorin, Italia). Por último, la detección de anticuerpos IgM dirigidos contra el CHIKV se realizó a través de inmunoensayo enzimático de captura (NovaLisa, NovaTec, Alemania)

2.6 Aspectos éticos

El estudio puede ser considerado como una investigación con mínimo riesgo según la resolución No. 008430 de 1993(60), que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud (Constitución 1991, Ley 23 1981), debido a que es un estudio de casos y controles que emplea el registro de datos obtenido a través de una historia clínica y extracción de volumen de sangre de menos de 20 cc por punción venosa.

El protocolo estará sujeto a las normas establecidas por las instituciones participantes. Se solicitó consentimiento informado para la toma de muestra de los pacientes y se solicitó a la institución la exención del consentimiento informado para los casos en los cuales hubo muestra de suero disponible (Anexo 2).

La información recolectada es confidencial y será conservada por uno de los investigadores principales (JAC) en la Universidad Nacional de Colombia por un período de 5 años. No se registran datos sensibles ni se conservarán datos que identifiquen al paciente (números de historia clínica, teléfonos, etc.).

2.7 Análisis estadístico

Para variables cualitativas se analizarán con frecuencias absolutas y porcentuales. Para variables cuantitativas continuas se analizarán con medidas de tendencia central como el promedio, medidas de dispersión como la desviación estándar y para determinar variabilidad se analizará por medio del coeficiente de variación en donde del 0 – 10% es homogéneo, 10 – 20% moderadamente homogéneo y >20% heterogéneo. Para variables cuantitativas discretas se utilizarán medianas y análisis según el número de variables. En casos de probabilidad baja se asemejarán a una distribución normal y se analizarán de forma similar a las variables continuas.

Para determinar asociación se utilizará la prueba χ^2 o test exacto de Fisher con un nivel de significancia del 5%.

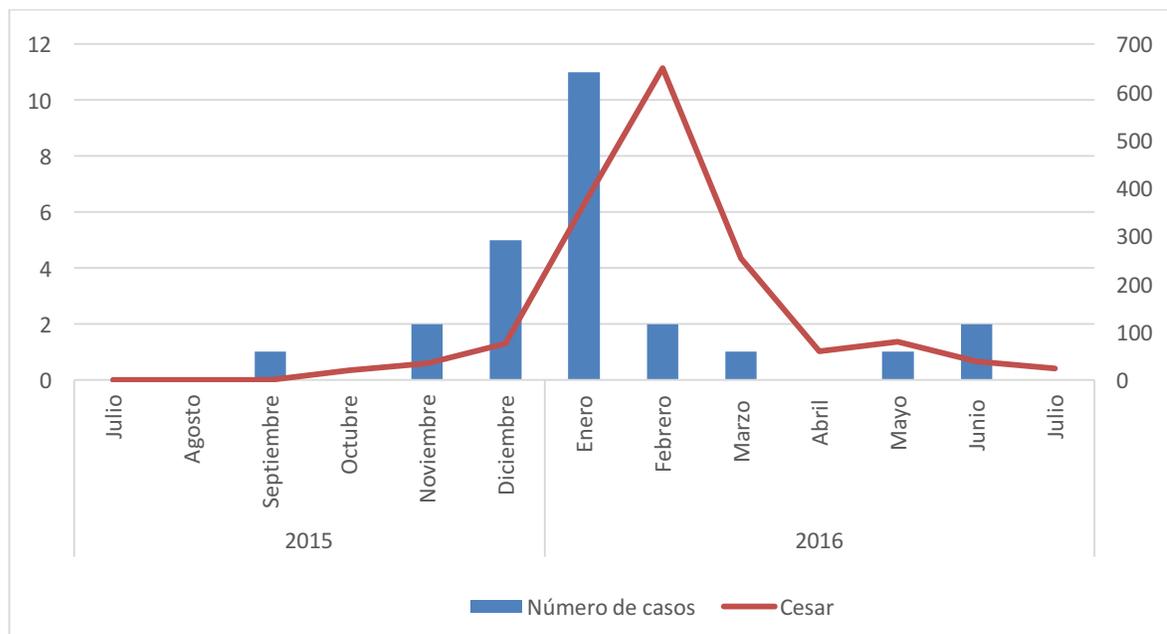
Se calculará los OR crudos y ajustados con intervalo de confianza del 95% para evaluar la potencial relación entre los factores que se van a estudiar y el desarrollo de síndrome de Guillain-Barré. El test exacto de Fisher será usado para la comparación de proporciones.

Se usará un modelo de regresión logística para determinar las variables independientes para el desenlace infección previa por virus Zika y síndrome de Guillain-Barré. El análisis se realizará en Stata ver 11.0.

3. Resultados

En total, 25 pacientes con diagnóstico de Síndrome de Guillain Barré fueron ingresados a las Unidades de Cuidados Intensivos de las instituciones incluidas en el estudio durante el periodo evaluado. Al distribuir el número de casos de pacientes con SGB en nuestro estudio según la fecha de presentación con corte mensual, se evidencia una correspondencia con el comportamiento de la notificación de casos de SGB con antecedente de enfermedad compatible con infección por virus Zika y con la curva de notificación de casos de morbilidad por Zika en Colombia según el sistema de vigilancia del país (20), con el mayor número de casos en las semanas 3 y 4 de 2016, correspondiente al mes de enero. Comparando con los datos publicados de casos confirmados y sospechosos de infección por ZIKV para el departamento del Cesar, también hay una correspondencia en el patrón de distribución unimodal, aunque el pico de casos de SGB en nuestro estudio fue en enero y el de casos de ZIKV en el Cesar fue en febrero, lo que puede deberse a un retraso en la notificación de casos al sistema de vigilancia nacional en esta región (Figura 3-1).

Figura 3-1: Casos confirmados y sospechosos de enfermedad por virus Zika, Cesar, semanas epidemiológicas 32 de 2015 a 28 de 2016, y casos de SGB en nuestro estudio.



La mediana de edad de los pacientes con SGB fue 46 años (IQR 36-66), 16 eran hombres (64%), la mediana de hospitalización fue 23 días (IQR 13-29). Catorce pacientes (56%) presentaron síndrome febril 7 a 14 días previos al ingreso y la mediana de tiempo transcurrido entre el síndrome febril y el inicio de los síntomas neurológicos fue de 10 días (IQR 10-14). Cinco pacientes (25%) padecían alguna comorbilidad seria, tres presentaban diabetes, uno VIH y uno hepatitis B crónica (Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Datos generales pacientes con Síndrome de Guillain Barré

	n (%) o mediana (IQR)
Total 25 pacientes	
Edad	46 (36 - 66)
Hombres	16 (64%)
Tiempo de hospitalización (días)	23 (13 - 29)
Síndrome febril 7-14 días previos al ingreso	14 (56%)
Tiempo entre el síndrome febril y el inicio de los síntomas neurológicos (días)	10 (6 - 14)
Duración de estancia en UCI (días)	17 (7 - 20)

El examen neurológico al momento del diagnóstico evidenció debilidad muscular simétrica e incapacidad para caminar en los 25 pacientes (100%), parálisis facial unilateral en 3 (12%) y bilateral en 11 (44%), disfagia en 13 pacientes (52%) y dificultad respiratoria en 14 (56%) (Tabla 3-2). Al evaluar la discapacidad al ingreso a través de la escala funcional de gravedad clínica de Hughes, 13 pacientes (52%) tuvieron una clasificación grado 4, los 12 restantes (48%) grado 5. Se obtuvo información acerca del LCR en 13 pacientes (52%), la mediana de proteínas fue de 102 mg/dl (IQR 72-122), 11 pacientes (85%) no presentaron pleocitosis, y se encontró disociación albumino-citológica en 11 pacientes (85%). Estudios de neuroconducción se realizaron en 7 pacientes (28%), todos con hallazgos compatibles con Guillain Barré con el mismo patrón de compromiso mixto mielínico y axonal (tabla 3-3). Se contó con la información acerca del tratamiento específico en 22 pacientes, 10 (45%) recibieron manejo con inmunoglobulina, 7 (32%) con plasmaféresis, y 5 (23%) con inmunoglobulina y plasmaféresis. 12 pacientes (48%) requirieron ventilación mecánica, a 6 de los cuales se realizó traqueostomía. La mediana de la estancia en UCI fue de 17 días

(IQR 7 - 20) y la mediana de ventilación mecánica fue 19 días (IQR 6 – 25). Trece pacientes (59%) presentaron infecciones asociadas al cuidado de la salud.

Tabla 3-2: Valoración neurológica inicial e intervenciones terapéuticas pacientes con SGB

Síntomas en la admisión	n (%) o mediana (IQR)
Debilidad Muscular simétrica	25 (100%)
Debilidad limitada a miembros inferiores	6 (24%)
Incapacidad para caminar	25 (100%)
Arreflexia o disminución de los reflejos	25 (100%)
Parálisis facial unilateral	3 (12%)
Parálisis facial bilateral	11 (44%)
Disfagia	13 (52%)
Dificultad respiratoria	14 (56%)
Tratamiento: inmunoglobulinas	14 (64%)
Tratamiento: plasmaféresis	12 (50%)
Disautonomía	12 (52%)
Convulsiones otros que no correspondan al Dx	0 (0%)
Requirió soporte vasoactivo	7 (33%)
Duración de estancia en UCI (días)	23 (11 - 25)
Requerimiento de ventilación mecánica	10 (48%)
Discapacidad (por la escala funcional de Hughes	
1	0
2	0
3	0
4	13 (52%)
5	12 (48%)
6	0

Tabla 3-3: Resultados de estudios: LCR y neuroconducción

	n (%) o mediana (IQR)
Pacientes con estudio de LCR	13 (52%)
Proteínas mg/dl	104 (70-127)
Incremento de proteínas por encima de punto de corte 52 mg/dl	12 (92%)
Leucocitos 0 cel/ml	11 (85%)
Leucocitos 100- 200 cel/ml	2 (15%)
Disociación albumino-citológica	11 (85%)
Pacientes con estudios de neuroconducción	7/25 (28%)
Hallazgos de Neuroconducción consistentes con uno de los subtipos de GB	7 (100%)

De los 25 pacientes con SGB fue posible realizar estudio serológico a 21 de ellos. En el primer grupo de control correspondiente a personas que presentaron síndrome febril durante el brote de la infección por virus Zika se lograron reclutar 23 individuos, y en el segundo grupo control correspondiente a familiares de los casos con Guillain Barré pertenecientes a la misma zona del caso 18 individuos.

La infección reciente por virus Zika no fue soportada por la IgM positiva para Zika ni en grupo de pacientes con SGB ni en los dos grupos de control, con positividades de 5%, 4% y 11%, respectivamente ($p > 0.05$) (Tabla 3-4). Sin embargo, la IgG para virus Zika fue positiva en 90% de los pacientes con SGB versus 87% del grupo control 1 ($p = 0.75$) y 61% en el grupo control 2 (pacientes con SGB vs grupo control 2 $p = 0.03$). Con respecto a la infección por virus Dengue, el 100% tanto de los casos como de los controles fueron positivos para IgG, a diferencia de la IgM la cual fue positiva en 24% de los casos, versus 0 en el grupo control 1 y 6% en el grupo control 2, alcanzando una diferencia significativa entre los casos y el primer grupo control ($p = 0.01$) y no entre los casos y el segundo grupo control ($p = 0.11$). Dado la alta probabilidad de reacción cruzada de la respuesta a anticuerpos entre virus Zika y Dengue, se realizó la prueba de neutralización, cuyos resultados se encuentran pendientes a la fecha.

Tabla 3-4: Detección de ARN ZIKV, IgM e IgG para ZIKV y Dengue

Prueba diagnóstica	Pacientes con SGB n (%) Total: 21	Grupo control 1 n (%) Total: 23	Valor de p	Grupo control 2 n (%) Total: 18	Valor de p
IgG Dengue	21 (100)	23 (100)	1	18 (100)	1
IgM Dengue	5 (24)	0	0.01	1 (6)	0.11
IgG Zika	19 (90)	20 (87)	0.75	10 (61)	0.03
IgM Zika	1 (5)	1 (4)	0.94	2 (11)	0.45
RNA Zika	2 (10)	0		0	

Adicionalmente se realizaron pruebas serológicas para *Campylobacter jejuni*, siendo la IgM positiva en 24%, 22% y 28% del grupo de casos, control 1 y control 2 respectivamente, sin diferencias significativas entre los grupos (grupo casos vs grupo control 1 $p=0.86$; grupo casos vs grupo control 2 $p=0.65$). En las pruebas serológicas para Chikungunya, CMV, EBV, herpes virus II y VIH-1 y 2 tampoco se encontraron diferencias significativas, sin embargo, la IgM para virus Herpes I sí mostró diferencias, siendo positiva en 38% de los casos, 57% del primer grupo control y 83% del segundo grupo control (grupo casos vs grupo control 1 $p=0.45$; grupo casos vs grupo control 2 $p=0.0045$) (Tabla 3-5).

Tabla 3-5: Detección IgM para CMV, EBV, VHS 1 y 2, CHIKV, Elisa VIH 1-2

Prueba diagnóstica	Pacientes con SGB n (%) Total: 21	Grupo control 1 n (%) Total: 23	Valor de p	Grupo control 2 n (%) Total: 18	Valor de p
IgM CMV	0	0	1	0	1
ELISA VIH 1-2	1 (5)	0	0.29	0	0.34
IgM <i>C. jejuni</i>	5 (24)	5 (22)	0.86	5 (28)	0.65
IgM E. barr	2 (10)	4 (17)	0.45	4 (22)	0.71
IgM Herpes I	8 (38)	13 (57)	0.45	15 (83)	0.0045
IgM Herpes II	0	0	1	1 (6)	0.28

Tabla 3-5: (Continuación)

IgM CHIKV	0	1 (4)	0.33	0	1
-----------	---	-------	------	---	---

La valoración clínica de control se realizó en promedio 193 días posterior al ingreso de la hospitalización por el SGB (IQR 187-240). Fue posible evaluar a 15 pacientes, puesto que los datos de contacto de la historia clínica no correspondían a la ubicación del paciente en 10 de ellos y no fue posible contactarlos. El examen neurológico evidenció persistencia de cuadriparesia en 6 (40%), debilidad limitada a miembros inferiores en 2 (13%), dificultad para caminar en 4 (27%), incapacidad para caminar en 2 (13%), parálisis facial unilateral en 3 (20%) y bilateral en un paciente (7%). Ninguno presentaba disfagia o dificultad respiratoria y 12 pacientes (80%) eran independientes en su ABC (Tabla 3-6). 7 pacientes (47%) tuvieron una clasificación de Hughes grado 1, 2 pacientes (13%) grado 2, 4 pacientes (27%) grado 3 y 2 pacientes grado 4.

Tabla 3-6: Examen físico de control pacientes con SGB y ZIKV

	n/N (%) ¹ (IQR)
Número de pacientes evaluados: 15	
Tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el control (días)	193 (187-240)
Hombres	10/15 (67%)
Debilidad limitada a miembros superiores	0/15 (0%)
Debilidad limitada a miembros inferiores	2/15 (13%)
Cuadriparesia	6/15 (40%)
Dificultad para caminar	4/15 (27%)
Incapacidad para caminar	2/15 (13%)
Arreflexia o disminución de los reflejos	4/15 (27%)
Parálisis facial unilateral	3/15 (20%)
Parálisis facial bilateral	1/15 (7%)
Disfagia	0/15 (0%)
Dificultad respiratoria	0/15 (0%)
Pérdida del control de esfínteres	0/15 (0%)
Independencia en su ABC	12/15 (80%)
Discapacidad (por la escala funcional de Hughes)	

Tabla 3-6: (Continuación)

1	7 (47%)
2	2 (13%)
3	4 (27%)
4	2 (13%)
5	0
6	0

¹n/N: el numerador corresponde al número de pacientes en los que se evidenció la alteración y el denominador al número de pacientes que fue evaluado para tal alteración

4. Discusión

Las investigaciones serológicas realizadas en las muestras de sangre de los pacientes que desarrollaron síndrome de Guillain-Barré durante el brote del virus del Zika en Valledupar Colombia confirmaron que la mayoría de los pacientes habían experimentado la infección por el virus del Zika (90%, 19 de 21 evaluados). La diferencia estadísticamente significativa entre los casos y controles (control familiar) en la frecuencia de positividad para Zika y el excluir múltiples causas alternativas de SGB están a favor de una asociación fuerte entre la infección previa por ZIKV y el desarrollo de SGB. Estos hallazgos son concordantes con los encontrados en estudios de Islas del Caribe, Pacífico Sur y Latinoamérica. En una serie de casos de viajeros que regresan de las Américas realizado en Países Bajos se encontró que los 18 pacientes presentaron un síndrome viral compatible con infección por Zika, uno de los individuos desarrolló SGB, adicionalmente la presencia de ZIKV fué confirmada por qRT-PCR (23). En Salvador, Brasil, investigaron la correlación temporal de la enfermedad exantemática aguda compatible con infección por ZIKV y el SGB, a través del sistema de vigilancia epidemiológica, ellos encontraron 17.503 casos reportados de enfermedad exantemática aguda y 51 hospitalizaciones de pacientes por SGB; El número de casos de SGB alcanzó su punto máximo después de un retraso de 5-9 semanas desde el pico en los casos de enfermedad exantemática aguda, proporcionando así un fuerte apoyo para una asociación directa del brote de SGB con el brote de enfermedad exantemática aguda 1-2 meses antes (24). En un estudio de vigilancia epidemiológica del ZIKV y la incidencia de parálisis flácida aguda realizado en las Islas del Pacífico Sur, basados en las predicciones de la Iniciativa Mundial para la Erradicación del Polio, el análisis individual de las islas evidenció que en 2015 solo en las islas Salomón hubo un incremento estadísticamente significativo de los casos de parálisis flácida reportados correlacionados con la emergencia del ZIKV. En ese año, nueve casos de parálisis flácida aguda fueron informados en comparación con el número esperado de dos (25). Aunque esta evidencia respalda una asociación entre la infección previa por ZIKV y el desarrollo de SGB, no prueban causalidad. Un estudio de casos y controles incluyó 42 casos de SGB durante el brote de Zika en la Polinesia Francesa y los comparó con 98 pacientes hospitalizados con enfermedad no febril (6). Los investigadores encontraron evidencia de que la infección por el virus del Zika fue mucho más común en los casos de SGB que los controles. Con respecto a datos publicados en nuestro país, Anaya y col. publicaron un estudio de casos y controles retrospectivo realizado en Cúcuta, con datos recolectados a través del sistema

de vigilancia epidemiológica nacional, y un total de 29 pacientes fueron diagnosticados con SGB; su incidencia en esta ciudad aumentó 4.41 veces durante el tiempo de la infección por ZIKV (26).

Con respecto a las pruebas de diagnóstico diferencial, el papel de la infección previa con virus herpes I en el desarrollo de GBS asociado con ZIKV merece más investigación, pues en nuestros pacientes con SGB se encontró menor proporción de casos positivos para IgM contra VHS-1 que en el segundo grupo control con una diferencia significativa, lo que podría corresponder a un rol protector para el desarrollo de SGB asociado a Zika. Sin embargo, algunas técnicas serológicas para la identificación de VHS-1 tiene problemas de sensibilidad y especificidad, por lo que este hallazgo puede estar en relación con la técnica utilizada más que con un resultado real del virus herpes como un factor de protección (27) .

En relación a la infección previa por Dengue, se ha discutido su papel como un factor que podría empeorar la respuesta a la infección por ZIKV, dado que los anticuerpos IgG formados en una infección previa por Dengue en un segundo reto por otra infección arboviral podrían responder de forma menos específica y generar una infección más severa (28), y tal vez incluso autoinmunidad. Aunque en nuestro estudio se encontró evidencia serológica de infección previa por virus Dengue en todos los casos de SGB, fue igual de frecuente en los grupos de control, lo cual está en contra de esta hipótesis, sin embargo la IgM contra dengue si fue más frecuente en el grupo de pacientes con SGB con una diferencia significativa contra el primer grupo control, lo que podría corresponder a una infección activa concomitante Zika-Dengue, o a un falso positivo para Dengue con infección activa por Zika. El papel de la relación del virus Dengue y la interpretación de los resultados serológicos aún son debatidos. De acuerdo a los CDC, la interpretación del resultado de los anticuerpos neutralizantes como infección por ZIKV reciente se confirma si la prueba para ZIKV es positiva y la de Dengue negativa (29), y de acuerdo a nuestra propuesta, lo que se hizo fue considerar infección por virus Zika reciente si la prueba de neutralización para este virus fue positiva y la Dengue negativa, y en caso de que ambas pruebas resultaran positivas se interpretó como infección reciente por virus Zika si sus títulos de anticuerpos neutralizantes eran cuatro o más veces mayores que los del virus Dengue. Estos resultados tendrán una discusión más profunda una vez se realicen las pruebas de PRNT.

Existe un profundo desconocimiento de la epidemiología de *C. jejuni* en Colombia; los estudios son muy limitados y únicamente se tienen registros puntuales de infección por este microorganismo en poblaciones específicas y en productos aviares, y no hay reportes con respecto a la asociación entre esta infección previa y el desarrollo de SGB en nuestro medio. Llama la atención que encontramos una positividad tanto en los casos como en los controles en alrededor de 1/4 de los individuos, lo cual contrasta con prevalencias de campilobacteriosis previamente reportadas en nuestro país de 2.3% en niños menores de 5 años (30) y 8.3% en manipuladores directos de aves de corral (31). Es poco probable que la positividad de esta prueba se deba a reacciones cruzadas dado la buena especificidad descrita, aunque podría presentarse con infecciones previas por *Helicobacter* o *Legionella pneumophila*, o por la presencia de autoanticuerpos como factor reumatoide y anticuerpos antifosfolípidos (32). Adicionalmente la IgM positiva podría representar una infección por *Campylobacter* incluso 70 días previa a la toma de la muestra (33).

El examen físico de ingreso de los pacientes con SGB en nuestro estudio evidenció un importante compromiso motor facial, en grado similar al descrito en el estudio de la Polinesia Francesa, sin embargo, todos nuestros pacientes presentaban dificultad para caminar y la mitad también presentaban disfagia, hallazgos mucho más frecuentes en nuestro estudio probablemente en relación a que se trata de pacientes que fueron manejados en las UCI. Con respecto a datos disponibles en pacientes críticos, en una serie de casos de Latinoamérica, se encontró que el 60% de los pacientes requirieron soporte hemodinámico, en contraste con nuestro estudio donde el 33% fueron soportados hemodinamicamente; el requerimiento de soporte ventilatorio en cambio fue similar en ambos estudios (34).

Los pacientes con síndrome de Guillain-Barré en este trabajo tienen hallazgos electrofisiológicos compatibles con el fenotipo mixto con compromiso mielínico y axonal, a diferencia del estudio de Cao-Lormeau y col. de la Polinesia Francesa, quienes encontraron en sus pacientes el tipo puramente axonal. Estos hallazgos también fueron diferentes a los reportados en otros estudios del territorio nacional. Anaya y col. en Cúcuta, encontraron predominio del patrón desmielinizante puro, seguido de axonal puro, sin describir hallazgos con compromiso mixto. Teniendo en cuenta que la inmunopatogénesis difiere en cada uno de estos modelos, como también el pronóstico, es

posible que la etnia y factores genéticos desempeñen un papel en el desarrollo del SGB asociado a Zika y en su expresión clínica.

Al primero de febrero de 2017, 70 países han notificado la transmisión autóctona por mosquitos del ZIKV desde el 2015 y 21 de estos países han notificado un incremento en la incidencia de SGB y/o confirmación de infección por ZIKV entre los casos de SGB (35). A nivel poblacional en Colombia a través del sistema de vigilancia epidemiológica se reportó un aumento en los casos de SGB durante el brote de la infección por virus Zika, con un total de 90.895 casos sospechosos por clínica de infección por ZIKV reportados durante el periodo del brote, y 599 casos de síndromes neurológicos con antecedente de enfermedad compatible con infección por virus Zika desde que se inició su notificación, 4 semanas después del inicio del brote de ZIKV, para una incidencia de 6.6 casos de síndromes neurológicos entre ellos SGB por 1000 pacientes afectados previamente por ZIKV. Llama la atención que con respecto a los casos reportados en Cesar, departamento que tiene como capital al municipio de Valledupar, notificó durante el periodo del brote 1533 casos sospechosos de ZIVK, y 11 casos de síndromes neurológicos con antecedente de enfermedad compatible con infección por ZIKV, lo que corresponde a una incidencia de 7.1 por 1000, mayor a la descrita a nivel nacional (20)

En Colombia Durante el brote de la infección por ZIKV y el aumento de los casos de SGB, se produjo un desabastecimiento progresivo de la inmunoglobulina IV en algunas zonas, lo cual se presentó en Valledupar (Rodríguez JY, comunicación personal), esto condujo a que se instauraran tratamientos de forma tardía, lo que podría llevar a una menor efectividad de la terapia y un tiempo de convalecencia mayor, aunque la información al respecto de la efectividad de la terapia con retrasos en su instauración de horas o incluso días no es clara. El ensayo de América del Norte mostró que la plasmaféresis es efectiva durante las primeras 4 semanas (36); los ensayos de Ig han incluido pacientes dentro de las 2 semanas del inicio de la enfermedad (37), pero diferencias menores dentro de esas primeras dos semanas no han sido evaluadas, sin embargo el retraso de la remisión mayor a dos días a un centro especializado si se ha identificado como un predictor independiente de pobre pronóstico (38).

En el 2015, año de inicio de la epidemia, no se contaba con una guía nacional para la atención de los pacientes con SGB, por lo que se observa que no existe unificación en el manejo instaurado. En nuestro estudio, 23% de los pacientes recibieron manejo con

inmunoglobulina IV y plasmaferesis, dicha combinación no ha demostrado beneficio adicional y en cambio genera un aumento en el gasto (36). Es aconsejable guiarse por las recomendaciones de la OMS para la detección y atención del SGB relacionado con Zika en la Región de las Américas (39) y por las guías de atención publicadas por el Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia en 2016, adicionalmente se debe trabajar en la divulgación de estos documentos entre el personal de salud (40).

Con respecto a la evolución clínica y las secuelas neurológicas, previamente, el pronóstico descrito de los pacientes con SGB admitidos a la ICU en Estados Unidos ha sido peor que el encontrado en nuestro estudio, con un promedio de estancia de 41 días y mortalidad del 5% en la ICU, esta última en relación a la edad avanzada y presencia de comorbilidades como enfermedad coronaria y diabetes mellitus (41). En nuestros pacientes se presentó una muerte, sin embargo, no se logró realizar estudio serológico a ese paciente por tal motivo no podemos concluir que ese caso estaba relacionado con infección por ZIKV previa, adicionalmente no refirió antecedente de síndrome febril 7-14 días previos a los síntomas neurológicos. La estancia en la UCI fue menor que lo reportado, aunque se trataba en su mayoría de pacientes jóvenes con pocas comorbilidades. El paciente que sufría de infección por VIH se encontraba recibiendo terapia antiretroviral con carga viral indetectable y linfocitos CD4 de 468 cel/ul; al paciente con hepatitis b se le hizo el diagnóstico durante su estancia por un antígeno de superficie positivo y no había recibido tratamiento previo. Con respecto a la recuperación neurológica parece haber sido un poco más lenta en los pacientes de nuestro estudio, pues 40% de los evaluados presentaban dificultad o incapacidad para caminar a los seis meses, en comparación con un estudio previo de pacientes admitidos a UCI, donde encontraron que solo un tercio de los pacientes presentaba marcha en algún grado dependiente al año de seguimiento (41). Así como previamente se ha establecido que los pacientes que requieren soporte ventilatorio presentan un peor pronóstico neurológico (38, 42), en nuestro estudio todos los pacientes que presentaron dificultad o incapacidad para caminar a los seis meses requirieron de ventilación mecánica. La recuperación más lenta en nuestro medio podría deberse al menor acceso que existe en algunas zonas de nuestro país a un adecuado y oportuno programa de rehabilitación.

El síndrome de Guillain-Barré es una experiencia frecuentemente abrumadora para cada paciente y su familia, a menudo tiene un sustancial impacto mental, social y financiero

como resultado de la necesidad de cuidados intensivos y una neurorrehabilitación prolongada debido a la lenta resolución de la discapacidad generada. Quedan numerosos desafíos que incluyen la identificación temprana y el control de desencadenantes infecciosos, un mejor acceso a la atención neurointensiva moderna en el país y en el mundo, y una mejor comprensión de la patogénesis que permitan establecer mejores terapias preventivas o de asistencia.

5. Limitaciones

Dado que se trata de un estudio epidemiológico comparativo de casos y controles, esta investigación presenta varias limitaciones. No se logró realizar las pruebas diagnósticas a todos los pacientes con Síndrome de Guillain Barré, de los 25 pacientes reclutados, se hicieron pruebas a 21 de ellos; el paciente que tuvo desenlace fatal no contó con muestra de sangre por lo que no podemos asociar esta muerte con la infección previa por ZIKV. Adicionalmente, dado el momento de la recolección de la muestra, pruebas como la PCR en suero no pudieron aportar información útil para establecer asociación, pues esta es positiva en los primeros cinco días de la infección y el desarrollo del SGB fue en promedio 10 días posterior al cuadro febril, este era el tiempo mínimo transcurrido hasta la toma de la muestra.

Por último, teniendo en cuenta que nos encontramos en un país endémico para dengue la probabilidad de reacción cruzada en las pruebas serológicas es alta.

6. Conclusiones

En conclusion, los resultados de este estudio indican que existe una asociación entre la infección previa por virus ZIKV y el desarrollo de Síndrome de Guillain Barré. . Se observó que no hay diferencias en los grupos para EBV, CMV, Herpes II, Campylobacter, VIH. Se observó una diferencia entre los grupos para la positividad de Herpes I lo que podría sugerir un papel protector.

Con respecto a la evolución clínica, el Síndrome de Guillain Barré relacionado con la infección por ZIKV es una enfermedad grave con un importante grado de discapacidad a los seis meses después del episodio

Deben ser completados los estudios de anticuerpos neutralizantes por reducción de placas y correr el modelo final para evaluar el impacto y causalidad de ZIKV en el SGB

A. Anexo: Formato de recolección de datos.

INFECCIÓN POR VIRUS ZIKA Y SÍNDROME DE GUILLAIN BARRÉ

Registro No.

Caso []

Control []

Código _____

Institución _____

Ingreso: D_____ / M_____ / A_____

Egreso: D_____ / M_____ / A_____

1. Edad: _____ Sexo: M [] F []

2. Síndrome febril 7 a 14 días previos al ingreso Sí ____ No ____

Si presento síndrome febril, fecha de inicio D_____ / M_____ / A_____

3. Tiempo entre el síndrome febril y el inicio de los síntomas neurológicos (días) ____

Fecha de inicio de los síntomas de Guillain Barré D_____ / M_____ / A_____

4. Síntomas al momento del ingreso:

- Debilidad Muscular simétrica ____
- Debilidad limitada a miembros inferiores ____
- Incapacidad para caminar ____
- Arreflexia o disminución de los reflejos ____
- Parálisis facial
 - Parálisis facial unilateral ____
 - Parálisis facial bilateral ____
- Disfagia ____
- Dificultad respiratoria ____

5. Tratamiento

- Inmunoglobulinas ____
- Plasmaféresis ____

6. Duración de estancia hospitalaria

- Estancia completa (días) _____
 - Días de estancia en UCI _____
7. Requerimiento de ventilación mecánica SI _____ No _____
8. Fecha de ingreso a UCI (o inicio de VM) (dd/mm/aaaa) y fecha de retiro de VM (dd/mm/aaaa)
9. DESENLACES
- Fallecimiento: SI NO Fecha: D____/ M____/ A____
 - Secuelas neurológicas a 30 días SI _____ No _____
 - Infecciones asociadas al cuidado de la salud SI _____ No _____
 - Tiempo de hospitalización Fecha de egreso: D____/ M____/ A____
 - Tiempo de paraparesia Fecha de última valoración con paraparesia _____
10. Hallazgos en líquido cefalorraquídeo
- Proteínas (mg/dl) _____
 - Incremento de la concentración de proteínas (punto de corte 52 mg/dl) SI _____ No _____
 - Células (por ml) _____
 - Disociación albumino-citológica SI _____ No _____
11. Resultados pruebas serológicas
- Serología IgM Zika Positiva [] Negativa [] SI
 - Anticuerpos neutralizantes contra virus Zika Positiva [] Negativa [] SI TITULOS
 - Anticuerpos neutralizantes contra virus DENGUE Positiva [] Negativa [] SI TITULOS
 - Serología IgM Dengue Positiva [] Negativa [] SI
 - Serología IgM para *Campylobacter jejuni* Positiva [] Negativa []
 - Serología IgM citomegalovirus Positiva [] Negativa []
 - Serología IgM Epstein Barr Positiva [] Negativa []
 - Serología IgM herpes virus simple 1 Positiva [] Negativa []
 - Serología IgM herpes virus simple 2. Positiva [] Negativa []
 - ELISA para VIH Positivo [] Negativo []

B. Anexo: Formulario de consentimiento informado para pacientes a incluir en el estudio

INFECCIÓN POR VIRUS ZIKA Y SÍNDROME DE GUILLAIN BARRÉ

A pacientes, mayores de 18 años, que se encuentren hospitalizados con diagnóstico de síndrome de Guillain Barré o quienes ingresen al servicio de urgencias por un cuadro de síndrome febril 7 a 14 días previos a la consulta, se les solicita autorización para tomar una muestra de sangre con el fin de poder realizar las pruebas serológicas para Zika, Dengue, *Campylobacter jejuni*, citomegalovirus, Epstein Barr y herpes virus simple 1 y 2.

Mediante este formato se desea pedir su colaboración para participar en una investigación sobre la infección por virus sika y el síndrome de Guillain Barré, con el propósito de conocer mejor nuestra situación local con relación a las complicaciones neurológicas asociadas al brote por virus Zika. Para la realización del presente estudio autorizo al personal médico y paramédico de la Universidad Nacional del Colombia y del hospital/Clínica _____ a utilizar una de las muestras de sangre recolectadas a mi ingreso para determinar los anticuerpos para Zika, Dengue, *Campylobacter jejuni*, citomegalovirus, Epstein Barr y herpes virus simple 1 y 2.

Estas muestras serán trasladadas al laboratorio de virología del Instituto Nacional de Salud en donde se procesarán y se guardarán para investigaciones futuras. En caso de dudas podré consultar al doctor Jorge Cortés del Departamento de Medicina Interna de la Universidad Nacional de Colombia.

Se me informa que el ingreso a este estudio no implica costo alguno y que la toma de muestra no tiene riesgos para mi salud, que la complicación más frecuente es el hematoma en el sitio de la venopunción. Los beneficios de las pruebas que se hagan con mi suero se verán reflejados en los resultados de este estudio que aportará información útil para el desarrollo de estrategias de manejo para las complicaciones neurológicas asociadas a la infección por virus Zika.

Autorizo informar los resultados clínicos de este estudio a las instituciones científicas designadas por los investigadores principales y las entidades que participan en esta investigación. Autorizo la utilización de los resultados en investigaciones posteriores.

Después de haber leído y explicado suficientemente lo anterior, acepto voluntariamente participar en este estudio firmando este formulario de consentimiento.

Nombre completo: _____

Documento de identidad: _____

Firma: _____ (Impresión digital si no sabe escribir)

Fecha: Día ____ mes ____ Año _____

Testigo 1: _____ CC: _____

Testigo 2: _____ CC: _____

Información Departamento de Medicina Interna, Universidad Nacional de Colombia (57) 1 3165000 Ext 1501

C. Anexo: Clinical Follow-up of Patients with Guillain-Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection¹

Authors: Lina Maria Villa¹, Jorge Alberto Cortés¹, José Yesid Rodríguez², Dioselina Pelaez³, Angelica María Rico Turca³, Lissethe Carolina Pardo Herrera³

Affiliations:

1. Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, National University of Colombia, Bogotá, Colombia.
2. Center for Microbiological Research of Cesar - CIMCE, Valledupar, Colombia.
3. Group of Virology, National Institute of Health, Bogotá, Colombia.

Corresponding author:

Jorge Alberto Cortés

Address: Of. 510, Edificio Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, Cra. 30 no. 45-03, Bogotá, Colombia.

Phone: +57 3153514013

Electronic mail: jacortesl@unal.edu.co

Abstract

¹ Nota de transparencia: el siguiente artículo fue sometido inicialmente a Emerging Infectious Diseases y rechazado por el editor sin evaluación pareada debido al número pequeño de pacientes y, especialmente, el escaso tiempo de seguimiento (menor a un año). El artículo fue sometido a International Journal of Infectious Diseases (Elsevier; Factor de impacto de 5 años: 2.592).

During the outbreak of Zika in Colombia in 2016, we followed 15 patients with Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus with clinical evaluation at admission and follow-up at 6 months. Severe neurological disease with low mortality and long-term disability, especially walking problems, was found.

Introduction

Zika virus (ZKV) infection has been classically described as having a benign course; however, in recent years, in addition to its marked spread, there has been an increase in the associated neurological complications, including neonatal microcephaly for infection during pregnancy and Guillain-Barré syndrome (GBS) as a post-infection complication once the symptoms of the acute viral syndrome have disappeared. GBS is an acute inflammatory demyelinating polyneuropathy, with a global incidence between 0.6 and 4 per 100,000 people per year (1), which presents an important morbidity due to the neurological sequelae that can lead to a non-negligible mortality rate.

In 2/3 of patients, GBS occurs after infection (2). For several decades GBS has been associated with a history of gastrointestinal and respiratory infections. One of the first studies was that of Ress et al. in 1996, who demonstrated the association between a previous infection by *Campylobacter jejuni* and the later development of GBS, in addition a slow recovery and severe residual incapacity (3). Subsequently, an association with herpes, hepatitis E, measles, and rubella virus was found (4-6). With regard to arbovirosis, cases have been described following infection with West Nile Virus, dengue, Chikungunya, and, in recent months, Zika (7-9). The evolution of patients with GBS associated with ZKV is not known.

We identified patients with GBS and followed them after some months evaluating the serological response and the evolution of the neurological symptoms.

The study

Patients were identified from a database provided by the intensive care units (ICUs) of the following health service providers in Valledupar, Colombia (168 m above sea level, 874 km from the capital city - Bogotá, approximately 180 km from the

Caribbean Sea): Médicos Clinic, Laura Daniela Clinic, Valledupar Clinic, Erasmo Clinic, and Rosario Pumarejo de López Hospital. Patients were diagnosed with GBS, defined by the clinical and cerebrospinal fluid (CSF) criteria set out in the Brighton case definition (10), between September 2015 and June 2016, which corresponded to the period of introduction of Zika in Colombia. From the medical records, the necessary data were obtained. Blood samples were collected from patients with GBS at the time of diagnosis. IgM and IgG detection against ZKV was performed with two test kits containing microtiter strips with 8 wells each of burst reagent covered with the NS1 antigen specific for ZKV (EUROIMMUN AG, Germany), following the manufacturer's instructions. In the first stage of the reaction, diluted patient samples were incubated in the wells. In the case of positive samples, the specific IgG antibodies (IgA and IgM) bind to the antigens. To detect bound antibodies, a second incubation was carried out using a labeled enzyme anti-human IgG (enzyme conjugate) and, in the case of the Anti-Zika IgM Measurement Kit, anti-human IgM, which catalyzes a color reaction (Anti-Zika Virus ELISA IgG Test EUROIMMUN AG, Germany; Anti-Zika Virus ELISA IgM EUROIMMUN AG, Germany). In addition, RT-PCR for ZKV in serum was performed (Triplex Protocol real-time-CDC, taken at the time of the patient's admission to the institution with suspicion of GBS). Patients with positive serology for Zika were clinically evaluated at a later clinical examination.

Results: Twenty-five patients were diagnosed with GBS, and a serological study was possible in 21 of these patients, of which 19 (90%) were positive only for Zika IgG, 1 (5%) was positive for IgG and IgM, and 1 (5%) was negative on both tests. Two patients (of 17 who underwent the test) were positive for ZIKA in their serum via PCR results. Of the 20 patients with Zika and GBS, 15 (75%) were men, the median age was 45 years (interquartile range (IQR) 36- 56), and the median hospitalization was 26 days (IQR 15-34). Fourteen patients (70%) presented febrile syndrome 7 to 14 days prior to admission, and the median time elapsed between febrile syndrome and the onset of neurological symptoms was 9 days (IQR 6-14).

Five patients (25%) had some serious comorbidity, 3 had DM2, one had HIV, and one had chronic hepatitis B. Neurological examination at the time of diagnosis revealed a symmetrical muscular weakness and an inability to walk in 20 patients (100%), unilateral facial paralysis in 2 patients (10%), bilateral in 10 patients (50%), dysphagia in 11 patients (55%), and respiratory distress in 12 patients (60%). Information on the CSF was obtained in 11 patients (55%), the median protein was 106 mg/dl (77-127), 9 patients (81%) had no pleocytosis, and albumin-cytological dissociation was found in the 10 patients (91%). Nerve conduction studies were performed in 7 patients, who all had findings compatible with GBS. Information on specific treatment was available in 17 patients, 5 patients (29.4%) were treated with immunoglobulin, 7 (41%) with plasmapheresis, and 5 (29.4%) with immunoglobulin and plasmapheresis. In 10 patients (55%), mechanical ventilation was required, and 6 of these patients required a tracheostomy. The median ICU stay was 19 days (IQR 8 - 21) (see Table 1). The median duration of mechanical ventilation was 20 days (IQR 7 – 25).

Clinical assessment of control was performed on average 193 days after hospitalization for GBS (IQR 187-240). It was possible to evaluate 15 patients (75%); the neurological examination revealed a persistence of quadriparesis in 6 (40%), weakness limited to the lower limbs in 2 (13%), walking difficulty in 4 (27%), inability to walk in 2 (13%), unilateral facial paralysis in 3 (20%), and bilateral in 1 patient (7%). None had dysphagia or respiratory distress, and 12 patients (80%) were independent in their basic daily activities (BDAs) (see Table 2).

Conclusions: We describe the 6-month neurological sequelae of patients with GBS related to ZKV. Previously, the reported prognosis of patients with GBS admitted to ICU in the United States was worse than that found in our study, with an average stay of 41 days and mortality of 5% in the ICU; the latter was associated with advanced age and the presence of comorbidities, such as coronary disease and diabetes mellitus (11). In our cohort, no deaths were reported, and the stay was shorter; however, our patients were mostly young patients with few comorbidities. The patient suffering from HIV infection was receiving antiretroviral therapy with an

undetectable viral load and CD4 lymphocytes of 468 cells/ μ l; the patient with hepatitis B was diagnosed during his stay by a positive surface antigen and had not received prior treatment. The neurological recovery seems to have been slightly slower in our study, since 40% had difficulty or inability to walk at 6 months; in contrast, a previous study of patients admitted to an ICU found that only 1/3 of the patients presented some degree of gait problems depending on the year of follow-up (11). The requirement for ventilatory support has been associated with a worse neurological prognosis (12, 13); similarly, in our study, all patients who had difficulty or inability to walk at 6 months required mechanical ventilation. The slower recovery in our country could be due to the reduced access to an appropriate and timely rehabilitation program that exists in some areas of our country.

Although in Colombia, the notification of cases of ZKV infection persists, in epidemiological week 24 of 2017, 46 cases of Zika were reported, whereas in the same week of 2016, 1571 cases were reported, with a total of 1388 cases of ZKV infection reported as of 2017 (14). In addition, 46 cases of neurological syndromes (GBS, ascending polyneuropathies, and other similar neurological conditions) were reported up to epidemiological week 24 of 2017 with a history of febrile illness compatible with ZKV infection (14). These data suggest that Colombia is no longer in an outbreak situation; however, the virus continues to circulate in the country, and although neurological complications continue to occur although they have decreased.

Finally, we consider that GBS related to ZKV infection is a serious illness with a significant degree of disability at 6 months after the event, despite occurring in young patients with a lower comorbidity and a low mortality in the ICU.

Financing

This study has direct funding from the Cesar Microbiological Research Center (Centro de Investigaciones Microbiológicas del Cesar, CIMCE). It also had indirect support from the National Institute of Health of Colombia and the National University of Colombia.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to state.

References

1. Hughes RAC RJ. Clinical and epidemiological features of Guillain-Barré syndrome. *J Infect Dis.* 1997;176(suppl 2):S92-8.
2. Hughes RA CD. Guillain-Barré syndrome. *Lancet.* 2005;366:1653-66.
3. Rees J SS, Gregson N, Hughes R. *Campylobacter jejuni* infection and guillain–Barré syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:1374-9.
4. Ma Y FJ, Qi Y, Dou G. An immunocompetent adult patient with hepatitis and guillain-Barré syndrome after cytomegalovirus infection. *Virology Journal* 2011;8:95.
5. Masajtis -Zagajewska A MK, Mochecka-Thoelke A, Kurnatowska I, Nowicki M. Guillain-Barré syndrome in the course of EBV infection after kidney transplantation – a case report. *Ann Transplant.* 2012;17(3):133-7.
6. Tomiyasu K IM, Kato K, Komura M, Ohnuma E, Inamasu J and Takahashi T. Bilateral Retrobulbar Optic Neuritis, Guillain-Barré Syndrome and Asymptomatic Central White Matter Lesions Following Adult Measles Infection. *Inter Med* 2009;48:377-81.
7. Prevention CfDCa. Arboviral infections of the central nervous system—United States, 1996– 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1998;47:517-22.
8. Lebrun G CK, Reboux A, Martinet O, Gaüzère B. Guillain-Barré Syndrome after Chikungunya Infection. *Emerging Infectious Diseases.* 2009;15(3):495-6.
9. Musso D NE, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect.* 2014.
10. Fokke C vdBB, Drenthen J, Walgaard C, van Doorn PA, Jacobs BC. Diagnosis of Guillain-Barre syndrome and validation of Brighton criteria. *Brain.* 2014;137:33-43.
11. Dhar R SL, Hahn A. The morbidity and outcome of patients with Guillain–Barré syndrome admitted to the intensive care unit. *Journal of the Neurological Sciences* 2008;264:121-8.
12. Fletcher DD LN, Wolter TD, and Wijdicks EF. Long-term outcome in patients with Guillain–Barre syndrome requiring mechanical ventilation. *Neurology.* 2000;54(12):2311-5.
13. Witsch J GN, Bender A, Kollmar R, Bösel J, Hobohm C, Günther A, Schirotzek I, Fuchs K, Jüttler E. . Long-term outcome in patients with Guillain-Barré syndrome requiring mechanical ventilation. *J Neurol.* 2013;260(5):1367-74.

14. Instituto Nacional de Salud C. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 24 de 2017. 2017.

Table 1. Initial data of patients with GBS and positive Zika results

	n/N* (%) or median (IQR) [†]
Age (years)	45 (36 - 56)
Men	15/20 (75%)
Hospitalization time (days)	26 (15 - 34)
Febrile syndrome 7-14 days prior to admission	14/20 (70%)
Time between febrile syndrome and the onset of neurological symptoms (days)	9 (6 - 14)
Symptoms on admission	
<i>Symmetrical muscle weakness</i>	20/20 (100%)
<i>Weakness limited to the lower limbs</i>	4/20 (20%)
<i>Inability to walk</i>	20/20 (100%)
<i>Areflexia or a decrease in reflexes</i>	20/20 (100%)
<i>Unilateral facial paralysis</i>	2/20 (10%)
<i>Bilateral facial paralysis</i>	10/20 (50%)
<i>Dysphagia</i>	11/20 (55%)
<i>Difficulty breathing</i>	12/20 (60%)
<i>Treatment: immunoglobulins</i>	5/17 (29%)
<i>Treatment: plasmapheresis</i>	7/17 (41%)
<i>Treatment: plasmapheresis and immunoglobulins</i>	5/17 (29%)
<i>Dysautonomia</i>	10/20 (50%)
<i>Seizures other than the Dx ‡</i>	0/20 (0%)
<i>Required vasoactive support</i>	7/20 (35%)
<i>Required tracheostomy</i>	6/20 (30%)

Duration of hospital stay (days)	19 (8 - 21)
Length of stay in the ICU (days)	19 (8 - 21)
Mechanical ventilation requirement Yes (1) No (0)	11/20 (55%)
Duration of mechanical ventilation	20 (7 – 25)

* n/N: the numerator corresponds to the number of patients in whom an alteration was found and the denominator to the number of patients who were evaluated for such alterations. †IQR: Interquartile range. ‡Dx: Diagnostics.

Table 2. Follow-up of patients with GBS

	n/N * (%)
	(IQR) †
Elapsed time between diagnosis and control (days)	193 (187-240)
men	10/15 (67%)
Limb weakness limited to the upper limbs	0/15 (0%)
Limb weakness limited to the lower limbs	2/15 (13%)
Quadriplegia	6/15 (40%)
Difficulty to walk	4/15 (27%)
Inability to walk	2/15 (13%)
Areflexia or a decrease in reflexes	4/15 (27%)
Unilateral facial paralysis	3/15 (20%)
Bilateral facial paralysis	1/15 (7%)
Dysphagia	0/15 (0%)
Difficulty breathing	0/15 (0%)
Loss of sphincter control	0/15 (0%)
Independence in her BDAs ‡	12/15 (80%)

*n/N: the numerator corresponds to the number of patients in whom an alteration was found and the denominator to the number of patients who were evaluated for such alterations. ¹IQR: Interquartile range. [‡]BDAs: Basic daily activities

Bibliografía

1. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, et. al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology* 2016; 89(17): 8880-8896.
2. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. 1998. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 72:73–83.
3. 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(8):1232–1239
4. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M and Sall A. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. *Virology Journal* 2013, 10:311
5. Gourinat A, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, and Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerging Infectious Diseases*. 2015; 21(1): 84-86
6. E Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastère S, Valour F, Baudouin L, et.al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*. 2014;19(9):pii=20720.
7. Oliveira A, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld P, Alves S and Bispo A. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; 47: 6–7.
8. Brasil P, Pereira JP, Gabaglia CR, Damasceno L., Wakimoto J, Nogueira R, Sequeira PC. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro — Preliminary Report. *N Engl J Med* 2016; oa1602412.
9. Hughes RA, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *Lancet*. 2005;366:1653–66.
10. Rees J, Soudain S, Gregson N, Hughes R. *Campylobacter jejuni* infection and guillain-barré syndrome *N Engl J Med* 1995;333:1374-9.
11. Ma Y, Feng J, Qi Y, Dou G. An immunocompetent adult patient with hepatitis and guillain-barré syndrome after cytomegalovirus infection. *Virology Journal* 2011, 8:95.

12. Masajtis -Zagajewska A, Muras K, Mochecka-Thoelke A, Kurnatowska I, Nowicki M. Guillain-Barré syndrome in the course of EBV infection after kidney transplantation – a case report. *Ann Transplant*, 2012; 17(3): 133-137
13. Tomiyasu K, Ishiyama M, Kato K, Komura M, Ohnuma E, Inamasu J and Takahashi T. Bilateral Retrobulbar Optic Neuritis, Guillain-Barré Syndrome and Asymptomatic Central White Matter Lesions Following Adult Measles Infection. *Inter Med* 48: 377-381, 2009
14. Centers for Disease Control and Prevention. Arboviral infections of the central nervous system—United States, 1996– 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1998;47:517–22.
15. Lebrun G, Chadda K, Reboux A, Martinet O, Gaüzère B. Guillain-Barré Syndrome after Chikungunya Infection. *Emerging Infectious Diseases*. 2009; 15(3): 495-496.
16. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, Guillaumot L, Souarès Y. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014.
17. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12707>.
18. Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet* 2016; (16)00562-6
19. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zika virus outbreaks in the Americas. *Weekly epidemiological record*. 6 NOVEMBER 2015, 90th YEAR.
20. Instituto Nacional de Salud, Colombia. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 28 de 2016
21. Fokke C, Van den Berg B, Drenthen, Walgaard J, Van Doorn P and Jacobs B. Diagnosis of Guillain-Barré syndrome and validation of Brighton criteria. *Brain* 2014; 137; 33–43.
22. Roehrig, J. T., Hombach, J., & Barrett, A. D. (2008). Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol*, 21(2), 123-132. doi:10.1089/vim.2008.0007
23. Duijster JW, Goorhuis A, van Genderen PJ, Visser LG, Koopmans MP, Reimerink JH, et al. Zika virus infection in 18 travellers returning from Surinam and the Dominican Republic, The Netherlands, November 2015-March 2016. *Infection*. 2016. Epub 2016/05/23.

24. De Araujo TV, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo AP, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2016
25. Craig AT, Butler MT, Pastore R, Paterson BJ, Durrheim DN. Update on Zika virus transmission in the Pacific islands, 2007 to February 2016 and failure of acute flaccid paralysis surveillance to signal Zika emergence in this setting. *Bull World Health Organ.* 2016. Anaya JM¹, Rodríguez Y², Monsalve DM², Vega D³, Ojeda E
26. Anaya JM, Rodríguez Y, Monsalve DM, Vega D, Ojeda E, et. Al. A comprehensive analysis and immunobiology of autoimmune neurological syndromes during the Zika virus outbreak in Cúcuta, Colombia.
27. Liermann K, Schäfler A, Henke A, Sauerbrei A. Evaluation of commercial herpes simplex virus IgG and IgM enzyme immunoassays. *Journal of Virological Methods* 199 (2014) 29–34
28. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat Immunol.* 2016; 17(9):1102±8.
29. Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65.
30. Manrique – Abril FG, Tigne DB, Bello S, Ospina JM. Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja, Colombia. *Revista de Salud Pública.* 2006; 8: 88-97.
31. Carmona F. Presencia de *Campylobacter jejuni* en aves de corral y sus manipuladores. *Biomedica.* 1985; 5: 78-85.
32. Taylor BV, Williamson J, Luck J et al. Sensitivity and specificity of serology in determining recent acute *Campylobacter* infection. *Intern Med J* 2004; 34 (5): 250-8.
33. Ang CW, Krogfelt K, Herbrink P, Keijser J, van Pelt W, et. al. Validation of an ELISA for the diagnosis of recent *Campylobacter* infections in Guillain-Barré and reactive arthritis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Sep;13(9):915-22
34. Sebastián UU, Ricardo AVA, Alvarez BC, Cubides A, Luna A,F et. al. Zika virus-induced neurological critical illness in Latin America: Severe Guillain-Barre Syndrome and encephalitis. *J Crit Care.* 2017 Aug 9;42:275-281

35. World Health Organization. Situation report. Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré síndrome-1 February 2017. <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/2-february-2017/en/>
36. The Guillain-Barré Syndrome Study Group. Plasmapheresis and acute Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 1985; 35: 1096–104
37. Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Group. Randomised trial of plasma exchange, intravenous immunoglobulin, and combined treatments in Guillain-Barré syndrome. *Lancet*. 1997;349(9047):225-230
38. Fletcher DD, Lawn ND, Wolter TD, and Wijdicks EF. Long-term outcome in patients with Guillain–Barre syndrome requiring mechanical ventilation. *Neurology*. 2000 Jun 27;54(12):2311-5.
39. Organización Panamericana de la Salud. Recomendaciones prácticas para la implementación de las guías de detección y atención del síndrome de Guillain-Barré relacionado con Zika en la Región de las Américas. Consenso de expertos, Octubre 2016. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=40289&lang=en
40. Ministerio de Salud y Protección Social. Lineamientos para la detección y atención clínica integral del síndrome de Guillain-Barré y síndromes neurológicos asociados con zika en Colombia. Marzo de 2016. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/lineamientos-para-deteccion-atencion-clinica-integral-sindrome-guillain.pdf>
41. Dhar R, Stitt L, Hahn A. The morbidity and outcome of patients with Guillain–Barré syndrome admitted to the intensive care unit. *Journal of the Neurological Sciences* 264 (2008) 121–128.
42. Witsch J, Galldiks N, Bender A, Kollmar R, Bösel J, Hobohm C, Günther A, Schirotzek I, Fuchs K, Jüttler E. Long-term outcome in patients with Guillain-Barré syndrome requiring mechanical ventilation. *J Neurol*. 2013 May;260(5):1367-74