



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE CRIANÇAS NORMOCEFÁLICAS  
EXPOSTAS AO VÍRUS ZIKA NO PERÍODO GESTACIONAL**

**JULIANA MENEZES GOMES CABRAL DE OLIVEIRA**

**Salvador – Bahia**  
**2020**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE CRIANÇAS NORMOCEFÁLICAS  
EXPOSTAS AO VÍRUS ZIKA NO PERÍODO GESTACIONAL**

**JULIANA MENEZES GOMES CABRAL DE OLIVEIRA**

OrientadorA: Dr<sup>a</sup> Isadora Cristina de Siqueira

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Angelina Xavier Acosta

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção de grau de Mestre.

**Salvador – Bahia  
2020**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

O48c Oliveira, Juliana Menezes Gomes Cabral de.  
Características clínicas de crianças normocefálicas expostas ao vírus zika no período gestacional. / Juliana Menezes Gomes Cabral de Oliveira. - 2020.  
99 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isadora Cristina de Siqueira, Laboratório de Patologia Experimental.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Zika. 2. Anomalias congênicas. 3. Síndrome congênita de Zika. 4. Infecção congênita. I. Título.

CDU 616-022.6

" AVALIAÇÃO CLÍNICA DE NEONATOS NORMOCEFÁLICOS EXPOSTOS AO VÍRUS ZIKA NO PERÍODO GESTACIONAL."

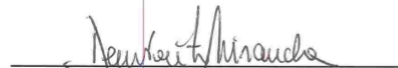
JULIANA MENEZES GOMES CABRAL DE OLIVEIRA

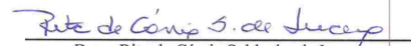
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 06 de março de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dra. Maria da Conceição Chagas de Almeida  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

  
Dr. Demócrito Barros Miranda-Filho  
Professor Adjunto  
UPE

  
Dra. Rita de Cássia Saldanha de Lucena  
Professora Associada  
UFBA

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPS) – Código de Financiamento 001"

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelo dom da vida, me dando sabedoria e perseverança para atingir meus objetivos;

Ao meu marido, Fernando Oliveira, por estar sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e dividindo comigo todos os momentos dessa conquista;

À minha filha, que mesmo antes de nascer já participava desse projeto. Obrigada pelo momentos de alegria e tranquilidade;

Aos meus pais, Nivaldo e Denise, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, contribuindo para que eu alcance meus sonhos;

Aos meus padrastos, Zuleide e Virgílio, por estar sempre me aconselhando e me proporcionando momentos de alegria;

Aos meus irmãos, Rafaela e Bruno, por existirem e me proporcionarem momentos de muita alegria e descontração;

A minha família pela torcida, parceria e momentos de felicidade;

Aos amigos pela fidelidade, compreensão e pelo momentos de descontração;

À Profa. Dra. Isadora Siqueira, orientadora deste trabalho, pelos seus conhecimentos, conselhos e oportunidade de aprendizado;

À Profa. Dra. Angelina, co-orientadora deste trabalho, pelos seus conhecimentos e pela oportunidade de participar desse projeto;

À Adriana Faiçal, minha parceira de mestrado, obrigada pelo apoio e cumplicidade;

À Breno Lima, estudante de iniciação científica, pela disponibilidade e ajuda imprescindíveis para a conclusão desse trabalho;

À equipe multidisciplinar pela disponibilidade e contribuição, vocês foram fundamentais;

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz, em especial à biblioteca pelo apoio;

E aos demais, que de alguma forma contribuíram na elaboração desta monografia.

As pessoas que espalham amor, não tem tempo  
nem disposição para jogar pedras

*Santa Dulce dos Pobres*

OLIVEIRA, Juliana Menezes Gomes Cabral de. Características clínicas de crianças normocefálicas expostas ao vírus zika no período gestacional. 2020. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A epidemia do vírus Zika (ZIKV) no Brasil em 2015, associada posteriormente com a epidemia de microcefalia mobilizou a comunidade científica para a investigação desses achados. Houve um aumento súbito, segundo dados epidemiológicos do Ministério da Saúde, no número de casos de infecção e de microcefalia. A literatura atual aponta uma relação fortemente positiva entre o ZIKV e a epidemia de microcefalia no Brasil. Até o presente momento a maioria dos estudos apontam para o achado clínico que configura um dos aspectos mais graves da infecção por ZIKV intrauterina, a microcefalia. No entanto, diante da possibilidade de que a infecção congênita por ZIKV tenha um espectro clínico mais amplo do que o já descrito, faz-se necessário investigar outras anomalias além da microcefalia. A importância de traçar uma história natural da doença vem no sentido de delinear as pesquisas neste aspecto, além disso promover um auxílio no cuidado e atendimento dessas crianças de maneira que, melhor compreendidos, serão melhor assistidos. **OBJETIVOS:** Descrever manifestações clínicas em crianças ao longo dos 2 primeiros anos de vida que foram expostas ao ZIKV no período gestacional, sem anomalias detectadas ao nascimento. **MATERIAL E MÉTODOS:** No artigo 1 foi realizado um estudo prospectivo a partir de uma amostra de crianças normocefálicas, sem alterações clínicas no nascimento, expostas ao ZIKV no período gestacional e que foram avaliadas clinicamente ao longo dos seus primeiros 2 anos de vida. As crianças foram avaliadas por pediatra e por uma equipe multiprofissional. Foi realizada avaliação do neurodesenvolvimento por neuropediatra; fundoscopia por oftalmopediatra; avaliação auditiva por otorrinolaringologista e fonoaudiólogo e avaliação com odontopediatra. No artigo 2 foi feito um relato de caso de infecção congênita por Zika em gêmeos. **RESULTADOS:** No artigo 1 todas as crianças foram avaliadas por pediatra, a média de idade foi  $1,66 \pm 0,31$  anos. Vinte (71.4%) crianças foram atendidas por neuropediatra e todas apresentaram um desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Vinte e três (82.1%) crianças foram submetidas a fundoscopia e nenhuma alteração foi encontrada. Otorrinolaringologista e dentistas examinaram 19 (67.9%) crianças e nenhum problema foi identificado. Foi realizado também o exame de EOA e PEATE em 16 (57.1%) e nenhuma alteração foi encontrada. No Artigo 2 foi relatado 1 caso de gêmeos dizigóticos discordantes com descrição de achados clínicos, neurorradiológicos e sorológicos. **CONCLUSÃO:** Nossos achados reforçam que a microcefalia não é a situação clínica patognomônica da infecção pelo ZIKV e que podem existir diversas formas clínicas diferentes do que sabemos até o presente momento, sendo relevante a existência de estudos para melhor caracterizá-la e transmitir conhecimentos que são de suma importância para a prática clínica, sendo necessários estudos maiores pra descrever complementemente o real espectro clínico dos achados associados à CZI.

Palavras-chave: Zika; Anomalias Congênicas; Síndrome da Zika Congênita; Normocefalia; Infecção Congênita



OLIVEIRA, Juliana Menezes Gomes Cabral de. Clinical characteristics of normocephalic children exposed to the Zika vírus during pregnancy. 2020. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The outbreak of the Zika virus (ZIKV) in Brazil in 2015, later associated with the microcephaly epidemic, mobilized the scientific community to investigate these findings. There was a sudden increase, according to epidemiological data from the Ministry of Health, in the number of cases of ZIKV infection and microcephaly. The current literature points to a strongly positive relationship between ZIKV and the microcephaly epidemic in Brazil. To date, most studies point to the clinical criterion that is one of the most serious aspects of intrauterine ZIKV infection: microcephaly. However, given the possibility that congenital ZIKV infection has a broader clinical spectrum than described above, it is necessary to investigate other anomalies besides microcephaly. The importance of tracing a natural history of the disease is to delineate research in this aspect, besides promoting an aid in the care of these children so that, better understood, they will be better assisted. **OBJECTIVES:** To describe clinical manifestations in children during the first 2 years of life who were exposed to ZIKV during pregnancy without any abnormalities detected at birth. **MATERIAL AND METHODS:** In article 1, a prospective study was conducted from a sample of normocephalic children, without clinical alterations at birth, exposed to ZIKV during pregnancy and clinically evaluated during their first 2 years of life. The children were evaluated by a pediatrician and a multidisciplinary team. Neurodevelopmental assessment was performed by a neuropsychiatrist; Fundoscopy was performed by a pediatric ophthalmologist; hearing evaluation by otolaryngologist and speech therapist and evaluation with pediatric dentist. In Article 2, a case report of congenital Zika infection in twins was written. **RESULTS:** In article 1, all children were evaluated by a pediatrician, the median age was 1.66 + 0.31 years. Twenty (71.4%) children were attended by a neuropsychiatrist and all had adequate neuropsychomotor development. Twenty-three (82.1%) children underwent fundus and no changes were found. Otorhinolaryngologists and dentists examined 19 (67.9%) children and no problems were identified. The OAE and BAEP tests were also performed in 16 (57.1%) and no changes were found. In Article 2, we report a case of discordant dizygotic twins describing clinical, neuroradiological and serological findings. **Conclusions:** Our findings reinforce that microcephaly is not a pathognomonic clinical situation of ZIKV infection and that there may be several different clinical forms than we know to date, being necessary larger scale studies to fully describe the real clinical spectrum of findings associated with CZI.

Keywords: Zika; Congenital anomalies; Congenital Zika Syndrome; Normocephaly; Congenital Infection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de transmissão do Zika vírus na África. Fonte: Freire, 2014.....	13
Figura 2	Dispersão Mundial do Zika Vírus. Fonte: Chang et al., 2016.....	14
Figura 3	Distribuição especial com casos notificados e confirmados de microcefalia e/ou alteração do SNC, Brasil, até a SE 22/2016. Fonte: Secretarias de Saúde dos Estados e Distrito Federal.....	16
Figura 4	Casos prováveis de febre pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2016 e 2017. Fonte: Sinan NET (banco de 2016 atualizado em 23/06/2017; de 2017, em 18/08/2017).....	16
Figura 5	Distribuição Global do <i>Ae aegypti</i> . Fonte: Kraemer et al., 2015.....	17
Figura 6	Representação morfológica aproximada de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> . FONTE: O autor (2016) baseado em BRASIL (2001) e BENCHIMOL (2006).....	18
Figura 7	Representação esquemática do Zika vírus. FONTE: Laboratoryinfo.com.....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisas
<b>CHIKV</b>	Chikungunya vírus
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>DENV</b>	Dengue vírus
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
<b>EOA</b>	Emissões otoacústicas
<b>FINEP</b>	Financiadora de Estudos e Projetos
<b>FMB</b>	Faculdade de Medicina da Bahia
<b>IMC</b>	Índice de massa corpórea
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana de Saúde
<b>PC</b>	Perímetro Cefálico
<b>PEATE</b>	Potencial Evocado Auditivo do Tronco Cerebral
<b>PRNT</b>	<i>Plaque-reduction Neutralization Test</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RT-PCR</b>	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
<b>SCZ</b>	Síndrome Congênita da Zika
<b>SE</b>	Semana epidemiológica
<b>SGB</b>	síndrome de <i>Guillain-Barré</i>
<b>SINAN</b>	Serviço de informação de Agravos de Notificação
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TORCHS</b>	Grupo de doenças associadas a infecção congênita (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes simples, outras infecções: Coxsackie, Sífilis, Variela, HIV, Parvovirus B19, Hepatite B e Coriomeningite linfocítica)
<b>UFBA</b>	Universidade Federal da Bahia
<b>ZIKV</b>	Zika vírus

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	GERAL .....	15
2.2	ESPECÍFICOS .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
3.1	HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO ZIKA VÍRUS .....	16
3.2	O VETOR, O MODO DE TRANSMISSÃO E O ZIKA VÍRUS .....	20
3.3	DIAGNÓTICO LABORATORIAL .....	22
3.4	A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA, AS ANOMALIAS CONGÊNTICAS, A SÍNDROME DA ZIKA CONGÊNITA E A MICROCEFALIA .....	23
	CAPÍTULO 1 .....	27
	CAPÍTULO 2 .....	47
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	70
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71
	<b>ANEXOS</b> .....	86
1	CURVA INTERGROWTH-21 .....	86
	A MENINOS .....	86
	B MENINAS .....	87
2	CURVAS DE CRESCIMENTO OMS .....	88
	A MENINOS .....	88
	A MENINAS .....	90
3	APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....	92
4	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	93
5	CURVAS DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO .....	96

6 ARTIGO PUBLICADO ..... 97

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus, membro do gênero Flavivírus da família *Flaviviridae*, isolado pela primeira vez no sangue de um macaco Rhesus febril na Floresta Zika em 1947, em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Foi também identificado em mosquitos da mesma região e associados a casos febris em humanos na África (MACNAMARA, 1954)

Posteriormente, foi detectado em mosquitos *Aedes aegypti* na Malásia e em outros países da Ásia, mostrando que não se restringia ao território africano (GARCIA; MARCHETTE; RUDNICK, 1969). Diante disso, percebeu-se que o vírus era transmitido pelo mesmo mosquito transmissor da dengue, febre amarela urbana, Chikungunya, além de outros arbovírus na Ásia e África. Até 2007, não havia relato de doença fora do eixo África/Ásia, quando houve uma epidemia de conjuntivite, exantema, febre, artralgia e mialgia na Micronésia e confirmada a infecção por ZIKV após identificação do RNA viral (DUFFY et al., 2009). A doença é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Aedes*. No entanto, outras formas de transmissão já foram confirmadas.

No início de 2015, principalmente nos estados do nordeste brasileiro, surgiram alguns casos de uma síndrome parecida com dengue, porém sem confirmação sorológica. Desde então houve uma rápida dispersão do vírus para os outros estados brasileiros e em 2016 todos os estados já registravam casos autóctones do vírus (BRASIL, 2015a).

Um surto de defeitos congênitos no final de 2015 alarmou a comunidade médica e científica brasileira. Uma possível relação entre os defeitos congênitos e a infecção pelo ZIKV foi levantada sendo corroborada após a identificação do vírus no líquido amniótico dos pacientes nascidos com microcefalia (CALVET et al., 2016b). O Brasil foi o primeiro país a levantar essa suspeita (DE ARAÚJO et al., 2018).

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em conjunto com a Organização Mundial de Saúde (OMS) caracterizaram preliminarmente a Síndrome Congênita da Zika (SCZ). Estudo sugere que crianças portadoras de microcefalia ao nascimento representam somente as mais gravemente acometidas, e que recém-nascidos com alterações sutis ou que apresentem atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, não tenham ainda sido diagnosticadas (BRASIL et al., 2016; HOEN et al., 2018). No entanto, diante da possibilidade de que a infecção congênita por ZIKV tenha um espectro clínico mais amplo

do que o já descrito, faz-se necessário investigar outras anomalias além da microcefalia. Apesar de esta configurar um dos quadros mais graves, outras manifestações, menos graves e não aparentes ao nascimento, consequentes dessa infecção intrauterina, como anomalias afetando outros tecidos e órgãos além do cérebro, fazem parte de um espectro da clínica da SCZ que necessita ser melhor investigado.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Descrever manifestações clínicas em crianças que foram expostas ao vírus Zika no período gestacional, sem anomalias detectadas ao nascimento, ao longo dos 2 primeiros anos de vida.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Avaliar e descrever o crescimento e desenvolvimento de crianças expostas ao vírus Zika no período gestacional, ao longo dos dois primeiros anos de vida;
- Descrever história pré-natal e condições do nascimento das crianças incluídas no estudo;
- Avaliar a função cognitiva, linguagem e motora;
- Contribuir na descrição do espectro clínico da infecção congênita pelo vírus Zika.

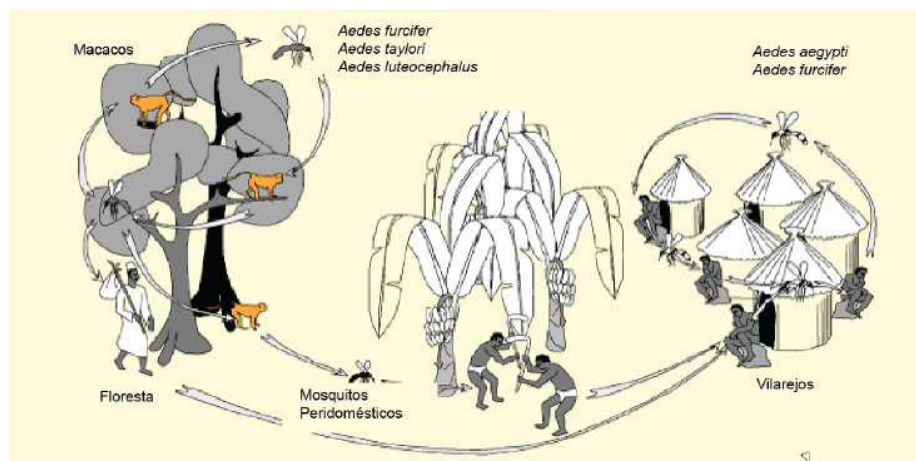


### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO ZIKA VÍRUS

O ZIKV é um arbovírus, transmitido pelo mosquito do gênero *Aedes* ssp, pertence ao gênero flavivírus da família *Flaviridae*, e está relacionado com outros flavivírus de relevância para saúde pública, incluindo dengue, febre amarela e vírus do Nilo Ocidental (MUSSO; MAI CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015; PIERSON TC, 2013). Foi isolado pela primeira vez em um macaco Rhesus em 1947, durante a investigação de casos de febre amarela, na floresta Zika, em Uganda na África (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952), porém nenhuma manifestação era conhecida até 1954. Neste ano, na Nigéria, Macnamara e colaboradores descreveram 3 casos com manifestações de febre, artralgia e um deles com icterícia. Foi possível isolar o vírus nesses pacientes, além da confirmação sorológica através da técnica de *plaque-reduction neutralization test* (PRNT) (MACNAMARA, 1954). Diversos casos esporádicos foram descritos, principalmente na África e Ásia, além da identificação de anticorpos contra o vírus em vários estudos populacionais (MOORE et al., 1975; OLSON et al., 1983). Em 2006, o genoma do vírus foi codificado (KUNO; CHANG, 2007).

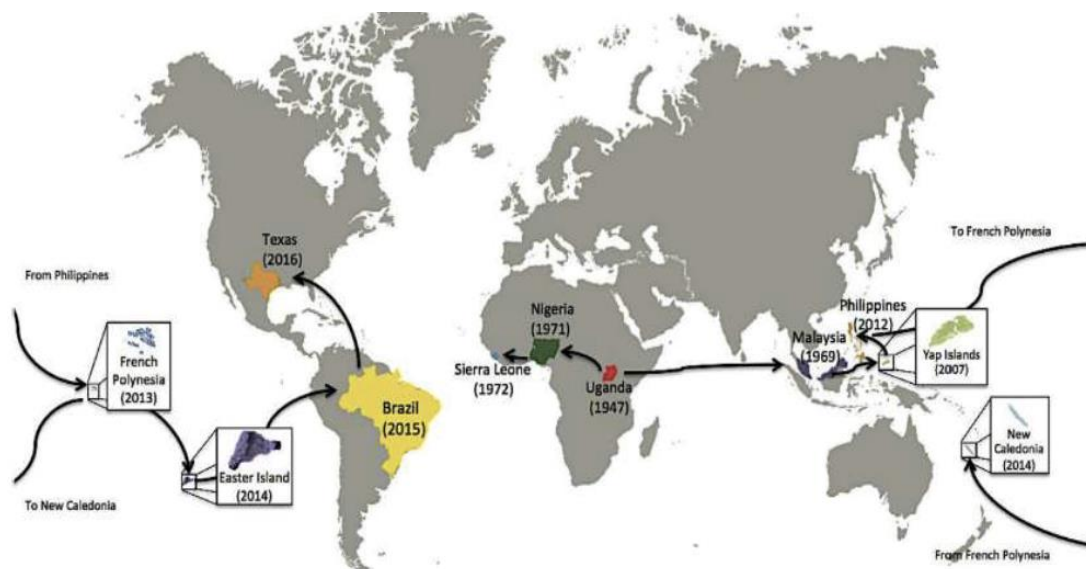
Estudos filogenéticos indicam que o ZIKV provavelmente surgiu na África por volta de 1920, onde mantém seu ciclo natural principalmente entre macacos e espécies silvestres de mosquitos *Aedes*, com ocasionais infecções humanas (Figura 1) (FREIRE, 2014; PETERSEN et al., 2016; PINTO JUNIOR et al., 2015).



**Figura 1** - Ciclo de transmissão do Zika vírus na África. Fonte: Freire, 2014.

Até 2007 nenhum caso da doença havia sido relatado fora do eixo África/Ásia, porém neste ano ocorreu uma epidemia de exantema cutâneo, conjuntivite, febre, artralgia e artrite nas ilhas Yap, na Micronésia. Inicialmente as manifestações foram associadas a infecção por dengue. No entanto, após análise do soro dos pacientes, foi identificado o ácido ribonucleico (RNA) do ZIKV (DUFFY et al., 2009). Uma epidemia semelhante foi relatada em 2013 na Polinésia Francesa, concomitante com uma epidemia de dengue, porém pela primeira vez foram relatados casos com maior gravidade e necessidade de internamentos hospitalares, sendo relatados 42 casos da Síndrome de *Guillain-Barré* (SGB) associada ao quadro (KUCHARSKI et al., 2016). O ZIKV tem sido considerado emergente desde 2007 (CAO-LORMEAU et al., 2014; IOOS et al., 2014; SLAVOV et al., 2016).

Houve então uma disseminação do vírus entre outras ilhas do pacífico e, em 2014, um novo surto da doença foi identificado na Ilha Páscoa no Chile, sendo identificado cepas semelhantes às encontradas na Polinésia Francesa, tornando-se este o primeiro registro do vírus nas Américas (TOGNARELLI et al., 2016). A Figura 2 mostra a dispersão do ZIKV pelo mundo.



**Figura 2** - Dispersão Mundial do Zika Vírus. Fonte: Chang et al., 2016.

Em 2014, ocorreu a disseminação do vírus na América do Sul e, em maio de 2015, foram confirmados os primeiros casos de autoctonia no nordeste brasileiro (FANTINATO et al., 2016; VALLE et al., 2016). A partir de então, foram registrados casos de indivíduos

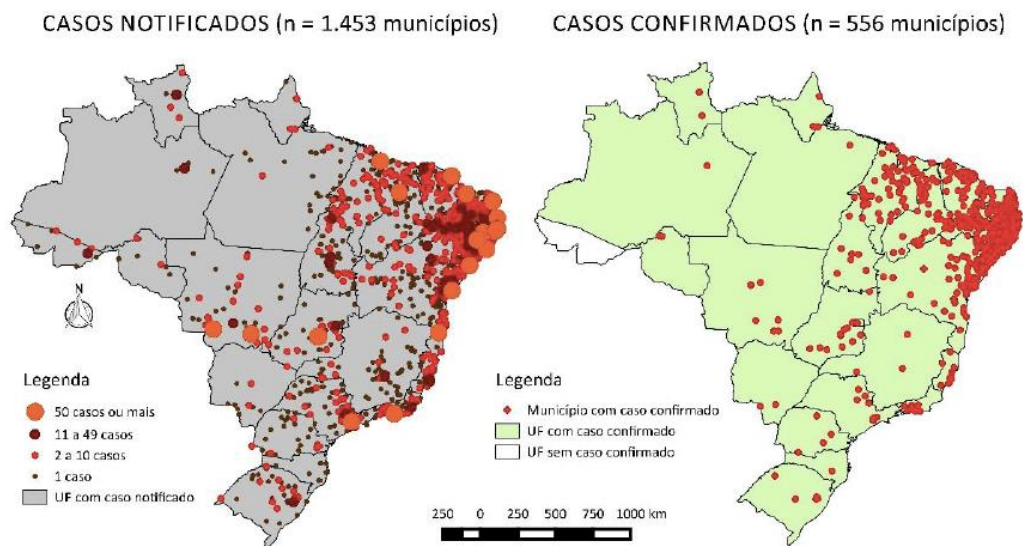
apresentando uma síndrome *dengue-like* no serviço de saúde pública da cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Um médico especialista em doenças infecciosas avaliou os pacientes, porém o quadro clínico e exames laboratoriais eram negativos para infecção por dengue ou chikungunya. Os sintomas incluíam artralgia, edema das extremidades, febre leve, erupções maculopapulares frequentemente pruriginosas, cefaléia, dor retroorbitária, conjuntivite purulenta, vertigem, mialgia e desordem digestiva. Em Março de 2015, Zanluca et. al relataram a positividade do soro de 8 indivíduos, no Rio Grande do Norte (ZANLUCA et al., 2015). Neste mesmo período, houve confirmação de casos de ZIKV em 7 pacientes no estado da Bahia (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Desde a identificação da entrada do vírus no Brasil, houve uma rápida disseminação e em 2016 todos os estados brasileiros registraram casos de autoctonia do vírus (BRASIL, 2015b), sendo então estabelecido o surto como um problema de saúde pública internacional (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Durante a epidemia de ZIKV em Salvador-BA, que se iniciou em maio de 2015, 17.440 casos suspeitos foram notificados representando a maior epidemia desta arbovirose já relatada mundialmente.

Em novembro de 2015 um surto de defeitos congênitos em recém-nascidos alarmou médicos e pesquisadores. Dados epidemiológicos sugeriam uma relação temporal entre o aumento no número de casos de microcefalia e a infecção pelo ZIKV. Esta relação foi corroborada pela detecção do vírus em líquido amniótico de fetos nascidos com microcefalia (CALVET et al., 2016b). Além disso, estudos anteriores já mostravam a entrada do ZIKV no sistema nervoso central (SNC), ultrapassando a barreira hematoencefálica (BELL; FIELD; NARANG, 1971; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

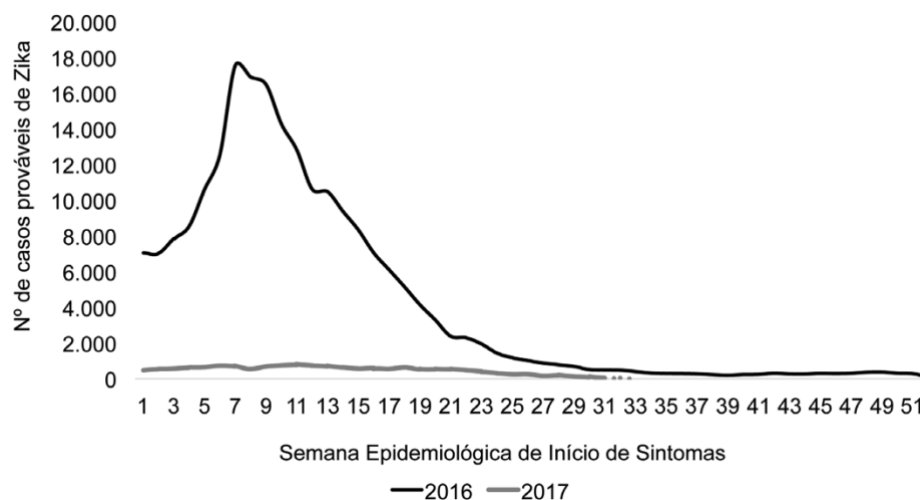
Foi realizado um estudo de caso controle em Recife-PE, em 2016, onde foram avaliados 91 neonatos com microcefalia e 80% das mães apresentaram sorologia positiva para ZIKV, e um estudo de coorte realizado no Rio de Janeiro sugeriram fortemente que esta epidemia de microcefalia seria resultado da infecção congênita por ZIKV (BRASIL et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018). A distribuição espacial de casos notificados e confirmados de microcefalia e/ou alterações do SNC até a semana epidemiológica (SE) 22/2016 está apresentada na figura 3.

Em 2016, foram registrados 205.578 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país (Figura 4), sendo confirmados laboratorialmente 8 óbitos por ZIKV. Em 2017, até a SE 31, foram registrados 15.039 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país, com taxa de

incidência de 7,3 casos/100mil hab.; destes, 6.145 (40,9%) foram confirmados. A análise da taxa de incidência de casos prováveis de Zika (número de casos/100 mil hab.), segundo regiões geográficas, demonstra que as regiões Centro-Oeste e Norte apresentam as maiores taxas de incidência: 35,1 casos/100 mil hab. e 13,7 casos/100 mil hab., respectivamente. Em 2017, até a SE 31, não foi confirmado laboratorialmente nenhum óbito por ZIKV. Em relação às gestantes, foram registrados 2.112 casos prováveis, sendo 674 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial, segundo dados do Sinan-NET.



**Figura 3** - Distribuição espacial com casos notificados e confirmados de microcefalia e/ou alteração do SNC, Brasil, até a SE 22/2016. Fonte: Secretarias de Saúde dos Estados e Distrito Federal.



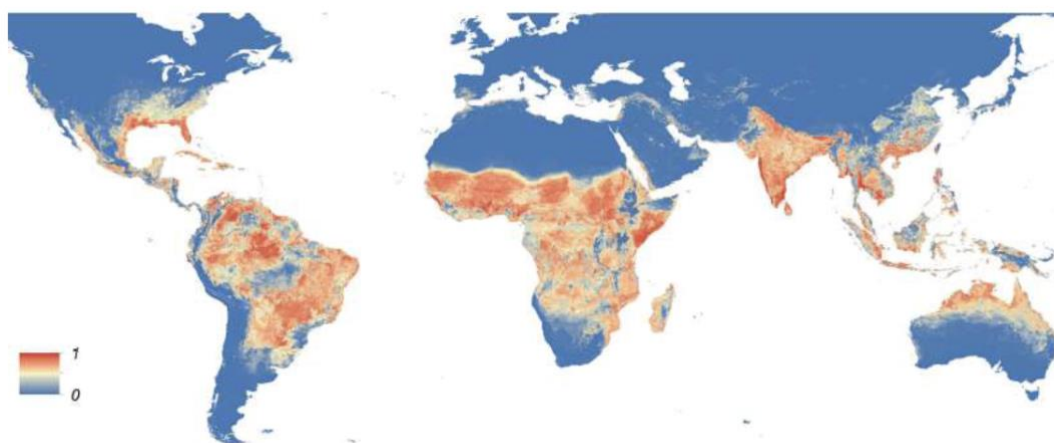
**Figura 4** - Casos prováveis de febre pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de

sintomas, Brasil, 2016 e 2017. Fonte: Sinan NET (banco de 2016 atualizado em 23/06/2017; de 2017, em 18/08/2017).

### 3.2 O VETOR, MODO DE TRANSMISSÃO E O ZIKA VÍRUS

As arboviroses são típicas de regiões cuja vegetação é mais densa e que apresentam maiores índices pluviométricos durante um determinado tempo. No Brasil, áreas de Mata Atlântica e da floresta Amazônica são os maiores reservatórios de arboviroses (SILVA; ANGERAMI, 2008). Embora estes reservatórios sejam em sua maioria de regiões silvestres, o homem, em sua constante expansão em direção a estas áreas, acaba aumentando o risco de infecção. No entanto, algumas arboviroses têm surgido em regiões urbanas sob forma epidêmica (GUBLER et al, 2014; TRAVASSOS et al, 1989).

A transmissão do vírus ocorre através da picada durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito do gênero *Aedes*, uma vez que somente a fêmea é hematófaga. Os mosquitos *Aedes* são distribuídos globalmente e são habitantes nativos de regiões tropicais e subtropicais (Figura 5) (PLOURDE; BLOCH, 2016). O vírus se aloja nas glândulas salivares do mosquito, onde se multiplicam sem afetar o vetor. O tempo necessário para que o mosquito se torne infectante após o repasto em indivíduo infectado é de 10 dias (VALLE et al., 2016). Os primatas são os reservatórios naturais do ZIKV, e, provavelmente outros mamíferos como zebras, elefantes e roedores também o são.



**Figura 5** - Distribuição Global do *Ae aegypti*. Fonte: Kraemer et al., 2015.

Entretanto outras formas de transmissão já foram relatadas: via congênita

(OLIVEIRA MELO et al., 2016), perinatal (BESNARD et al., 2014), sexual (MUSSO et al., 2015), transfusão sanguínea (MUSSO et al., 2014), mordida de macacos (LEUNG et al., 2015), saliva e urina (BONALDO et al., 2016) e suor e lágrimas (SWAMINATHAN et al., 2016).

Diversos tipos de *Aedes* foram relacionados a esse vírus, como: *Aedes aegypti*, *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes hensilli*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes albopictus*. O *Aedes aegypti* é mais frequente na Ásia e Américas, o *Aedes hensilli* foi o principal responsável pelo surto nas ilhas Yap e o *Aedes polynesiensis* provavelmente foi responsável pela disseminação do ZIKV na Polinésia Francesa (CUNHA et al., 2016; PLOURDE; BLOCH, 2016; VALLE et al., 2016). As espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* estão presentes no território brasileiro.

O *Aedes aegypti*, conhecido popularmente como "mosquito da dengue", possui corpo escuro com faixas brancas nas bases dos segmentos e desenho semelhante a uma lira no dorso (BESERRA et al., 2006; GADELHA, 1985). Possui hábitos diurnos, tornando seu controle difícil por ser muito versátil na escolha de criadouros, que são predominantemente domésticos, sendo responsáveis por casos urbanos (CONSOLI et al., 1994).

O *Aedes albopictus*, denominado "tigre asiático" possui coloração negra com uma faixa estreita, longitudinal e mediana, apresenta hábitos antopofílicos e zoofílicos e fora de domicílios humanos, sendo responsáveis pelos casos silvestres (GRATZ, 2004; HAWLEY, 1988). Suas diferenças fenotípicas podem ser visualizadas na figura 6.



**Figura 6** - Representação morfológica aproximada de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (GÓIS, 2017).

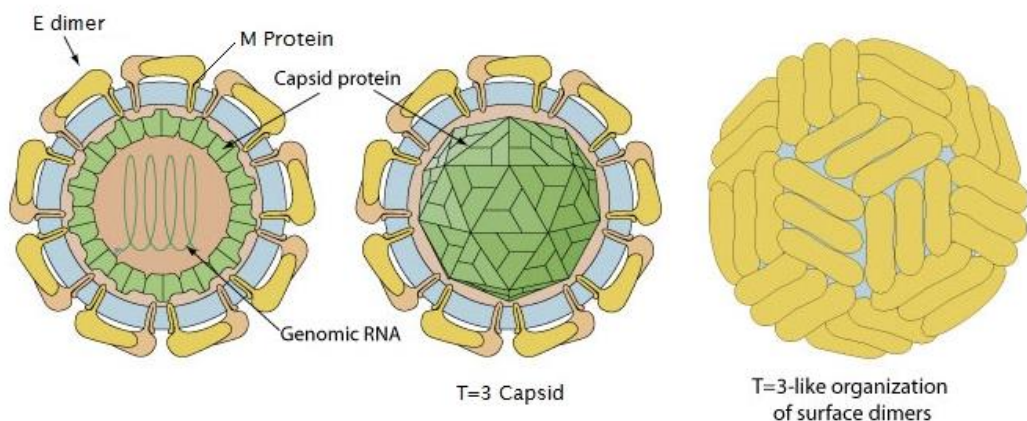
O macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos. Pode ser diferenciado pela presença de uma listra no tórax do *Aedes*

*albopictus* e um formato de lira no *Aedes aegypti*.

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, sendo correlacionado com outras flaviviroses como febre amarela, dengue, febre do oeste do Nilo e encefalite japonesa (HAYES, 2009; PINTO JUNIOR et al., 2015). Além dessas, outras espécies virais incluídas na família *Flaviviridae* estão relacionadas a infecções brandas associadas a quadro febril, podendo raramente ocasionar manifestações clínicas graves como hemorragias e encefalites (BLÁZQUEZ et al., 2014).

A palavra arbovírus é da expressão inglesa “*arthropod-borne virus*”, que inclui centenas de vírus cujo genoma é composto de RNA e que são transmitidos por meio de vetores artrópodes (CHANG et al., 2016; CRUZ, A. C. R; VASCONCELOS, 2008).

Os flavivírus são partículas pequenas, esféricas, envoltas em envelope lipídico (LINDENBACH; RICE, 2003). O ZIKV é um vírus de RNA com 10794 kilobases com duas regiões não codificantes. A poliproteína codificada a partir do RNA viral é clivada por proteases da célula hospedeira e da origem a proteína do capsídeo (C), proteína do envelope (E), ao precursor de membrana (P) e a sete proteínas não estruturais (NS). A superfície dos vírions, ou partículas virais, são compostas pela proteína E e M. A proteína E é o principal determinante antigênico viral e possui como função ligação e fusão de membrana para entrada na células hospedeira. A liberação do RNA na célula hospedeira permite sua tradução e conseqüente formação de novas partículas virais. A estrutura viral é esquematizada na figura 7.



**Figura 7** - Representação esquemática do Zika vírus. FONTE: Laboratoryinfo.com

### 3.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial das infecções pelo ZIKV é feito através de testes de biologia molecular e sorológicos (FAYE et al., 2013; LANCIOTTI et al., 2008). A amplificação do RNA viral através da *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) pode ser realizada em diversos materiais biológicos (MUSSO et al, 2015; GOURINAT et al, 2015; STAPLES et al 2016). É o teste de escolha para diagnóstico na fase aguda e pode ser positivo entre três e sete dias do início dos sintomas, nos casos de transmissão horizontal. No entanto, a interpretação dos testes sorológicos, como *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* (ELISA) IgM e IgG ou PRNT, deve ser feita com cautela devido à grande reatividade cruzada com outras arboviroses, especialmente a dengue (LANCIOTTI et al., 2008). Recomenda-se realizar ambas as sorologias (Dengue e Zika) no primeiro momento e repetir ambas após um período de duas semanas para comparação dos títulos. Caso sejam quatro vezes superiores aos da dengue, serão considerados positivos (DUFFY et al., 2009; STAPLES et al., 2016).

Em casos suspeitos de Infecção Congênita por ZIKV deve-se realizar o RT-PCR no sangue do cordão, líquido e placenta, associado à dosagem de anticorpos em líquido e soro e, quando possível, realizar imunohistoquímica para ZIKV na placenta e cordão umbilical (STAPLES et al., 2016).

#### 3.4 A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA, AS ANOMALIAS CONGÊNITAS, A SÍNDROME DA ZIKA CONGÊNITA E A MICROCEFALIA

Indivíduos infectados pela ZIKV são, em sua maioria, assintomáticos (60-80%). A sintomatologia da infecção é inespecífica e pode ser confundida com quadros ocasionados por outros Flavivírus, como Dengue e Chikungunya (ZANLUCA et al., 2015).

Os sintomas incluem febre baixa e autolimitada, raramente acima de 39°C, surgindo de forma aguda e acompanhada de cefaleia. Além disso, episódios de exantema maculopapular pruriginoso, que aparece comumente no segundo dia e se distribui pela face, tronco, palmas das mãos e planta dos pés, podem estar associados. A febre geralmente desaparece um ou dois dias após o surgimento do exantema (PINTO JUNIOR et al., 2015). Em contraste com a dengue, os sintomas são mais brandos e complicações



hemorrágicas e choque não são relatados (TAPPE et al., 2016). Dor articular e muscular também foram relatadas, acompanhadas ou não de edema, com duração média de 3-5 dias e desaparecem após uma semana, distinguindo-se do quadro clínico típico de Chikungunya pela menor intensidade de manifestação e pelas áreas afetadas. A infecção pelo ZIKV também pode causar conjuntivite, não purulenta, capaz de gerar fotofobia. Outras manifestações inespecíficas também já foram descritas como orbitalgia, anorexia, dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos, vertigem (CAVEIÃO; CRISTIANO, 2017; PINTO JUNIOR et al., 2015).

Apesar de ser uma infecção de evolução benigna, algumas complicações podem ocorrer como SGB, microcefalia e problemas neurológicos e oculares em recém-nascidos. A SGB é uma neuropatia inflamatória auto-imune que causa fraqueza muscular, tetraparesia, parestesia das extremidades, mialgia difusa e paralisia facial assimétrica, podendo levar a insuficiência respiratória (OEHLER et al., 2014; PETERSEN et al., 2016; PINTO JUNIOR et al., 2015; TELLERÍA-DÍAZ; CALZADA-SIERRA, 2002).

Anomalias congênitas são alterações que ocorrem durante o desenvolvimento intrauterino, presentes no momento do nascimento ou que se manifesta em etapas mais avançadas da vida. Qualquer alteração durante o desenvolvimento embrionário pode resultar em alterações que variam de pequenas assimetrias até grandes manifestações com comprometimento estético e funcional (SANTOS; DIAS, 2005). São classificadas como estruturais, funcionais, hereditárias e comportamentais, podendo ser identificadas ainda no período neonatal através de exames de imagem. Estão relacionadas a eventos que precedem o nascimento, podendo ser herdadas ou adquiridas. Dentre os fatores etiológicos são destacados: condições genéticas/hereditárias; exposição à substâncias; infecções e radiações (ARRUDA; AMORIM; SOUZA, 2008).

Anomalias congênitas repercutem de maneira importante na morbimortalidade infantil. Segundo a OMS cerca de 276 milhões de bebês com malformações que morrem, mundialmente, dentro de 4 semanas após o nascimento por tais defeitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Dentre as infecções intrauterinas associadas ao desenvolvimento de anomalias no SNC destacam-se o citomegalovírus, o herpes vírus e a rubéola. No entanto, entre os flavivírus, apenas alguns casos foram relatados do vírus do oeste do Nilo causando encefalite (SIROIS et al., 2014).

É na fase de gastrulação que se inicia o desenvolvimento do SNC quando ocorre espessamento da membrana ectodérmica, que dará origem à placa neural. Assim dois

grandes processos vão ocorrer: a formação do tubo neural e o desenvolvimento do prosencéfalo (JJ, 2001). Alterações no desenvolvimento do córtex cerebral possuem ainda uma patogênese não definida. Um subconjunto de patologias tem sido associado a alterações na migração celular e na neurodiferenciação, como as lisencefalias, polimicrogírias e displasias corticais. No entanto, outros fatores podem também estar envolvidos, como a proliferação celular, morte celular, crescimento e desenvolvimento intracortical e formação de axônios e dendritos (GOLDEN, 2001; RORKE, 1994). Alguns fatores ambientais já foram associados às malformações corticais, dentre eles podemos destacar o etanol, ácidos, drogas anticonvulsivantes, mercúrio, radiação e infecções virais (GOLDEN, 2001).

Desde a introdução do ZIKV no Brasil, ocorreu um aumento crescente no número de casos de microcefalia sugerindo a hipótese de transmissão congênita. Essa associação foi afirmada em diversos estudos, inclusive através da detecção do vírus no líquido amniótico de duas mulheres que desenvolveram a infecção na gravidez (DE ARAÚJO et al., 2018). Os exames demonstraram que ambos os fetos apresentavam microcefalia, comprovando a capacidade do vírus de ultrapassar a barreira placentária, atingir o líquido amniótico e infectar o feto (CALVET et al., 2016b).

MLakar et al. relatou o caso de uma gestante com história de infecção pelo ZIKV durante sua estadia no Brasil (MLAKAR et al., 2016). A ultrassonografia realizada com 29 semanas de gestação revelou que o feto apresentava microcefalia e calcificações cerebrais. O feto foi abortado cirurgicamente, procedimento legal em seu país de origem, sendo detectada a presença do ZIKV apenas no tecido cerebral fetal, comprovando o forte tropismo viral pelas células cerebrais.

Fêmeas de camundongos grávidas foram infectadas com a cepa brasileira de ZIKV. Observa-se que os filhotes das grávidas que apresentaram a infecção possuíam um claro indício de atraso no desenvolvimento intrauterino, e a presença de RNA viral em vários tecidos desses recém-nascidos através do PCR, com prevalência significativa no cérebro, confirmando o neurotropismo viral e agressividade desta cepa. Além disso, os resultados indicam que a cepa brasileira é capaz de atingir as células progenitoras corticais, induzindo a morte celular por apoptose e autofagia (CUGOLA et al., 2016), ocasionando problemas transcripcionais e um retardo no crescimento celular (TANG et al., 2016).

O diagnóstico clínico de microcefalia se dá pela medida do perímetro cefálico (PC). É realizada a medida do diâmetro do crânio em sua maior circunferência, utilizando

uma fita métrica flexível e não elástica, em torno da cabeça, posicionando a fita na testa acima dos olhos, passando acima das orelhas e até a porção mais proeminente da parte posterior do crânio. Dessa forma, a medida do PC abaixo de dois desvios-padrão da média para a idade gestacional tem sido utilizada para realizar o diagnóstico clínico de microcefalia. Considera-se microcefalia grave quando a medida do PC esta abaixo de 3 desvios-padrão (VARGAS et al., 2001). A escolha da curva e os critérios diagnósticos definidores de microcefalia têm sido aspecto de grande discussão, principalmente entre os prematuros (ASHWAL et al., 2009; VICTORA et al., 2016). A Organização Pan-Americana aponta duas curvas para utilização: Curva de Fenton e Estudo InterGrowth (OPAS, 2016; VILLAR et al., 2014a). No entanto, devido à maior especificidade, Victoria et al sugere a curva *Intergrowth* como escolha (VICTORA et al., 2016). Além disso, o treinamento da equipe que executa essa medida é imprescindível e a repetição da técnica é necessária quando apresentar valores limítrofes ou anormais. A proporção entre o PC e outras medidas como peso e comprimento é importante para a definição da etiologia da microcefalia (VARGAS et al., 2001).

**ARTIGO 1 – Clinical evaluation of normocephalic neonates exposed to Zika virus during gestation**

Situação do artigo: a ser submetido

Revista: Jornal de Pediatria

Fator de impacto: 2,0

Artigo descreve as manifestações clínicas e evolução de crianças normocefálicas expostos ao vírus Zika no período gestacional.

## **Clinical evaluation of normocephalic neonates exposed to Zika virus during gestation**

Juliana Menezes Gomes Cabral de Oliveira<sup>1,7,8</sup>, MD

Adriana Virgínia Barros Faiçal<sup>3,4</sup>

Breno Lima de Almeida<sup>1,2</sup>

João Vitor Vieira Carvalho de Oliveira<sup>1</sup>

Emília Katiane Embiruçu de Araújo Leão<sup>5</sup>, MD

Iluska Andrade Agra<sup>4</sup>, MD

Lucas Oliveira Cardoso Reis<sup>5</sup>

Cristina Salles<sup>4,7</sup>, MD

Erica Santana D'Agostino<sup>6</sup>

Maria Beatriz Barreto de Sousa Cabral<sup>6</sup>

Maria Isabel Pereira Vianna<sup>6</sup>

Nelfa Souza Ferreira<sup>9</sup>

Bernardo Gratival Gouvea Costa<sup>1</sup>

Cleiton Silva Santos<sup>1</sup>

Luiz Carlos Alcântara Junior<sup>10</sup>, PhD

Angelina Xavier Acoxta<sup>2</sup>, MD, PhD

Isadora Cristina de Siqueira<sup>1</sup>, MD, PhD

**Author affiliations:**

1-Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador-BA, Brazil

2-Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil

3-Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil

4-Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil

5-Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador-BA, Brazil

6-Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil

7-Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador-BA, Brazil

8-Universidade Salvador, Salvador-BA, Brazil

9-Clínica CEVEM, Salvador – BA, Brazil

10-Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Corresponding author:**

Isadora Cristina Siqueira, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-BA, Brazil, CEP 40296-710

e-mail: Isadora.siqueira@fiocruz.br

Telephone: +55(71) 3176-2466

Keywords: Zika virus; congenital Zika infection; newborns

Running head title: Evaluation of normocephalic neonates with Zika virus infection

Disclosure: The authors report no disclosures relevant to the manuscript.

### **Funding:**

CNPq-National Council for Scientific and Technological Development (443875/2018-9) and PPSUS/BA-FAPESB003/2017/SESAB/CNPq/MS (5125/2017).

### **Conflict of Interest Statement**

No conflicts of interest to declare.

### **Abstract**

A main characteristic of Congenital Zika Infection (CZI) is the involvement of the nervous system. While microcephaly is the most severe presentation, infants with laboratory evidence of CZI, who are normocephalic at birth, may present neurodevelopmental delays or late onset microcephaly. The present study aimed to follow normocephalic infants with intrauterine exposure to Zika virus (ZIKV) to better characterize the broad spectrum of manifestations associated with CZI. We evaluated 28 normocephalic infants within their first two years of life (median age:  $1.66 \pm 0.31$  years). All infants were evaluated by a pediatrician and 20 children (71.4%) were evaluated by a neuropsychiatric specialist. All children presented satisfactory neuropsychomotor development with normal neurological evaluations.

Ophthalmological and audiological evaluations were performed in 23 (82.1%) and 16 (57.1%) infants, respectively, with no abnormalities detected. The infants evaluated herein indeed seem to be asymptomatic. However, large-scale studies involving prospective cohorts and long-term follow-up would be necessary to comprehensively describe the clinical spectrum associated with CZI.

## **Introduction**

Zika Virus (ZIKV), an arbovirus of the Flavivirus genus, Flaviviridae family, is transmitted by *Aedes* mosquitoes and was initially identified in 1947 in Uganda<sup>1</sup>.

In 2015, a dramatic increase in reports of acute ZIKV infection occurred in the Americas, most notably in Brazil, the most affected country<sup>2</sup>, mainly in its northeastern region<sup>3</sup>. An outbreak associated with congenital microcephaly and ZIKV infection was initially suggested by Brazilian physicians and researchers<sup>4</sup>, and the World Health Organization (WHO) subsequently declared a Public Health Emergency of International Concern in February 2016<sup>5</sup>.

A main characteristic of Congenital Zika Infection (CZI) is the involvement of the central nervous system, causing microcephaly, facial disproportionality, hypertonia, hyperreflexia and irritability. In addition, hearing and visual abnormalities, arthrogryposis, epilepsy and dysphagia may also be present<sup>6-8</sup>.

While microcephaly may be the most severe clinical presentation of CZI, some studies have demonstrated developmental delay in infants with laboratory evidence of CZI who were normocephalic at birth<sup>9,10</sup>. In Brazil, a cohort study conducted in Rio de Janeiro reported



delayed neurodevelopment in normocephalic infants with normal neuroimaging despite the confirmation of ZIKV intrauterine exposure<sup>11</sup>.

In this context, this present study aimed to follow normocephalic infants with intrauterine exposure to ZIKV born in Salvador, Bahia-Brazil in 2016, the year after the Zika outbreak, to better understand the broad spectrum of manifestations associated with CZI.

## **Methods**

### **Study design**

The present cohort study was performed at the Pediatric Outpatient Clinic of the School of Medicine, Federal University of Bahia (FMB-UFBA), from March 2017 to November 2018. Infants born in 2016 without congenital anomalies, who were normocephalic at birth and already enrolled in a previous CZI hospital surveillance study, were recruited if ZIKV positivity was detected by serological testing or quantitative PCR assay (RT-qPCR). All mothers of the included infants presented anti-ZIKV IgG positivity at the time of delivery, and reported symptoms suggestive of acute ZIKV infection during pregnancy<sup>12</sup>.

### **Study proceedings**

Sociodemographic data and clinical information were collected from the mothers via interviews, while clinical data on infants was obtained through clinical evaluations. Data entry and data management were performed using REDCap version 6.18.1 (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA).

Head circumference (HC) was evaluated normocephaly was defined by a HC within 2SD (standard deviation) below the mean for gestational age and sex, according to the

INTERGROWTH-21 standards <sup>13</sup>.

Newborns were classified as small, appropriate or large for gestational age, based on sex-specific birthweight for gestational age using fetal growth curves. According to the WHO, infants whose birth weight is below the 10<sup>th</sup> percentile for gestational age and sex are considered small for gestational age (SGA), while those with a weight between the 10-90<sup>th</sup> percentiles are determined to be appropriate for gestational age (AGA); accordingly, those above the 90<sup>th</sup> percentile are deemed large for gestational age (LGA)<sup>14</sup>.

Clinical evaluations were performed in all infants by a pediatrician who collected anthropometric data to verify growth assessment and nutritional status according to WHO growth standards. Infants were classified as eutrophic when Z-scores ranged between -2 and +1 according to the Body Mass Index (BMI) growth standard; at risk of overweight when Z-scores were between +1 and +2; overweight when Z-scores were between +2 and +3 and obese when Z-scores were above +3<sup>15</sup>.

Neurodevelopmental assessments were performed by neuropsychiatric evaluations and through the verification of neurodevelopmental milestones expected for age<sup>16</sup>.

In addition to being seen by a pediatrician and neurologist, the included newborns were also evaluated by other multidisciplinary team members: an odontologist, ophthalmologist, speech and language therapist and otorhinolaryngologist on the same day in a joint effort.

Ophthalmological analyses included retinal mapping and refraction evaluation using a retinoscope (Eyeteq®). Audiological assessments included brainstem evoked response audiometry (BERA) and auditory evoked potential (AEP) (Contronic/model MASBE ATC

Plus®).

### **Ethical Approval**

This study was approved by the institutional review board of the Gonçalo Moniz Institute–Fundação Oswaldo Cruz–Bahia (IGM-FIOCRUZ, protocol no. 1.935.854/2016). All legal guardians provided a written term of consent.

### **Results**

A total of 85 children were deemed eligible to participate in the study; however, it was only possible to establish contact with 42 guardian(s). Of these, 12 declined to participate. Among the infants enrolled, two were excluded due to hydrocephalus and genetic disorders. A total of 28 normocephalic infants were evaluated by all members of the multidisciplinary team at some point within the two first years of life.

#### **Maternal characteristics**

All mothers reported being symptomatic during ZIKV infection. The onset of symptoms varied with respect to gestational period. All women received prenatal care during their pregnancies. The median age was  $26.5 \pm 6.49$  years and six (21.5%) presented a comorbidity. Table 1 summarizes maternal sociodemographic and clinical data, and Figure 1 illustrates the frequencies of ZIKV-related symptoms reported.

#### **Neonatal characteristics**

The frequency of cesarean section and normal delivery were similar, and the male sex predominated (53.6%). A total of 24/28 (85.7%) neonates were classified as AGA, while

seven presented low birth weight (weight at birth < 2,500g). In their first days of life, 24 neonates underwent transfontanelle ultrasonography at the maternity hospital, with no abnormalities identified. Table 3 lists the clinical data of the studied neonates.

### **Infant characteristics**

The median age of the included infants was  $1.66 \pm 0.31$  years. Anamneses conducted during pediatric evaluations identified only one (3.6%) child who was not breastfed, while 21 (75%) were determined to have an inadequate diet high in carbohydrates and low in proteins and vegetables. Nutritional assessments were performed using anthropometric data, with one (3.6%) child determined to be overweight and 27 (96.4%) classified as eutrophic. A total of 16 (57.1%) children had a complete vaccination schedule, and 15 (53.6%) were determined to be atopic. Oral hygiene was considered to be inadequate in 25 (89.3%) children, and habitual tooth-brushing before bedtime was reported in only five (17.9%) infants.

Neuropediatric evaluations were performed in 20 (71.4%) children. Investigation of the age at which infants had reached neurodevelopment milestones revealed delayed neuropsychomotor development in the first year of life in five (17.9%) children. Of these, all five infants presented cognitive impairment, 3/5 (60%) infants presented delays in language development and 2/5 (40%) had motor impairment. Interestingly, upon neuropediatric evaluation, all infants were determined to present adequate neuropsychomotor development, with neurological examinations determined to be normal.

Among the multidisciplinary evaluations performed, retinal mapping and refraction evaluation were performed by an ophthalmologist in 23 (82.1%) infants, with no alterations detected. An otorhinolaryngologist and dentist examined 19 (67.9%) children and reported

no irregularities. Finally, AEP and BERA evaluations were performed in 16 (57.1%) infants, with no observable abnormalities.

## **Discussion**

Congenital microcephaly has been associated with ZIKV intrauterine infection<sup>17</sup>. In addition, the literature contains reports of normocephalic newborns with CZI at birth<sup>18</sup>, and in some cases the development of microcephaly has been observed through reduced brain volume on neuroimaging<sup>9</sup>. Herein, we present 28 normocephalic infants at birth with laboratorial evidence of CZI, who were found to evolve with normal neurodevelopment.

Previous studies have shown changes in intrauterine growth in CZI, including elevated frequencies of low birth weight<sup>23</sup> and intrauterine growth restriction<sup>24</sup>, which are of concern to with respect to expected child growth, since children with low birth weight and or those born SGA generally present lower than expected rates of growth<sup>26</sup>. A cohort study conducted in Rio de Janeiro (Brazil) found high frequencies of SGA (83%) and low birth weight (77%)<sup>25</sup>. In contrast, only one (3.6%) infant herein was classified as SGA, while seven (25%) presented low birth weight. Upon subsequent evaluation, only one infant was found to present growth impairment, which was probably related to an elevated intake of carbohydrates, which led to being overweight.

Children with some degree of neurological impairment are known to present a higher risk of growth deficiency, which has been directly associated in previous studies; i.e., more pronounced deficiency has been linked with greater impairment<sup>19-22</sup>. The disagreement observed herein between the information reported by mothers regarding developmental milestones and neuropsychiatric evaluations could be associated with inaccuracy in the

information reported by the mothers, or even their lower educational/socioeconomic level. Another explanation may be due to the need for continued and more detailed assessments with regard to neurodevelopment.

Ocular abnormalities related to CZS have been described, typically affecting the posterior segment of the eye, including vasculature and retinal pigmentary changes, optic nerve hypoplasia and chorioretinal atrophy<sup>27,28</sup>. Although a previous study reported ophthalmologic abnormalities in 3.7% of the infants exposed to ZIKV during gestation who were normocephalic at birth<sup>29</sup>, none of the 23 infants evaluated herein presented alterations on ophthalmological retinal mapping and refraction evaluations. This finding is consistent with data in the literature demonstrating an association between normal head circumference and the absence of ocular alterations<sup>30</sup>.

While audiological evaluations in the included children were normal on both of the exams performed, previous studies have reported alterations in infants with ZIKV infection who presented microcephaly at birth<sup>7</sup>. However, a report on 13 infants diagnosed with CZI without microcephaly at birth<sup>9</sup> described normal hearing evaluations during follow-up, which stands in agreement with our findings. Nevertheless, longer-term follow-up of these infants would be recommended.

The infants evaluated herein would seem to be asymptomatic; however, since our sample is small and may not have been able to accurately detect abnormalities, which may appear at a relatively low frequency, larger scale studies involving prospective cohorts and long-term follow-up would be necessary to comprehensively describe the clinical spectrum of findings associated with CZI.

## **Acknowledgements:**

The authors would like to thank all of the families involved in this study, and also Marcos Vinícius Lima de Oliveira Francisco for his technical assistance. We are also grateful to Andris K. Walter for critical manuscript review, English language revision and copyediting services.

## **References**

1. Dick, G. W. ., Kitchen, S. . & Haddow, A. . Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
2. Hennessey, M., Fischer, M. & Staples, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 55–58 (2016).
3. Paixão, E. S., Barreto, F., da Glória Teixeira, M., da Conceição N. Costa, M. & Rodrigues, L. C. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. *Am. J. Public Health* **106**, 606–612 (2016).
4. Calvet, G. *et al.* 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).
5. WHO | Zika situation report. *WHO* (2016).
6. Pessoa, A. *et al.* Motor Abnormalities and Epilepsy in Infants and Children With Evidence of Congenital Zika Virus Infection. *Pediatrics* **141**, S167–S179 (2018).
7. Satterfield-Nash, A. *et al.* Health and Development at Age 19–24 Months of 19

Children Who Were Born with Microcephaly and Laboratory Evidence of Congenital Zika Virus Infection During the 2015 Zika Virus Outbreak — Brazil, 2017. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **66**, 1347–1351 (2017).

8. Costello, A. *et al.* Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. *Bull. World Health Organ.* **94**, 406-406A (2016).
9. van der Linden, V. *et al.* Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth — Brazil. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 1343–1348 (2016).
10. Cardoso, T. F. *et al.* Congenital Zika infection: neurology can occur without microcephaly. *Arch. Dis. Child.* **104**, 199–200 (2019).
11. Lopes Moreira, M. E. *et al.* Neurodevelopment in Infants Exposed to Zika Virus In Utero. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2377–2379 (2018).
12. Oliveira, J. V *et al.* Neonatal surveillance for congenital Zika infection during the 2016 microcephaly outbreak in Salvador, Brazil: Zika virus detection in asymptomatic newborns. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **148**, 9–14 (2020).
13. Villar, J. *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: The Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* **384**, 857–868 (2014).
14. Villar, J. *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* **384**, 857–868 (2014).



15. BRASIL. ORIENTAÇÕES PARA A COLETA E ANÁLISE DE DADOS ANTROPOMÉTRICOS E SERVIÇOS DE SAÚDE. in *Norma Técnica do Sistema de Vigilância Nutricional e Alimentar - SISVAN* (2011).
16. BRASIL. Saúde da criança: acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil / Ministério da Saúde. in (*Série Cadernos de Atenção Básica; n. 11*) - (*Série A. Normas e Manuais Técnicos*) (2002).
17. Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. & Petersen, L. R. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1981–1987 (2016).
18. França, G. V. A. *et al.* Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* **388**, 891–897 (2016).
19. Penagini, F. *et al.* Dietary Intakes and Nutritional Issues in Neurologically Impaired Children. *Nutrients* **7**, 9400–9415 (2015).
20. Herrera-Anaya, E., Angarita-Fonseca, A., Herrera-Galindo, V. M., Martínez-Marín, R. D. P. & Rodríguez-Bayona, C. N. Association between gross motor function and nutritional status in children with cerebral palsy: a cross-sectional study from Colombia. *Dev. Med. Child Neurol.* **58**, 936–941 (2016).
21. Quitadamo, P., Thapar, N., Staiano, A. & Borrelli, O. Gastrointestinal and nutritional problems in neurologically impaired children. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **20**, 810–815 (2016).
22. Prata-Barbosa, A., Melo Martins, M., Bittencourt Guastavino, A., José, A. & Alves

- Da Cunha, L. Effects of Zika infection on growth. *J. Pediatr. (Rio. J)*. **95**, 30–41 (2019).
23. Moura da Silva, A. A. *et al.* Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1953–1956 (2016).
24. Santa Rita, T. H., Barra, R. B., Peixoto, G. P., Mesquita, P. G. & Barra, G. B. Association between suspected Zika virus disease during pregnancy and giving birth to a newborn with congenital microcephaly: a matched case–control study. *BMC Res. Notes* **10**, 457 (2017).
25. de Araújo T.V.B., Ximenes R.A. de A., Miranda-Filho D. de B., Souza W.V., Montarroyos U.R., de Melo A.P.L., *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis.* **18**, 328-336 (2018).
26. Leandro, C. G. Nutritional status and gross motor function in children with cerebral palsy, and implications for Zika virus infection. *Dev. Med. Child Neurol.* **58**, 893–894 (2016).
27. Ventura, C. V, Maia, M., Bravo-Filho, V., Góis, A. L. & Belfort, R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet (London, England)* **387**, 228 (2016).
28. Ventura, C. V. *et al.* Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq. Bras. Oftalmol.* **79**, 1–3 (2016).
29. Nogueira, M. L. *et al.* Adverse birth outcomes associated with Zika virus exposure

during pregnancy in São José do Rio Preto, Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 646–652 (2018).

30. Trigueiro, S. A., Freitas Neves, B., Salles Barros De Aguiar, M., Sousa, J. & De Araújo, S. Correlation between cephalic circumference at birth and ocular alterations in patients with microcephaly potentially associated with Zika Virus infection. *Rev Assoc Med Bras* **65**, 909–913 (2019).

Table 1- Sociodemographic data and clinical information of 28 mothers with anti-ZIKV IgG positivity (Salvador, 2016-2018)

Characteristic	N (%)
Age (years) •	26.5 ± 6.49 years
Skin color (self-declared)	
Black	15 (53.6)
Mixed-race	8 (28.6)
White	0 (0)
Other	1 (3.6)
Unknown	4 (14.3)
Education level	
Primary	8 (28.6)
Secondary	17 (60.7)
University/College	2 (7.1)
Unknown	1 (3.6)
Income*	
< 1 minimum monthly wage	10 (35.7)
1-3 minimum monthly wages	13 (46.4)
> 3 minimum monthly wages	3 (10.7)
Unknown	2 (7.1)
Comorbidities	
None	22 (78.6)
Hypertension	3 (10.7)
Diabetes Mellitus	1 (3.6)

Epilepsy	1 (3.6)
Allergic rhinitis	1 (3.6)
Trimester in which symptoms reported	
First trimester	14 (50)
Second trimester	5 (17.9)
Third trimester	4 (14.3)
Unknown	5 (17.9)
Use of licit or illicit drugs during pregnancy	
None	25 (89.3)
Smoking	0 (0)
Alcohol	3(10.7)
Illicit drug use	1 (3.6)

---

• Median (Interquartile); \*Monthly minimum wage in 2018 = R\$ 954,00 (US\$ ~240)

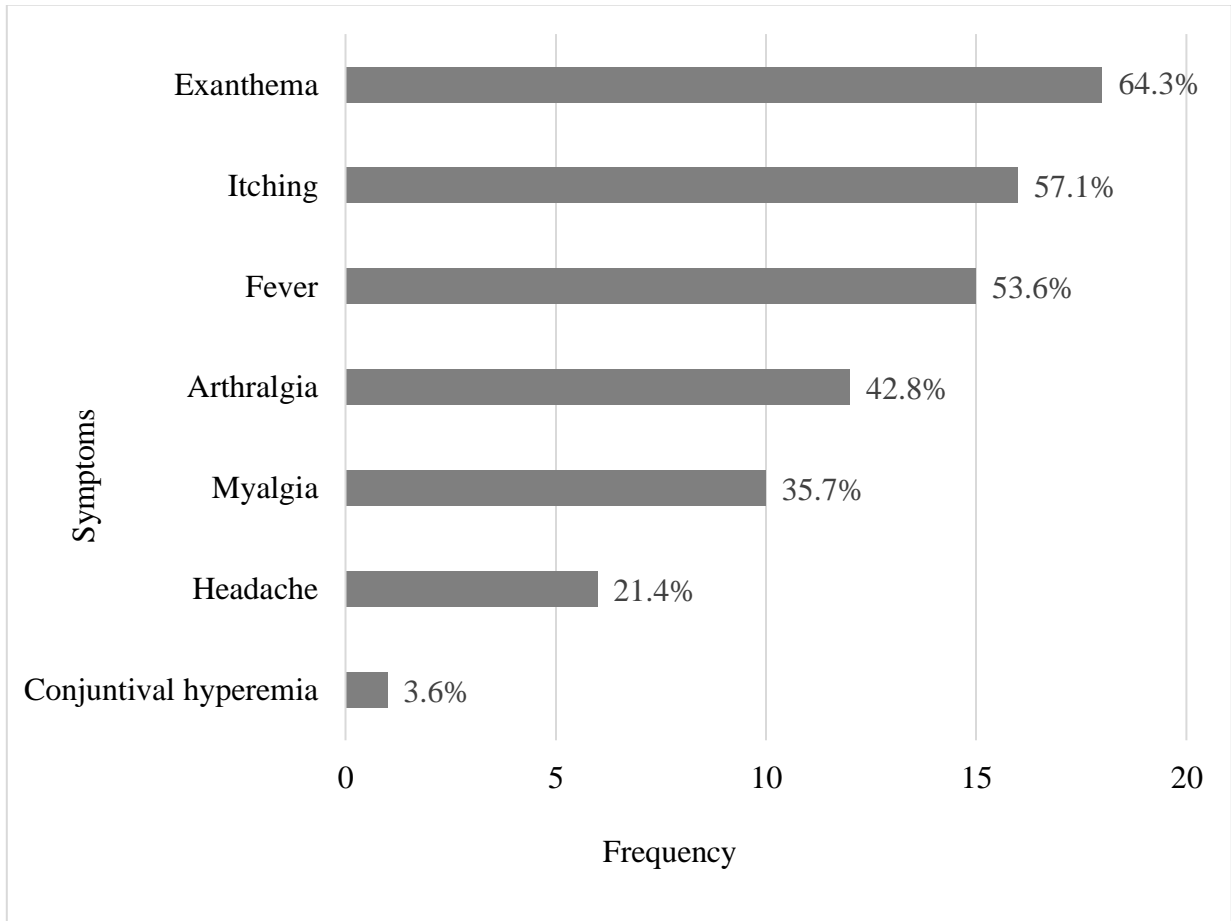


Figure 1. Frequency of symptoms associated with ZIKV infection during pregnancy as reported by mothers.

Table 2 – Sociodemographic and clinical data of 28 neonates born in Salvador, Bahia-Brazil in 2016

Characteristic	N (%)
<b>Sex</b>	
Female	13 (46.4)
Male	15 (53.6)
<b>Route of delivery</b>	
Vaginal	14 (50.0)
Cesarean	14 (50.0)
<b>Size for gestational age</b>	
SGA	1 (3.6)
AGA	24 (85.7)
LGA	3 (10.7)
<b>Phototherapy</b>	
Yes	4 (14.3)
No	23 (82.1)
Unknown	1 (3.6)
Gestational age at birth (weeks)*	39 (37-40)
Weight at birth (g)*	3.082.50 (2.862.50-3.521.25)
Length at birth (cm)*	48.00 (45.00-49.00)
Head circumference at birth (cm)*	34.00 (33-35.13)

SGA = small for gestational age; AGA = appropriate for gestational age; LGA = Large for gestational age; NICU = Neonatal intensive care unit; \*Median (Interquartile range).

**CAPÍTULO 2 - Discordant congenital Zika virus infection in dizygotic twins: a case report**

Situação do artigo: a ser submetido

Revista: Jornal de Pediatria

Fator de impacto: 2,0

Artigo descreve caso discordante em gêmeos expostos ao vírus Zika durante o período gestacional, com sorologia confirmada.



## **Discordant congenital Zika virus infection in dizygotic twins: a case report**

Juliana Menezes Gomes Cabral de Oliveira<sup>1</sup>, MD

Adriana Virgínia Barros Faiçal<sup>3,4</sup>,

Breno Lima de Almeida<sup>1,2</sup>

Emilia Katiane Embiruçu de Araújo Leão<sup>4,5</sup>, MD, PhD

Iluska Andrade Agra<sup>4</sup>, MD

João Vitor Vieira Carvalho de Oliveira<sup>1</sup>, MD

Marcos Vinicius Lima de Oliveira Francisco<sup>1</sup>

Angelina Xavier Acosta<sup>2</sup>, MD, PhD

Isadora Cristina de Siqueira<sup>1</sup>, MD, PhD

### **Author affiliations:**

1-Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Salvador-BA, Brazil

2- Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil

3- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil

4- Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil

5- Departamento de Ciências da Vida, Universidade Estadual da Bahia, Salvador-BA, Brazil  
/ UNEB

**Corresponding author:**

Isadora Cristina de Siqueira, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, R.  
Waldemar Falcao,121, Candeal, Salvador-BA, Brazil, CEP 40296-710

e-mail:isadora.siqueira@fiocruz.br

Telephone: +55 (71) 3176-2466

Key Words (3-5): Congenital infection, twins, Zika virus

abbreviated title:

Disclosure: The authors report no disclosures relevant to the manuscript.

**Funding:**

CNPq-National Council for Scientific and Technological Development (443875/2018-9) and  
PPSUS/BA-FAPESB003/2017/SESAB/CNPq/MS (5125/2017).

**Abstract**

Background: Discordant clinical outcomes in congenital infectious disorders have been described. Methods & Materials: Here we describe a case of suspected Congenital Zika Infection in discordant twin siblings, one with microcephaly. Results: Two boys were born in Salvador, Brazil in June 2015 as the result of a dizygotic twin pregnancy. Their mother reported cutaneous rash and itchiness in her seventh month of gestation. The delivery

occurred at 39 weeks of gestation. In the first twin born with microcephaly, ophthalmologic examination identified atrophy of the bilateral optic nerve. His neurodevelopmental evaluation showed extremely low cognitive, language and motor functions. The second twin had normal head circumference at birth, with a follow-up neurodevelopment evaluation indicating average cognitive and motor function and above average language functioning. Brain imaging and eye exam in the second twin presented no abnormalities. Conclusion: We describe dizygotic twins with suspected exposure to Zika virus during pregnancy, yet only one presented neurological damage due to CZI. Despite advances in the understanding of the pathophysiology of CZI, little is known regarding mechanisms involved in the vertical transmission of the Zika virus. Possible factors, such as fetal genetic factors, viral tropism, and the failure of the placenta barrier should be investigated in an effort to explain the discordant presentation seen in this case.

## **Introduction**

At the end of 2015, a significant increase in the number of newborns with congenital microcephaly prompted a state of emergency in the Brazilian public health system. This epidemic was linked with a previous outbreak of the Zika Virus (ZIKV), as the virus was detected in the amniotic fluid of pregnant women who gave birth to microcephalic children (1).

In addition to microcephaly, a number of other findings have been documented in infants who were presumably exposed to ZIKV during pregnancy, including visual and hearing abnormalities, musculoskeletal deformities, dysphagia and epilepsy (2), all elements considered to be associated with Congenital Zika Infection (CZI).

Discordant cases of congenital infections occurring in twins, such as HIV(3), toxoplasmosis(4) and CMV(5), have been documented in the literature, especially in dizygotic twins. More rarely, discordance may also occur in monozygotic twins(6). Discordant cases have also been reported with respect to CZI: two pairs of dizygotic twins in a study by van der Linden et al.(7) and six pairs of dizygotic twins reported by Caires-Júnior et al.(8). In addition, another pair of monozygotic twins both presented microcephaly, but also had differences in hearing and ocular abnormalities (9).

Considering the scarcity of studies on discordant twins exposed to ZIKV during pregnancy, we describe here the clinical presentations of discordant twins with suspected CZI.

### **Study proceedings**

The twins investigated herein were born in Salvador, Brazil, during the 2016 ZIKV outbreak. Sociodemographic and clinical data on these infants was obtained through the review of medical records. Data management were performed using REDCap 6.18.1© (2018 Vanderbilt University). Serological testing was performed at the Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ), located in Salvador, Bahia-Brazil.

Microcephaly was defined using the INTERGROWTH-21<sup>st</sup> criteria(10) as a head circumference (HC) measurement below 2SD (standard deviations), while normocephaly was considered when HC measurements were within 2SD. Newborn gender, gestational age and (HC) at birth were all taken into account.

Both twins were evaluated by a single pediatrician and neuropsychiatrician. Neurodevelopment was assessed using the Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition

(BSID-III). Complementary evaluations included retinal mapping, refraction evaluation, the assessment of brainstem auditory evoked response (BAER), Video electroencephalography (VEEG) and cerebral magnetic resonance imaging (MRI).

Serological tests were performed on both mother and infant samples. Anti-ZIKV IgG enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Euroimmun®, Lüberg, Germany) were performed. A ZIKV IgM antibody-capture ELISA (MAC-ELISA) was used in accordance with the established protocol (11). Cytomegalovirus (CMV) IgG and IgM, as well as Toxoplasma IgG and IgM (Dia.Pro) serology, in addition to Serum Venereal Disease Research Laboratory test (VDRL) results and HIV status were obtained from patient medical records.

## **Case Reports**

In June 2015, two boys were born as the result of a dizygotic twin pregnancy. Their mother reported skin rash and itchiness during her seventh month of gestation. While she had a suspected clinical diagnosis of ZIKV infection, no samples were collected for serological or molecular diagnosis during her pregnancy. Obstetric ultrasonography evidenced twin dichorionic and diamniotic gestation, with no abnormalities detected. Delivery occurred at 39 weeks of gestation, when she tested negative for syphilis and HIV, presented negativity for toxoplasma IgM and IgG, and was IgM negative but IgG positive for CMV.

In 2017, her ELISA serology for anti-ZIKV IgM was negative, and indeterminate results were obtained for anti-ZIKV IgG.

## **Twin 1**

The first male twin weighed 2,240 g at birth, had an APGAR score of 9/9 and a head circumference of 31cm. He was clinically diagnosed with microcephaly and discharged from the maternity hospital with a recommendation for neurological follow-up.

At three months, computed brain tomography revealed asymmetric supratentorial compartment, enlargement of the posterior and temporal horns and body of the left lateral ventricle, enlarged cortical sulci, areas of gliosis and bilateral irregular calcifications in the periventricular regions and basal nuclei.

At nine months, an eye exam indicated bilateral atrophy of the optic nerve. VEEG showed bilateral epileptiform discharges.

Magnetic resonance imaging (MRI) performed at 11 months showed extensive areas of neuropathologic sequelae in the brain parenchyma, affecting the temporal, parietal and occipital lobes, the corona radiata and periventricular regions of the frontal lobes. Figure 1 details these features, in addition to the thinning of the corpus callosum and supratentorial space enlargement, all suggestive of CZI.

At 21 months of age, this twin received extremely low scores on the cognitive, language and motor function components of the Bayley III neurodevelopmental scale. He was classified as Level V on the Gross Motor Function Classification System (GMFCS) scale, the lowest classification of movement ability. BAER auditory evaluation results were normal.

This infant presented negative anti-ZIKV IgM serology, yet positivity for anti-ZIKV IgG by ELISA. Serological tests for syphilis, HIV and toxoplasma were negative. While anti-CMV IgG was positive, anti-CMV IgM results were negative.

## **Twin 2**

The second male twin weighed 2,685 g at birth, had an APGAR score of 9/9 and a head circumference of 34 cm, classified as normal under the Intergrowth-21 criteria. His growth and neurodevelopment were considered adequate in the first year of life. At 20 months, cognitive and motor function were average and language function was above average on the Bayley III neurodevelopmental scale. Brain MRI, eye exam and BAER testing revealed no abnormalities. Anti-Zika IgG results were negative, as were serological tests for syphilis, HIV and toxoplasma. While anti-CMV IgG was positive, anti-CMV IgM results were negative. Table 1 lists the clinical information collected for both twins.

## **Discussion**

Discordant presentations of congenital infection among twins can arise due to a number of factors. Although equally influenced by maternal factors, e.g. the mother's immune status, fetal susceptibility to congenital infection is also a determinant factor (5), as fetuses sometimes respond differently to primary maternal infection (4).

The placenta can act as a nonspecific barrier (13) and produces interferon (14), a protective factor against congenital infection. However, differences between fetal placentas may also be linked to discordant presentations (5). Despite the fact that the placenta allows communication between mother and fetus, a study found that only 40% of fetuses became infected as a result of exposure to CMV during pregnancy, reinforcing the lack of complete permeability (15). Despite prior reports of the identification of ZIKV in placental tissue (16), samples of placental fragments were unavailable in this study.

Studies detailing factors associated with discordant presentations in twins following exposure to ZIKV are scarce. However, in a study involving the neuroprogenitor cells of dizygotic twins, Caires-Junior et al. observed reduced cell growth after ZIKV infection in vitro and pointed to the importance of genetic factors associated with the regulation of the mTOR and Wnt pathways in the neurodevelopment of these babies (8). The present work is limited by the absence of genetic studies.

In a study involving two pairs of discordant twins with suspected exposure to ZIKV in utero, both mothers reported symptoms suggestive of acute ZIKV infection in the first trimester (7). This corroborates another report that found microcephaly and other birth defects associated with maternal infection occurring during the first trimester (17). However, in the present study the mother reported a clinical picture suggestive of ZIKV infection in her third trimester, indicating that congenital defects may be an outcome of primary infection regardless of gestational period (referencia).

With regard to ophthalmological examination, the affected baby presented bilateral optic nerve atrophy, which is one of the ophthalmological alterations already documented in individuals with CZI (18). A study of discordant twins exposed to ZIKV also reported other abnormalities, e.g. congenital glaucoma and chorioretinal lesions (7).

CZI-associated hearing disorders have also been described in discordant twins, such as deep bilateral hearing loss (7). While both twins in this case had normal BAEP results, long-term follow-up will be necessary to identify and intervene early in the event that clinical changes eventually arise, which could have a major impact on their lives and those of their families.



The Bayley Scales of Infant Development III (BSID-III) is an internationally validated instrument for assessing the motor, cognitive and language domains of child development (19). In babies with ZIKV-associated microcephaly, low scores have been identified by BSID-III (20), which was the case in the affected infant who presented extremely low scores in all three domains. Studies have also shown that infants exposed to ZIKV, even normocephalic babies, may exhibit neurodevelopmental changes when evaluated by this instrument (21,22). Since BSID-III is considered a sensitive instrument for identifying neurodevelopmental delays, the normocephalic infant's average and above average scores reinforce the presence of age-compatible development at the time of this assessment.

Imaging findings, such as subcortical calcifications, ventriculomegaly and corpus callosum abnormalities have proven useful in characterizing CZI (23). The microcephalic baby in this case presented findings consistent with CZI on CT and MRI.

Here, the diagnosis of CZI was inferred due to clinical presentation and the epidemiological link with ZIKV-associated microcephaly during the outbreak in Brazil in 2016, as well as positivity for anti-ZIKV IgG in the affected twin. In other studies, such as the study by van der Linden et al., discordance between twins was confirmed by the detection or not of positive IgM in the CSF of the twins (7). Unfortunately, we were unable to perform this type of serological testing in these babies, as samples were not collected at birth.

It is noteworthy that even though both twins may be exposed to ZIKV during gestation, discordant clinical findings may result. A recent study described ZIKV-associated microcephaly in both twins, yet only one infant presented eye and hearing impairment (9).

Here we describe twins exposed to ZIKV during pregnancy, while only one presented neurological damage due to CZI. Despite advances in the understanding the pathophysiology of CZI, little is known regarding the mechanisms involved in the vertical transmission of ZIKV. Possible factors, such as fetal genetic factors, viral tropism, or the failure of the placenta barrier could explain this discordant presentation, yet further study is warranted.

The present report of discordant CZI presentations in dizygotic twins should contribute to the knowledge surrounding clinical presentations of CZI. In addition, it is important to note that since babies with normal head circumference at birth may develop late onset microcephaly (2), long-term follow-up of normocephalic twins should be mandatory.

### **Ethical approval**

This study was approved by the Institutional Review Board of the Gonçalo Muniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ, protocol no. 1.935.854/2016). The legal guardians of the newborns signed a written term of informed consent.

### **Funding:**

CNPq-National Council for Scientific and Technological Development (443875/2018-9)

### **Conflict of Interest Statement**

No conflict of interest to declare.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to the multidisciplinary team that evaluated the children in this study. Andris K. Walter provided English language revision and manuscript copyediting assistance.

## References

1. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Jun [cited 2018 Nov 21];16(6):653–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108>
2. van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, Barkovich AJ, Júnior H van der L, Filho ELR, et al. Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016 Dec 2 [cited 2019 Jan 24];65(47):1343–8. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6547e2.htm>
3. de Martino M, Tovo PA, Galli L, Caselli D, Gabiano C, Mazzoni PL, et al. HIV-I infection in perinatally exposed siblings and twins. The Italian Register for HIV Infection in Children. *Arch Dis Child* [Internet]. 1991 Oct 1 [cited 2019 Sep 30];66(10):1235–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1953010>
4. Thapa R, Banerjee P, Akhtar N, Jain TS. Discordance for congenital toxoplasmosis in twins. *Indian J Pediatr*. 2009;76(10):1069–70.
5. Lazzarotto T, Gabrielli L, Foschini MP, Lanari M, Guerra B, Eusebi V, et al. Congenital cytomegalovirus infection in twin pregnancies: viral load in the amniotic fluid and pregnancy outcome. *Pediatrics* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2019 Sep 30];112(2):e153-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897321>
6. Wu H-Y, Huang S-C, Huang H-C, Hsu T-Y, Lan K-C. Cytomegalovirus infection

and fetal death in one monozygotic twin. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2019 Sep 30];50(2):230–2. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S102845591100009X?via%3Dihub>

7. van der Linden V, van der Linden Junior H, de Carvalho Leal M, Filho ELR, van der Linden A, Aragão M de FVV, et al. Discordant clinical outcomes of congenital zika virus infection in twin pregnancies. *Arq Neuropsiquiatr*. 2017;75(6):381–6.

8. Caires-Júnior LC, Goulart E, Melo US, Araujo BSH, Alvizi L, Soares-Schanoski A, et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–11.

9. Santos VS, Oliveira SJG, Gurgel RQ, Lima DRR, dos Santos CA, Martins-Filho PRS. Case Report: Microcephaly in Twins due to the Zika Virus. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2017 Jul 12 [cited 2019 Sep 29];97(1):151–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28719330>

10. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2014 Sep 6 [cited 2019 Nov 5];384(9946):857–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209487>

11. Centers for Disease Control and Prevention. Zika MAC-ELISA Instructions for Use [Internet]. Atlanta: FDA. 2018 [cited 2019 Nov 5]. p. 101. Available from: <https://www.fda.gov/media/96373/download>

12. Baer A, Kehn-Hall K. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. *J Vis Exp*. 2014 Nov 4;(93).
13. Morton R, Mitchell I, McNicol E. Neonatal cytomegalic inclusion disease in a set of twins one member of whom was a hydropic stillbirth the other completely uninfected. Case report. *Br J Obstet Gynaecol* [Internet]. 1983 Mar [cited 2019 Nov 2];90(3):276–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6299328>
14. Banatvala JE, Potter JE, Best JM. Interferon response to sendai and rubella viruses in human foetal cultures, leucocytes and placental cultures. *J Gen Virol* [Internet]. 1971 Nov [cited 2019 Nov 2];13(2):193–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4333709>
15. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to Maternal Antibody Status. *N Engl J Med* [Internet]. 1992 Mar 5 [cited 2019 Oct 16];326(10):663–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310525>
16. Seferovic MD, Turley M, Valentine GC, Rac M, Castro ECC, Major AM, et al. Clinical Importance of Placental Testing among Suspected Cases of Congenital Zika Syndrome. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Feb 7 [cited 2019 Oct 16];20(3):712. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30736425>
17. Hoen B, Schaub B, Funk AL, Ardillon V, Boullard M, Cabié A, et al. Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Mar 15 [cited 2019 Feb 18];378(11):985–94. Available from:

<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1709481>

18. Zin AA, Tsui I, Rossetto J, Vasconcelos Z, Adachi K, Valderramos S, et al. Screening Criteria for Ophthalmic Manifestations of Congenital Zika Virus Infection. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2019 Jul 23];171(9):847. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28715527>

19. Madaschi V, Mecca TP, Macedo EC, Paula CS. Bayley-III Scales of Infant and Toddler Development: Transcultural Adaptation and Psychometric Properties. Paid (Ribeirão Preto) [Internet]. 2016 Aug [cited 2019 Oct 11];26(64):189–97. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-863X2016000200189&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-863X2016000200189&lng=en&tlng=en)

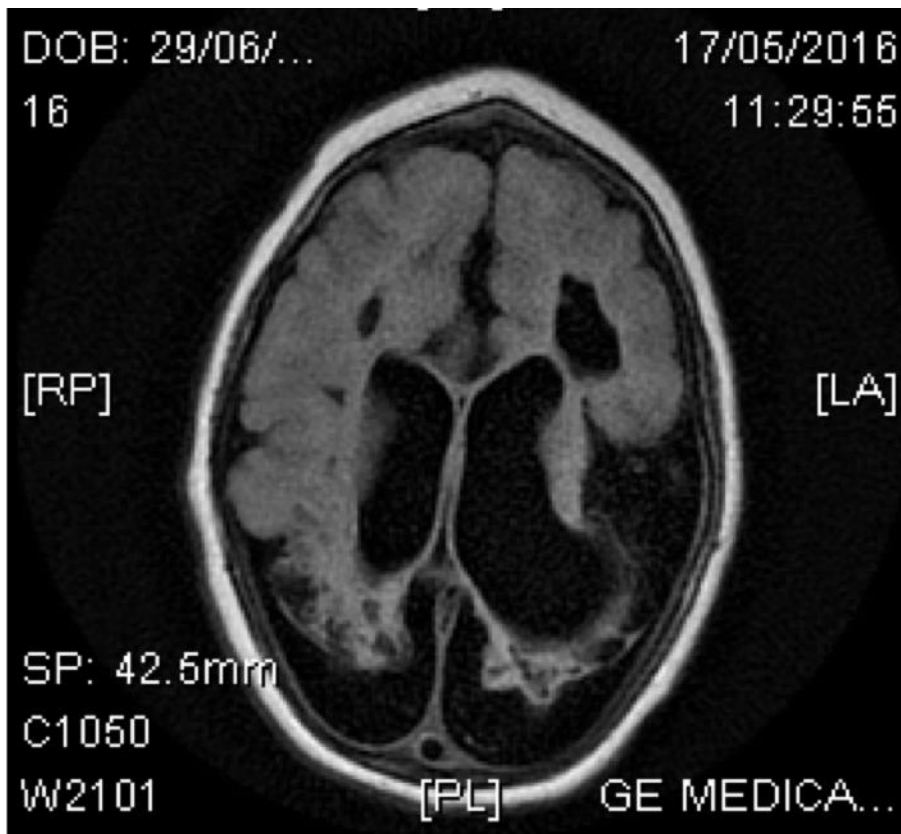
20. Nielsen-Saines K, Brasil P, Kerin T, Vasconcelos Z, Gabaglia CR, Damasceno L, et al. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. *Nat Med*. 2019;

21. Lopes Moreira ME, Nielsen-Saines K, Brasil P, Kerin T, Damasceno L, Pone M, et al. Neurodevelopment in Infants Exposed to Zika Virus In Utero. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 [cited 2019 Nov 2];379(24):2377–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30575464>

22. Faiçal AV, de Oliveira JC, Oliveira JVV, de Almeida BL, Agra IA, Alcantara LCJ, et al. Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus. *BMJ Paediatr open* [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 2];3(1):e000486. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31338431>

23. de Fatima Vasco Aragao M, van der Linden V, Brainer-Lima AM, Coeli RR, Rocha MA, Sobral da Silva P, et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ* [Internet]. 2016 Apr 13 [cited 2018 Jan 23];353:i1901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27075009>

**Figure 1.** Twin 1 Brain MRI



**Figure 1.** Brain MRI from Twin 1 showing thinning of the corpus callosum and supratentorial space enlargement.



Table1 - Clinical and serological data of both twins at birth and on second year of evaluation

	<b>TWIN 1</b>	<b>TWIN 2</b>
<b>At birth</b>		
<b>Sex</b>	Male	Male
<b>Head circumference (cm)</b>	31	34
<b>Intergrowth classification</b>	Microcephaly	Normal
<b>Weight (g)</b>	2240	2685
<b>Weight-for-age</b>	Small for gestacional age	Adequate for gestacional age
<b>Apgar (1'/5')</b>	9/9	9/9
<b>First eye exam</b>	Bilateral atrophy of the optic nerve	Normal
<b>Second year's evaluation</b>		
<b>Cervical control</b>	Abnormal	Normal
<b>Walking without support</b>	Abnormal	Normal
<b>Language</b>	Grunts	Ungrammatical sentences
<b>Dysphagia</b>	Yes	No

<b>Muscle tonus (upper limbs and lower limbs/axial)</b>			Hypertonic/hypotonic	Normal/normal
<b>Myotatic reflexes</b>			Hyperactive	Normal
<b>Clonus</b>			Bilateral	Absent
<b>Brainstem Potential</b>	<b>Auditory</b>	<b>Evoked</b>	Normal	Normal
<b>Bayley scores</b>				
<b>Cognitive</b>			55 (extremely low)	95 (average)
<b>Language</b>			47 (extremely low)	115 (high average)
<b>Motor</b>			46 (extremely low)	107 (average)
<b>Serology IgG Zika - Euroimmune</b>			Positive	Negative

---

#### 4 DISCUSSÃO

A associação entre a infecção materna por ZIKV durante o período gestacional e o desenvolvimento de microcefalia alarmou a população de forma global (BELL; FIELD; NARANG, 1971; BUTLER, 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016) e a microcefalia congênita tem sido associada à infecção intrauterina pelo ZIKV (RASMUSSEN et al., 2016). A microcefalia é uma malformação congênita causada por um distúrbio na fase de proliferação neuronal, que ocorre de forma precoce na gestação (3° - 4° mês) (JJ, 2001) e por isso, as infecções maternas podem causar maior dano no embrião quanto mais cedo ocorrer a infecção na gestação.

No entanto, a microcefalia não parece ser a única forma clínica de apresentação da CZS visto que a associação da infecção congênita pelo ZIKV e o nascimento de bebês normocefálicos já foi relatada anteriormente (FRANÇA et al., 2016). O desenvolvimento de microcefalia em bebês normocefálicos ao nascimento expostos ao ZIKV na gestação, com demonstração de redução do volume cerebral através de exames de neuroimagem, também foi relatado em estudo prévio (VAN DER LINDEN et al., 2016b), o que mostra a real necessidade de estudos com essa população para melhorar o acompanhamento clínico dessas crianças.

Alterações no crescimento intrauterino de bebês com CZS associado a um padrão de restrição do crescimento intrauterino, também já foi relatado (SANTA RITA et al., 2017), com uma maior frequência de bebês com baixo peso ao nascer (MOURA DA SILVA et al., 2016). Situação preocupante quando tratamos do crescimento infantil, uma vez que crianças que apresentam baixo peso ao nascer ou que são PIG ao nascimento podem evoluir com atraso no crescimento e atingir metas inferiores para os padrões esperados (LEANDRO, 2016) apresentando maior de risco de baixo peso, baixa estatura e magreza.

Desde a concepção até a morte todos os indivíduos passam por processos de transformação quantitativa e qualitativa, que irão promover o crescimento e desenvolvimento do ser humano. Devido a uma forte correlação entre esses dois processos, muitas vezes esses conceitos vêm sendo empregados como sinônimos. Todavia, crescimento e desenvolvimento são processos diferentes mas que ocorrem de forma indissociável. O crescimento é um

processo biológico caracterizado pela multiplicação (hiperplasia) e pelo aumento do tamanho (hipertrofia) celular, gerando o aumento do tamanho corporal, encerrando seu processo com o término do aumento do crescimento linear, aferido através da altura (BRASIL, 2002). É considerado um dos melhores indicadores de saúde da criança já que sofre influência direta de fatores ambientais, sendo o primeiro a se alterar, e seu acompanhamento adequado permite ao pediatra promover o crescimento saudável ou intervir, o mais precocemente possível.

Estudos anteriores mostraram atraso no crescimento relacionado com alteração neurológica (HERRERA-ANAYA et al., 2016; PENAGINI et al., 2015; PRATA-BARBOSA et al., 2019; QUITADAMO et al., 2016), em nosso primeiro artigo não identificamos nenhuma criança com atraso no crescimento, no entanto, nenhuma das crianças avaliadas apresentavam distúrbios neurológicos. Somente uma criança tinha sobrepeso, provavelmente associado ao padrão alimentar rico em carboidratos. Já no segundo artigo, observamos atraso no crescimento do bebê microcefálico.

Já o desenvolvimento é caracterizado como um processo de evolução humana a partir de sua concepção que envolve diferenciação e maturação celular, gerando transformações complexas que incluem processos de aprendizagem e aspectos psíquicos e sociais. É um processo que resulta da interação entre sua influência biológica e seu contexto sociocultural (HALPERN, 2014; MADEIRA; SILVA, 2010; NEEDLMAN, 2009; RAPPAPORT, 1981). Dessa forma, em consultas de puericultura deve sempre avaliar de forma individualizada e compartilhada com a família, entendendo o contexto familiar e social desde a concepção além de avaliar possíveis fatores de risco associados, como: ausência de pré-natal, dificuldades no parto, prematuridade, baixo peso ao nascer, uso de álcool, drogas, infecções e depressão na gestação (FIGUEIRAS et al., 2005; KING; LOGSDON; SCHROEDER, 1992). Assim, sua avaliação e acompanhamento adequados permitem identificar precocemente fatores que podem impedir de forma definitiva a aquisição de habilidades.

O Bayley Scales of Infant Development III (BSID-III) é um instrumento internacionalmente validado para avaliação dos domínios motor, cognitivo e de linguagem do desenvolvimento infantil (MADASCHI et al., 2016). É considerado um instrumento de boa sensibilidade para identificação de atrasos do neurodesenvolvimento. Em bebês com microcefalia associada ao ZIKV foram identificados escores baixos por meio do BSID-III (NIELSEN-SAINES et al., 2019), como observamos no bebê microcefálico do artigo 2.

Mesmo normocefálicos podem apresentar alterações de neurodesenvolvimento quando avaliados por esse instrumento (LOPES MOREIRA et al., 2018).

Em avaliação com neuropediatra, as crianças do primeiro artigo apresentaram atraso no desenvolvimento referido, porém esses pacientes apresentaram exame neurológico normal, sugerindo um atraso na aquisição dos marcos do desenvolvimento ou mesmo uma falha de recordação da genitora em relação à época de aquisição do marco. LOPES MOREIRA et al., 2018 identificou atraso de neurodesenvolvimento em bebês normocefálicos utilizando a ferramenta BSID-III. Assim, os pacientes envolvidos no artigo 1 foram encaminhados para realização do BSID-III, sendo demonstrado atraso no desenvolvimento de 35% das crianças, com predomínio no atraso da linguagem (FAIÇAL et al., 2019) (ANEXO 6). No entanto, para definirmos um real atraso de neurodesenvolvimento, serão necessárias outras avaliações de acompanhamento a longo prazo.

No artigo 2, descrevemos o caso de gêmeos discordantes. Estudos relacionados a esses fatores associados à apresentação discordante de infecções congênicas em gêmeos após exposição ao ZIKV são escassos. Casos discordantes de infecções congênicas em gêmeos, como HIV (DE MARTINO et al., 1991a), toxoplasmose (THAPA et al., 2009) e CMV (LAZZAROTTO et al., 2003), já foram documentados na literatura, principalmente em gêmeos dizigóticos, podendo ocorrer também mais raramente em gêmeos monozigóticos (WU et al., 2011b).

Uma série de fatores podem estar relacionados à apresentação discordante de infecções congênicas entre os gêmeos sendo a susceptibilidade fetal à infecção congênica um fator determinante (LAZZAROTTO et al., 2003), visto que os fetos podem responder imunologicamente diferente à infecção materna primária (THAPA et al., 2009). A placenta pode atuar como barreira inespecífica (MORTON; MITCHELL; MCNICOL, 1983) e produzir interferon (BANATVALA; POTTER; BEST, 1971), representando um fator protetor à infecção congênica. No entanto, diferenças entre as placentas dos fetos também podem ter influenciado na apresentação discordante (LAZZAROTTO et al., 2003). Apesar de identificação prévia do ZIKV em tecido placentário (SEFEROVIC et al., 2019), amostras dos fragmentos da placenta não estavam disponíveis nesse estudo.

Em nosso segundo artigo, o bebê microcefálico apresentou, durante avaliação oftalmológica, atrofia bilateral do nervo óptico, achado que compõe o conjunto de alterações oftalmológicas já documentadas em indivíduos com SCZ (ZIN et al., 2017). Além disso, estudo recente mostrou ainda que o perímetro cefálico era diretamente proporcional à presença de alterações oculares, corroborando os achados (TRIGUEIRO et al., 2019). Não identificamos nenhuma alteração oftalmológica no gêmeo normocefálico e em nenhuma das crianças normocefálicas do primeiro artigo, o que está de acordo com a literatura.

Embora estudos anteriores tenham mostrado lactentes com infecção congênita pelo ZIKV com alteração de exames audiométricos (SATTERFIELD-NASH et al., 2017), uma descrição do seguimento de 13 bebês sem microcefalia ao nascimento e com infecção congênita por ZIKV mostrou avaliação auditiva normal (VAN DER LINDEN et al., 2016), concordando com nossos achados. Vale ressaltar que mesmo na ocasião de ambos os gêmeos nascerem afetados, os achados clínicos encontrados podem ser discordantes. Em estudo de Santos et al., 2017, foi relatado primeiro caso de microcefalia associada ao ZIKV em gêmeos, mas com alterações oculares e auditivas em apenas um deles (SANTOS et al., 2017).

## 5 CONCLUSÃO

A SCZ é uma entidade nova, sendo relevante a existência de estudos para melhor caracterizá-la e transmitir conhecimentos que são de suma importância para a prática clínica. Essa síndrome está associada ao surgimento de sequelas irreparáveis e grande impacto social no cotidiano dos indivíduos acometidos e de seus cuidadores que passam a necessitar de cuidados especiais pelo resto de suas vidas. Além disso, é importante salientar bebês com perímetro cefálico normal ao nascimento podem evoluir com microcefalia tardia (van der Linden et al., 2016), sendo também imprescindível a realização de acompanhamento a longo prazo das crianças expostas ao vírus Zika, porém com apresentação clínica assintomática ao nascimento. Nossos achados reforçam que a microcefalia não é a situação clínica patognomônica da infecção pelo ZIKV e que podem existir formas clínicas diferentes do que sabemos até o presente momento.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, Tarciana Albuquerque Marenga De; AMORIM, Melania Maria Ramos De; SOUZA, Alex Sandro Rolland. Mortalidade determinada por anomalias congênitas em Pernambuco, Brasil, de 1993 a 2003. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 2, p. 122–126, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302008000200013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000200013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 23 set. 2019.

ASHWAL, S. *et al.* Practice Parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. **Neurology**, v. 73, n. 11, p. 887–897, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19752457>>. Acesso em: 23 set. 2019.

BANATVALA, J. E.; POTTER, J. E.; BEST, J. M. Interferon response to sendai and rubella viruses in human foetal cultures, leucocytes and placental cultures. **The Journal of general virology**, v. 13, n. 2, p. 193–201, 1971.

BELL, T. M.; FIELD, E. J.; NARANG, H. K. Zika virus infection of the central nervous system of mice. **Archiv fur die gesamte Virusforschung**, v. 35, n. 2, p. 183–93, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5002906>>. Acesso em: 23 set. 2019.

BESERRA, Eduardo B. *et al.* Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 6, p. 853–860, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2006000600021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2006000600021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 23 set. 2019.

BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 13, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721538>>. Acesso em: 23 set. 2019.

BLÁZQUEZ, Ana-Belén *et al.* Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 266, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24917859>>. Acesso em: 23 set.



2019.

BONALDO, Myrna C. *et al.* Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004816, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27341420>>. Acesso em: 23 set. 2019.

BRASIL. Saúde da criança: acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil / Ministério da Saúde. In: **(Série Cadernos de Atenção Básica; n. 11) - (Série A. Normas e Manuais Técnicos)**. Brasília-DF.

BRASIL. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos e serviços de saúde. In: **Norma Técnica do Sistema de Vigilância Nutricional e Alimentar - SISVAN**. Brasília-DF.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos Casos de Dengue e Febre de Chikungunya Até a Semana Epidemiológica 38, 2015.** [s.l: s.n.].

**BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika.** [s.l: s.n.].

BRASIL, Patrícia *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602412>>. Acesso em: 23 set. 2019.

BUTLER, Declan. Zika virus: Brazil's surge in small-headed babies questioned by report. **Nature**, v. 530, n. 7588, p. 13–14, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26842033>>. Acesso em: 26 out. 2019.

CAIRES-JÚNIOR, Luiz Carlos *et al.* Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.

CALVET, Guilherme *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108>>. Acesso em: 26 set. 2019.

CALVET, Guilherme *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108>>. Acesso em: 23 set. 2019.

CAMPOS, Gubio S.; BANDEIRA, Antonio C.; SARDI, Silvia I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401719>>. Acesso em: 23 set. 2019.

CAO-LORMEAU, Van-Mai *et al.* Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1084–1086, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856001>>. Acesso em: 23 set. 2019.

CARDOSO, Taíssa Ferreira *et al.* Congenital Zika infection: neurology can occur without microcephaly. **Archives of Disease in Childhood**, v. 104, n. 2, p. 199–200, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29858269>>. Acesso em: 5 out. 2019.

CAVEIÃO; CRISTIANO. Vírus zika suas complicações relacionadas à microcefalia e guillain-barré. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, 2017. Disponível em: <<http://portaldeperiodicos.unibrasil.com.br/index.php/cadernossaude/article/view/2449>>. Acesso em: 23 set. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Zika MAC-ELISA Instructions for Use**. 2018.

CHANG, Christopher *et al.* The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925496>>. Acesso em: 23 set. 2019.

CONSOLI, Rotraut A. G. B. *et al.* **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro : Editora FIOCRUZ, 1994. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/2708>>. Acesso em: 23 set. 2019.

COSTELLO, Anthony *et al.* Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 6, p. 406- 406A, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/bulletin/volumes/94/6/16-176990.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

CRUZ, A. C. R.; VASCONCELOS, P. F. C. Palestra Arbovírus no Brasil. **Biológico**, v. 70, n. 2, p. 45–46, 2008.

CUGOLA, Fernanda R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature18296>>. Acesso em: 23 set. 2019.

CUNHA, R. V. *et al.* **Zika: abordagem clínica na atenção básica**. [s.l.: s.n.].

DE ARAÚJO, Thalia Velho Barreto *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 328–336, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29242091>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

DE FATIMA VASCO ARAGAO, Maria *et al.* Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 353, p. i1901, 2016.

DE MARTINO, M. *et al.* HIV-I infection in perinatally exposed siblings and twins. **Archives of Disease in Childhood**, v. 66, n. 10, p. 1235–1238, 1991. a.

DE MARTINO, M. *et al.* HIV-I infection in perinatally exposed siblings and twins. The Italian Register for HIV Infection in Children. **Archives of Disease in Childhood**, v. 66, n. 10, p. 1235–8, 1991. b.

DICK, G. W. ; KITCHEN, S.; HADDOW, A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995440>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

DUFFY, Mark R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0805715>>. Acesso em: 24 set. 2019.

FAIÇAL, Adriana Virginia *et al.* Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus. **BMJ Paediatrics Open**, v. 3, n. 1, p. e000486, 2019.

FANTINATO, Francieli Fontana Sutile Tardetti *et al.* Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 4, p. 683–690, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869981>>. Acesso em: 24 set. 2019.

FAYE, Oumar *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 311, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24148652>>. Acesso em: 24 set. 2019.

FIGUEIRAS, A. C. *et al.* **Manual para vigilância do desenvolvimento infantil no contexto da AIDPI**. Washington, D.C.

FOWLER, Karen B. *et al.* The Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to Maternal Antibody Status. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 10, p. 663–667, 1992.

FRANÇA, Giovanny V. A. *et al.* Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 891–897, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27372398>>. Acesso em: 15 out. 2019.

FREIRE, Caio César de Melo. **Caracterização de processos evolutivos de vírus de RNA a partir de padrões deixados nas filogenias virais**. 2014. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/95/95131/tde-21012015-165014/>>. Acesso em: 24 set. 2019.

GADELHA, D. T. A. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 37, p. 29–36, 1985.

GARCIA, R.; MARCHETTE, N. J.; RUDNICK, A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia \*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4976739>>. Acesso em: 24 set. 2019.

GÓIS, Fernando Rodrigues. Investigação de arbovírus (gênero flavivírus) de interesse à saúde pública em mosquitos (*aedes aegypti* e *aedes albopictus*) em Foz do Iguaçu, Paraná. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2017.

GOLDEN, J. A. Cell migration and cerebral cortical development. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 27, n. 1, p. 22–28, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298998>>. Acesso em: 24 set. 2019.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 3, p. 215–227, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347388>>. Acesso em: 24 set. 2019.

HALPERN, R. **Manual de pediatria do desenvolvimento e comportamento**. Barueri: Manole, 2014.

HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement**, v. 1, p. 1–39, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3068349>>. Acesso em: 24 set. 2019.

HAYES, Edward B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347–50, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788800>>. Acesso em: 24 set. 2019.

HENNESSEY, Morgan; FISCHER, Marc; STAPLES, J. Erin. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55–58, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820163>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

HERRERA-ANAYA, Elizabeth *et al.* Association between gross motor function and nutritional status in children with cerebral palsy: a cross-sectional study from Colombia. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 58, n. 9, p. 936–941, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/dmcn.13108>>. Acesso em: 15 out. 2019.

HOEN, Bruno *et al.* Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 11, p. 985–994, 2018.

IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001879>>. Acesso em: 24 set. 2019.

JJ, VOLPE. **Neurology of the newborn**. 4 ed ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001.

KING, E.H.; LOGSDON, D.A.; SCHROEDER, S.R. Risk factors for developmental delay among infants and toddlers. In: **Child Health Care**. [s.l: s.n.]. p. 39–52.

KUCHARSKI, Adam J. *et al.* Transmission dynamics of zika virus in island populations: a modelling analysis of the 2013–14 french polynesia outbreak. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004726, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004726>>. Acesso em: 24 set. 2019.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195954>>. Acesso em: 24 set. 2019.

LANCIOTTI, Robert S. *et al.* Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, yap state, micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008. Disponível em: <[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article.htm)>. Acesso em: 24 set. 2019.

LAZZAROTTO, Tiziana *et al.* Congenital cytomegalovirus infection in twin pregnancies: viral load in the amniotic fluid and pregnancy outcome. **Pediatrics**, v. 112, n. 2, 2003.

LEANDRO, Carol Góis. Nutritional status and gross motor function in children with cerebral palsy, and implications for Zika virus infection. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 58, n. 9, p. 893–894, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/dmcn.13134>>. Acesso em: 18 out. 2019.

LEUNG, Grace H. Y. *et al.* Zika virus infection in australia following a monkey bite in indonesia. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 46, n. 3, p. 460–4, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26521519>>. Acesso em: 24 set. 2019.

LINDENBACH, Brett D.; RICE, Charles M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23–61, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14696326>>. Acesso em: 24 set. 2019.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. OPAS. Lineamientos preliminares de vigilancia de microcefalia en recién nacidos en entornos con riesgo de circulación de virus Zika. [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/28230>>. Acesso em: 24 set. 2019.

LOPES MOREIRA, M. Elisabeth *et al.* Neurodevelopment in Infants Exposed to Zika Virus In Utero. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 24, p. 2377–2379, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30575464>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MACNAMARA, F. Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0035920354900061>>. Acesso em: 24 set. 2019.

MADASCHI, Vanessa *et al.* Bayley-III Scales of Infant and Toddler Development: Transcultural Adaptation and Psychometric Properties. **Paidéia (Ribeirão Preto)**, v. 26, n. 64, p. 189–197, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-863X2016000200189&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-863X2016000200189&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 24 set. 2019.

MADEIRA, Isabel Rey; SILVA, Rosa Resegue Ferreira Da. Acompanhamento do crescimento e desenvolvimento. In: **Tratado de Pediatria: Sociedade Brasileira de Pediatria**. 2 ed ed. Barueri: Manole, 2010.

MLAKAR, Jernej *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1600651>>. Acesso em: 24 set. 2019.

MOORE, D. L. *et al.* Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 49–64, 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1124969>>. Acesso em: 24 set. 2019.

MORTON, R.; MITCHELL, I.; MCNICOL, E. Neonatal cytomegalic inclusion disease in a set of twins one member of whom was a hydropic stillbirth the other completely uninfected. Case report. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 90, n. 3, p. 276–279, 1983.

MOURA DA SILVA, Antonio Augusto *et al.* Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 1953–1956, 2016. Disponível em: <[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/11/16-0956\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/11/16-0956_article.htm)>. Acesso em: 17 out. 2019.

MUSSO, D. *et al.*. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 14, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739982>>. Acesso em: 24 set. 2019.

MUSSO, Didier *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625872>>. Acesso em: 24 set. 2019.

MUSSO, Didier; MAI CAO-LORMEAU, Van; GUBLER, Duane J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, p. 243–244, 2015. Disponível em: <<http://ees.elsevier.com/thelancet/www.thelancet.com>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

NEEDLMAN, RD. Crescimento e desenvolvimento. O primeiro ano. In: **Nelson Tratado de Pediatria**. 16ª ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 33–9.

NIELSEN-SAINES, Karin *et al.* Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children *Nature Medicine*. **Nature Publishing Group**, , 2019.

NOGUEIRA, M. L. *et al.* Adverse birth outcomes associated with Zika virus exposure during pregnancy in São José do Rio Preto, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 646–652, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29133154>>. Acesso em: 23 out. 2019.

OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 9, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626205>>. Acesso em: 24 set. 2019.

OLIVEIRA MELO, A. S. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26731034>>. Acesso em: 24 set. 2019.

OLIVEIRA, João V *et al.* Neonatal surveillance for congenital Zika infection during the 2016 microcephaly outbreak in Salvador, Brazil: Zika virus detection in asymptomatic newborns. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 148, n. S2, p. 9–14,



2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijgo.13042>>

OLSON, J. G. *et al.* A survey for arboviral antibodies in sera of humans and animals in Lombok, Republic of Indonesia. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 131–137, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6309104>>. Acesso em: 24 set. 2019.

PAIXÃO, Enny S. *et al.* History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 4, p. 606–612, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26959260>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

PENAGINI, Francesca *et al.* Dietary Intakes and Nutritional Issues in Neurologically Impaired Children. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9400–9415, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26580646>>. Acesso em: 15 out. 2019.

PESSOA, André *et al.* Motor abnormalities and epilepsy in infants and children with evidence of congenital zika virus infection. **Pediatrics**, v. 141, n. Supplement 2, p. S167–S179, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29437050>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

PETERSEN, Lyle R. *et al.* Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1602113>>. Acesso em: 24 set. 2019.

PIERSON TC, DIAMOND MS. Flaviviruses. In: DM KNIPE, PM Howley (Ed.). **Fields virology**. 6th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 747–794.

PINTO JUNIOR, Vitor Laerte *et al.* Zika Virus: A Review to Clinicians. **Acta Medica Portuguesa**, v. 28, n. 6, p. 760–5, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26849762>>. Acesso em: 24 set. 2019.

PLOURDE, Anna R.; BLOCH, Evan M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016. Disponível em: <[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/7/15-1990\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/7/15-1990_article.htm)>. Acesso em: 24 set. 2019.

PRATA-BARBOSA, Arnaldo *et al.* Effects of Zika infection on growth. **Jornal de Pediatria**, v. 95, n. S1, p. 30–41, 2019. Disponível em: <[www.jpmed.com.br](http://www.jpmed.com.br)>. Acesso em: 15 out. 2019.

QUITADAMO, Paolo *et al.* Gastrointestinal and nutritional problems in neurologically impaired children. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 20, n. 6, p. 810–815, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090379816300769>>. Acesso em: 15 out. 2019.

RAPPAPORT, CR. Teoria do desenvolvimento - conceitos fundamentais. In: **Psicologia do Desenvolvimento**. São Paulo: EPU, 1981. p. V.1.

RASMUSSEN, Sonja A. *et al.* Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981–1987, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27074377>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

RORKE, Lucy Balian. A Perspective: The Role of Disordered Genetic Control of Neurogenesis in the Pathogenesis of Migration Disorders. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 53, n. 2, p. 105–117, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8120535>>. Acesso em: 24 set. 2019.

SANTA RITA, Ticiane Henriques *et al.* Association between suspected Zika virus disease during pregnancy and giving birth to a newborn with congenital microcephaly: a matched case–control study. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 457, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28877754>>. Acesso em: 17 out. 2019.

SANTOS, Rosângela da Silva; DIAS, Iêda Maria Vargas. Refletindo sobre a malformação congênita. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 58, n. 5, p. 592–596, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-71672005000500017&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672005000500017&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 24 set. 2019.

SANTOS, Victor S. Case Report: Microcephaly in Twins due to the Zika Virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 1, p. 151–154, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28719330>>. Acesso em: 29 set. 2019.

SATTERFIELD-NASH, Ashley *et al.* Health and development at age 19–24 months of 19 children who were born with microcephaly and laboratory evidence of congenital zika virus infection during the 2015 zika virus outbreak — Brazil, 2017. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 49, p. 1347–1351, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29240727>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SCHULER-FACCINI, Lavinia *et al.* Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820244>>. Acesso em: 25 out. 2019.

SEFEROVIC, Maxim D. *et al.* Clinical importance of placental testing among suspected cases of congenital zika syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.

SILVA, Luiz Jacintho Da; ANGERAMI, Rodrigo Nogueira. **Viroses emergentes no Brasil**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/livro/viroses-emergentes-no-brasil>>. Acesso em: 24 set. 2019.

SIROIS, Patricia A. *et al.* Developmental outcomes in young children born to mothers with West Nile illness during pregnancy. **Birth defects research. Part A, Clinical and Molecular Teratology**, v. 100, n. 10, p. 792–6, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25196266>>. Acesso em: 24 set. 2019.

SLAVOV, S. N. *et al.* Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2016000500201&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2016000500201&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 24 set. 2019.

STAPLES, J. Erin *et al.* Interim Guidelines for the Evaluation and Testing of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection — United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 1–5, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e3er.htm>>. Acesso em: 24 set. 2019.

SWAMINATHAN, Sankar *et al.* Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. **New England Journal of Medicine**, *et al.* v. 375, n. 19, p. 1907–1909, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27681699>>. Acesso em: 24 set. 2019.

TANG, Hengli *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26952870>>. Acesso em: 24 set. 2019.

TAPPE, Dennis *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26702627>>. Acesso em: 24

set. 2019.

TELLERÍA-DÍAZ, A.; CALZADA-SIERRA, D. J. Guillain Barre syndrome. **Revista de Neurologia**, v. 34, n. 10, p. 966–76, 2002 . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12134330>>. Acesso em: 24 set. 2019.

THAPA, Rajoo *et al.* **Discordance for congenital toxoplasmosis in twins** **Indian Journal of Pediatrics**, 2009.

TOGNARELLI, J. *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26611910>>. Acesso em: 24 set. 2019.

TRIGUEIRO, Silvana Aranha *et al.* Correlation between cephalic circumference at birth and ocular alterations in patients with microcephaly potentially associated with Zika Virus infection. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 65, n. 6, p. 909–913, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.65.6.909>>. Acesso em: 16 out. 2019.

VALLE, Denise *et al.* Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016. Disponível em: <[http://www.iec.pa.gov.br/template\\_doi\\_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200419&scielo=S2237-96222016000200419](http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200419&scielo=S2237-96222016000200419)>. Acesso em: 24 set. 2019.

VAN DER LINDEN, Vanessa *et al.* Description of 13 infants born during october 2015–january 2016 with congenital zika virus infection without microcephaly at birth — Brazil. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 47, p. 1343–1348, 2016a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27906905>>. Acesso em: 5 out. 2019.

VAN DER LINDEN, Vanessa *et al.* Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 47, p. 1343–1348, 2016b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6547e2.htm>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

VAN DER LINDEN, Vanessa *et al.* Discordant clinical outcomes of congenital zika virus infection in twin pregnancies. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 6, p. 381–386, 2017.

VARGAS, Juan E. *et al.* Congenital microcephaly: Phenotypic features in a consecutive sample of newborn infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 139, n. 2, p. 210–214, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487745>>. Acesso em: 24 set. 2019.

VENTURA, Camila V. *et al.* Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 79, n. 1, p. 1–3, 2016. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26840156>>. Acesso em: 23 out. 2019.

VENTURA, Camila V. *et al.* Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 228, 2016. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775125>>. Acesso em: 23 jul. 2019.

VICTORA, Cesar Gomes *et al.* Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? **The Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 621–624, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616002737>>. Acesso em: 24 set. 2019.

VILLAR, José *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: The Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **The Lancet**, v. 384, n. 9946, p. 857–868, 2014a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209487>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

VILLAR, José *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **The Lancet**, v. 384, n. 9946, p. 857–868, 2014b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209487>>. Acesso em: 24 set. 2019.

WHO. **Zika situation report**. WHO, [s. l.], 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/14-july-2016/en/>>. Acesso em: 24 set. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations**. [2016]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/>>. Acesso em: 14 out. 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Congenital anomalies. **Fact sheet** n. 370. [s. l.], 2016.

WU, Hsin-Yi *et al.* Cytomegalovirus infection and fetal death in one monozygotic twin. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 50, n. 2, p. 230–232, 2011. a.

WU, Hsin Yi *et al.* Cytomegalovirus infection and fetal death in one monozygotic twin. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 50, n. 2, p. 230–232, 2011. b.

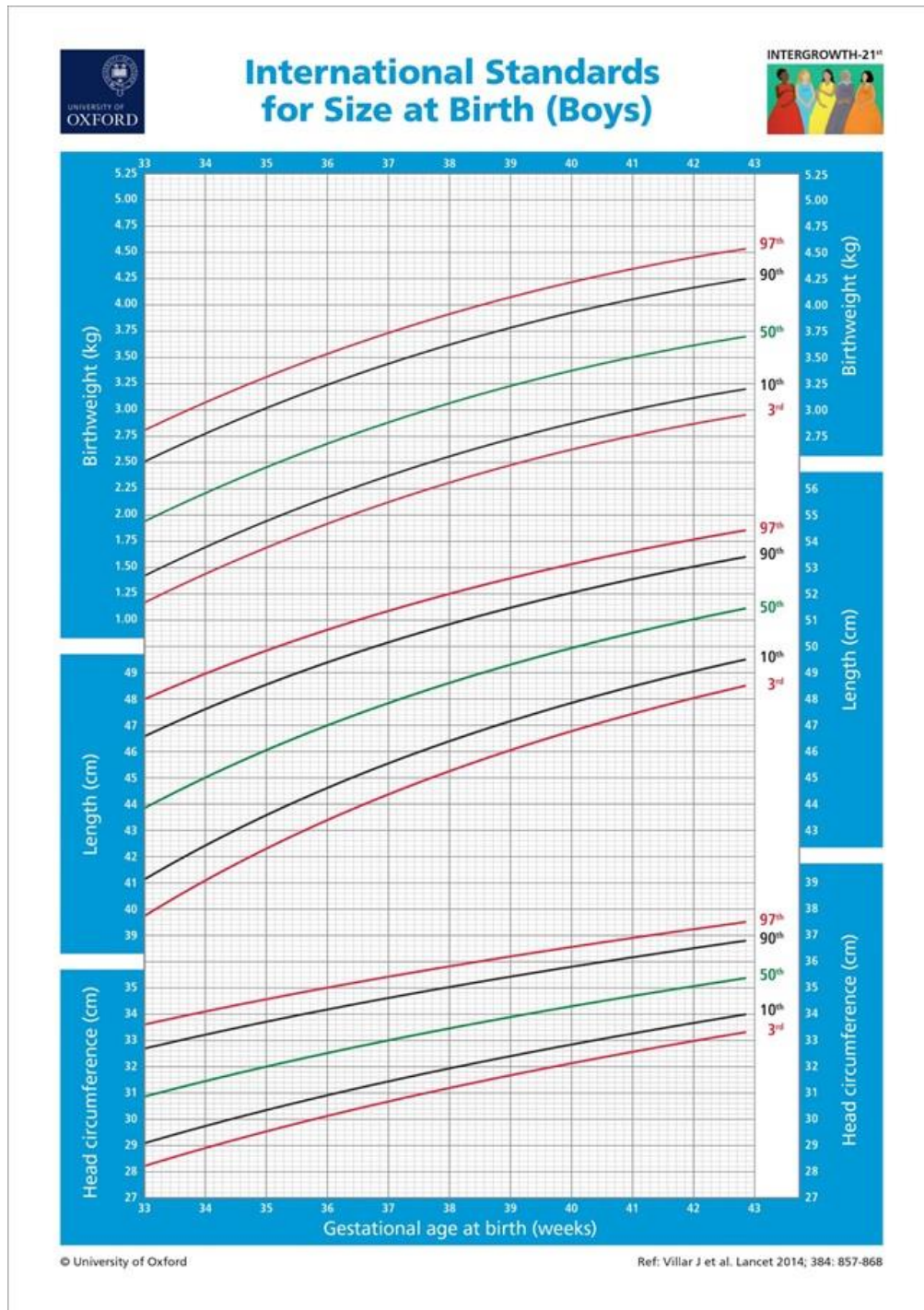
ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061233>>. Acesso em: 24 set. 2019.

ZIN, Andrea A. *et al.* Screening Criteria for Ophthalmic Manifestations of Congenital Zika Virus Infection. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 9, p. 847, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28715527>>. Acesso em: 23 jul. 2019.

# ANEXOS

## ANEXO 1 – CURVA INTERGROWTH-21

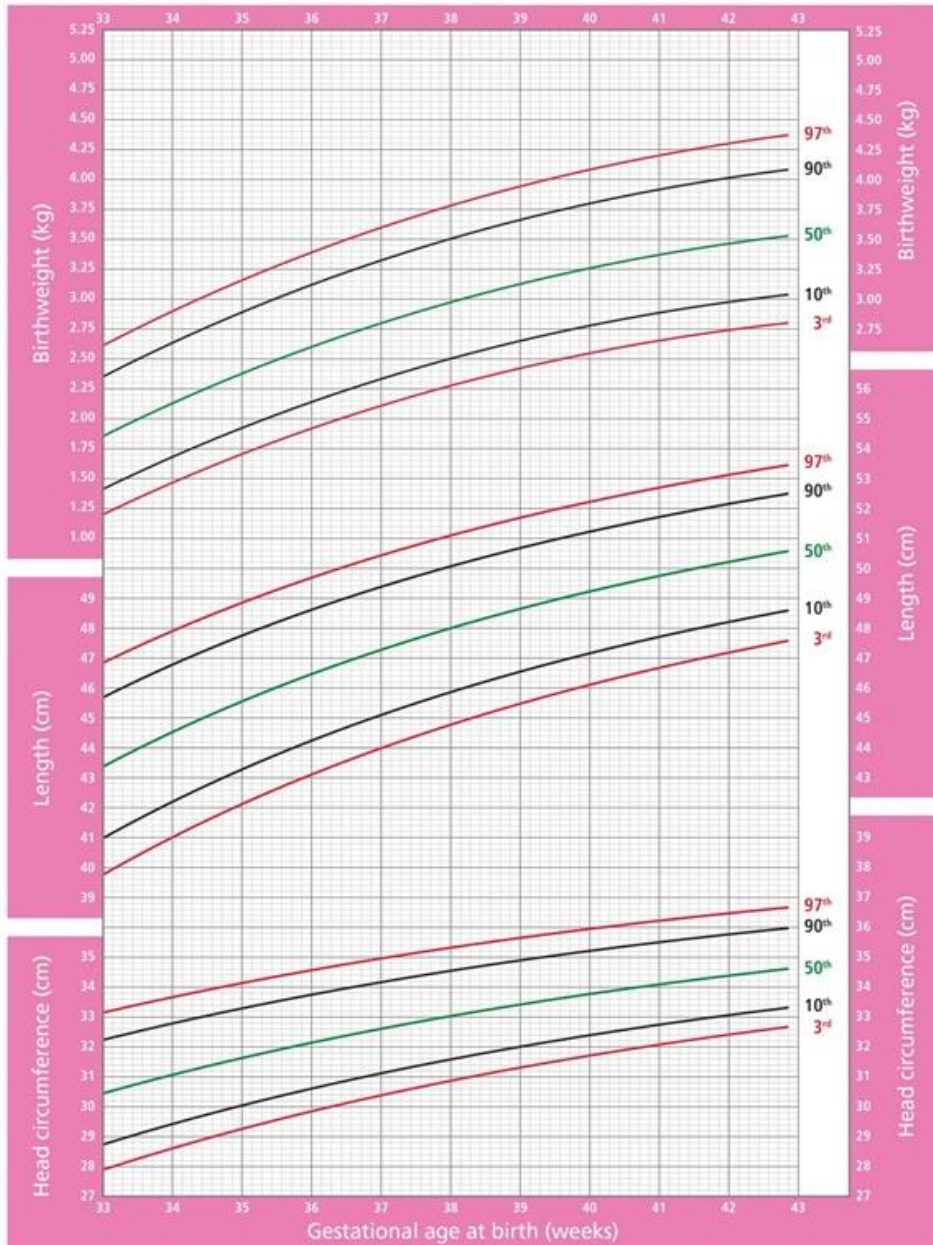
### A. MENINOS



**B. MENINAS**



**International Standards  
for Size at Birth (Girls)**



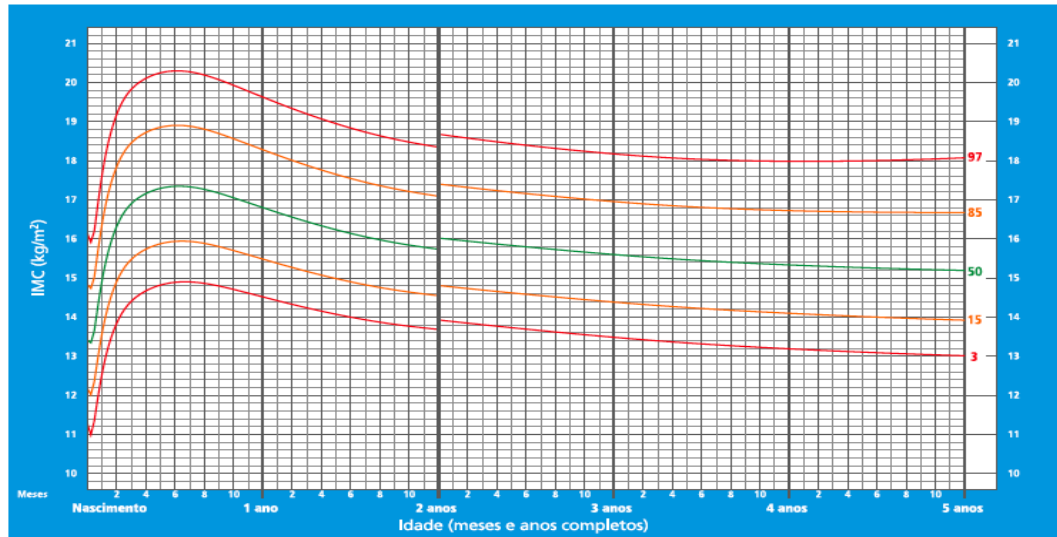


## ANEXO 2 – CURVAS DE CRESCIMENTO

### A. MENINOS

#### IMC para a idade MENINOS

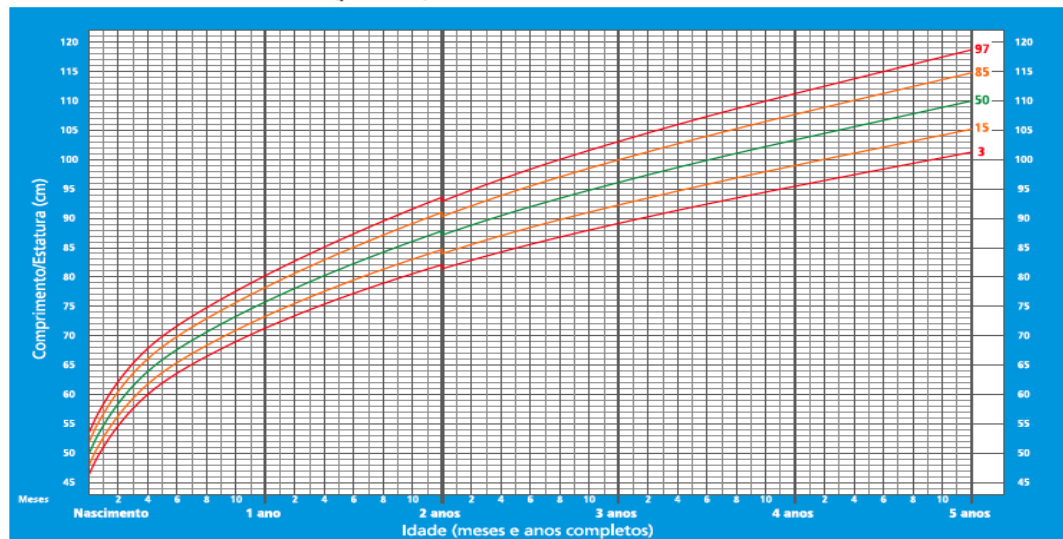
do nascimento aos 5 anos (percentis)



WHO Child Growth Standards

#### Comprimento/Estatura para a idade MENINOS

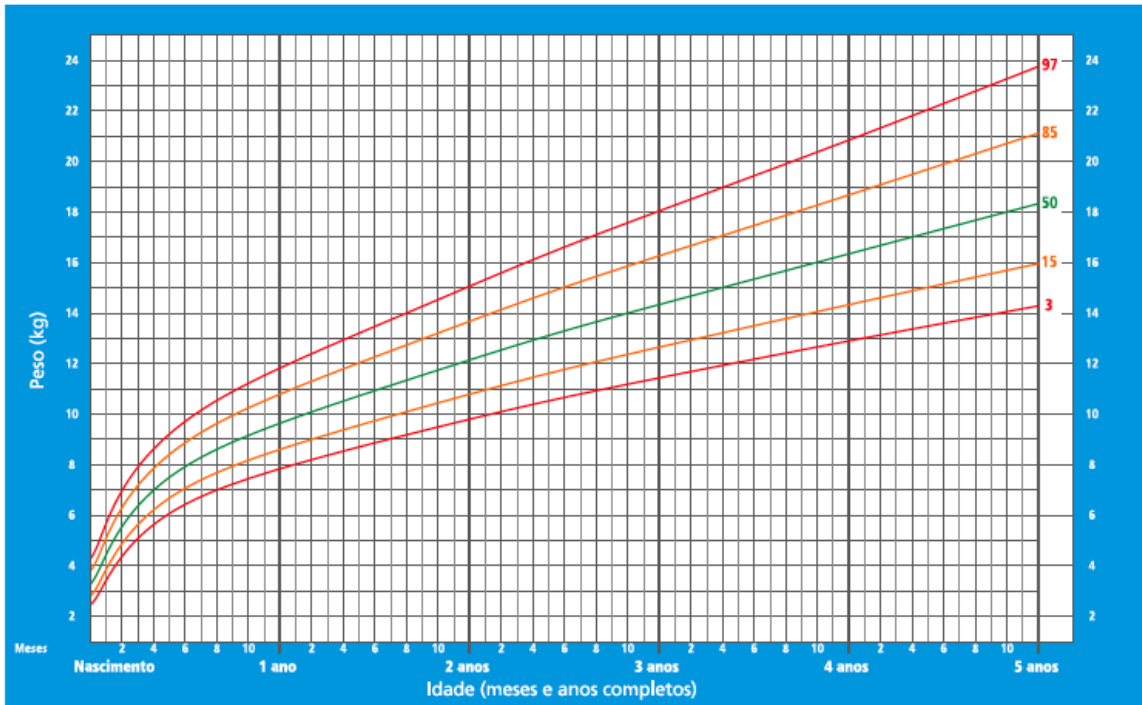
do nascimento aos 5 anos (percentis)



WHO Child Growth Standards

# Peso para a idade MENINOS

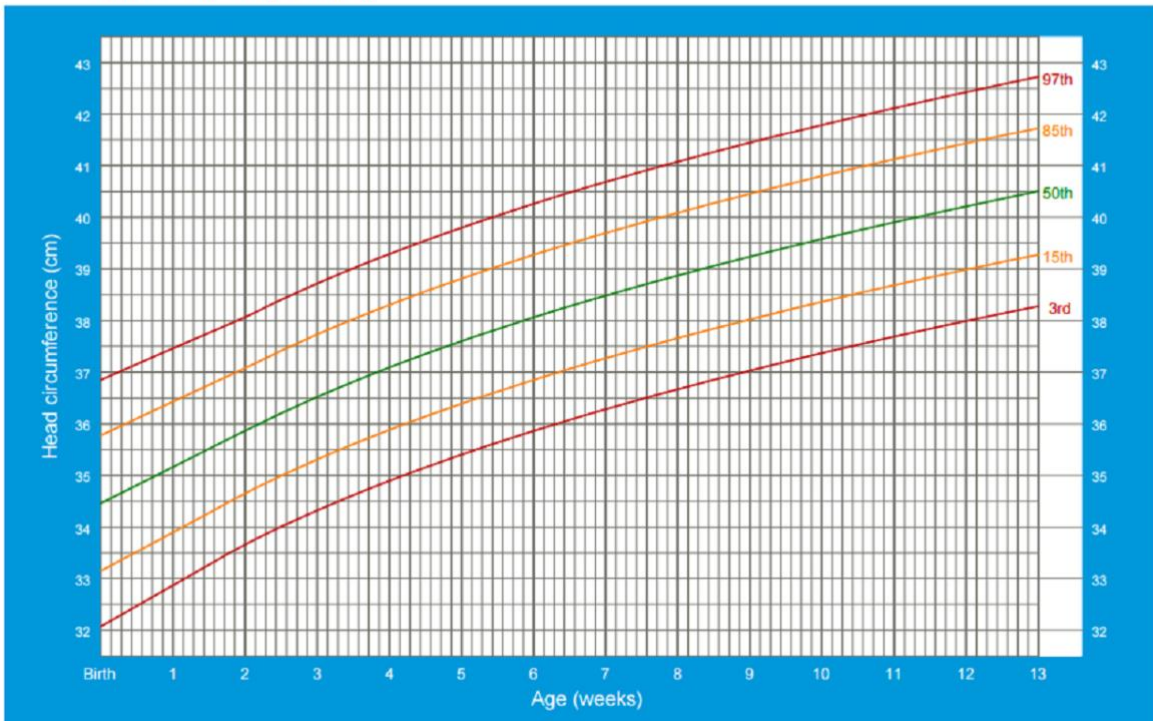
do nascimento aos 5 anos (percentis)



WHO Child Growth Standards

# Head circumference-for-age BOYS

Birth to 13 weeks (percentiles)

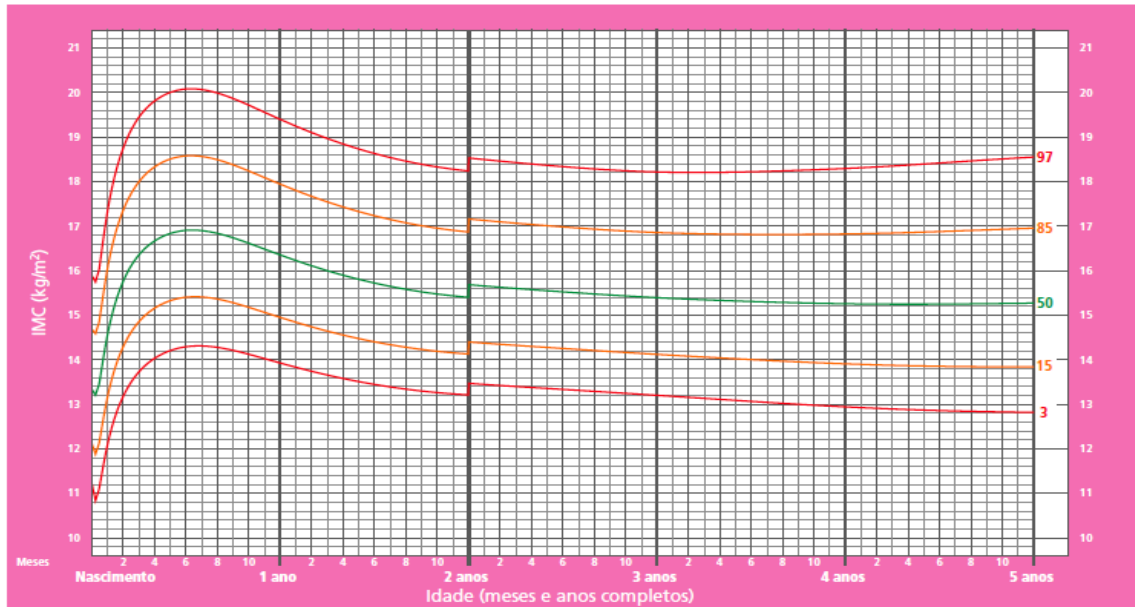


WHO Child Growth Standards

## B. MENINAS

### IMC para a idade MENINAS

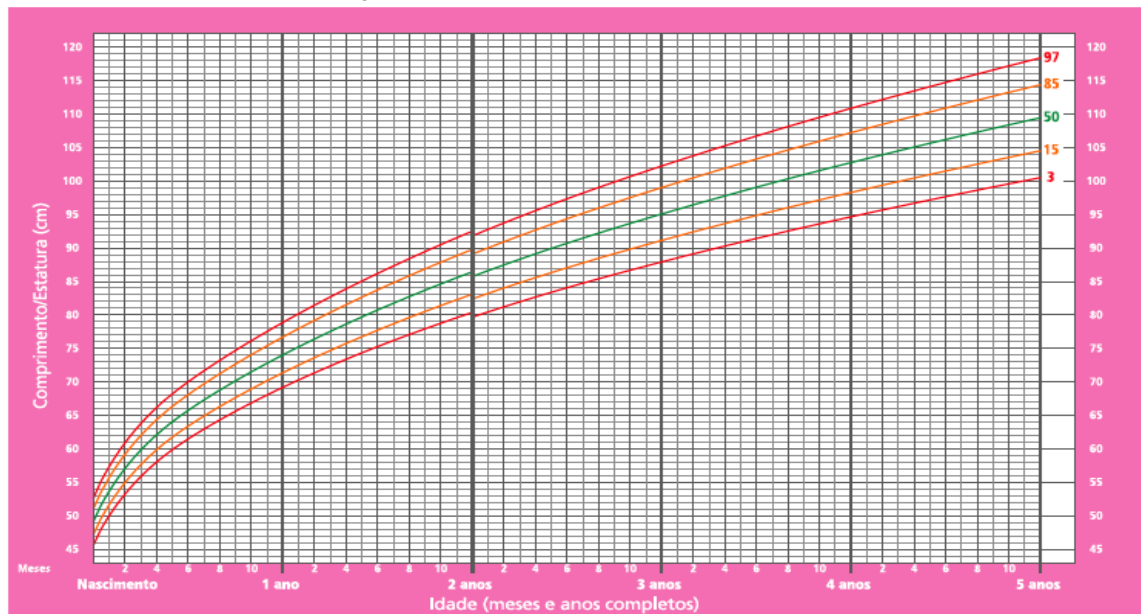
do nascimento aos 5 anos (percentis)



WHO Child Growth Standards

### Comprimento/Estatura para a idade MENINAS

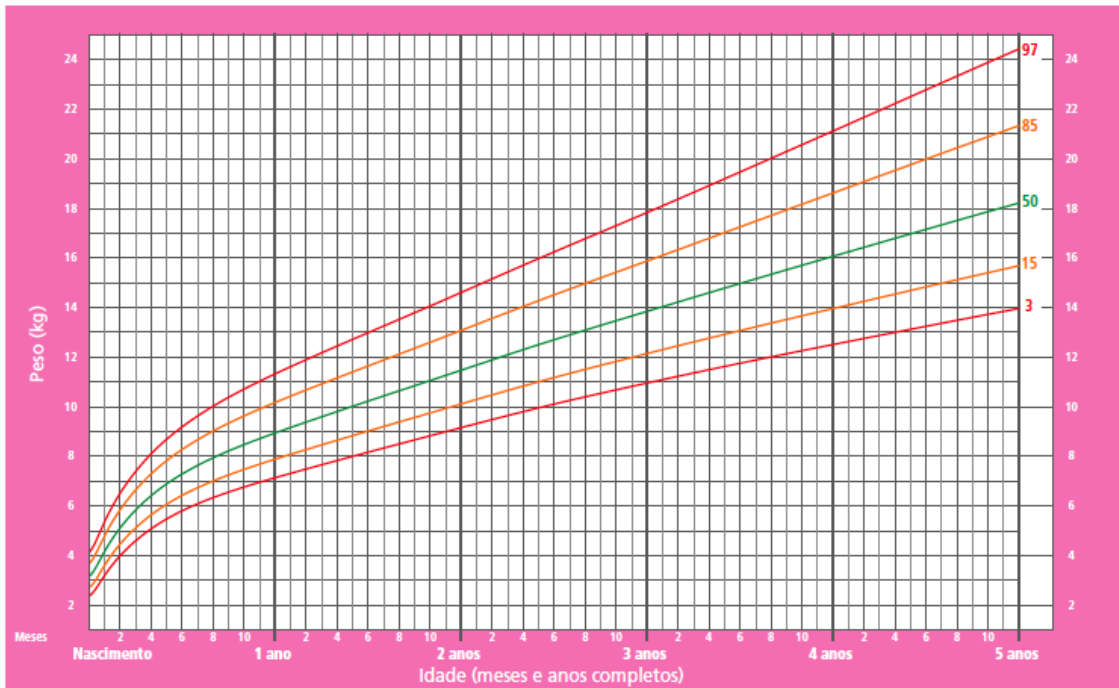
do nascimento aos 5 anos (percentis)



WHO Child Growth Standards

## Peso para a idade MENINAS

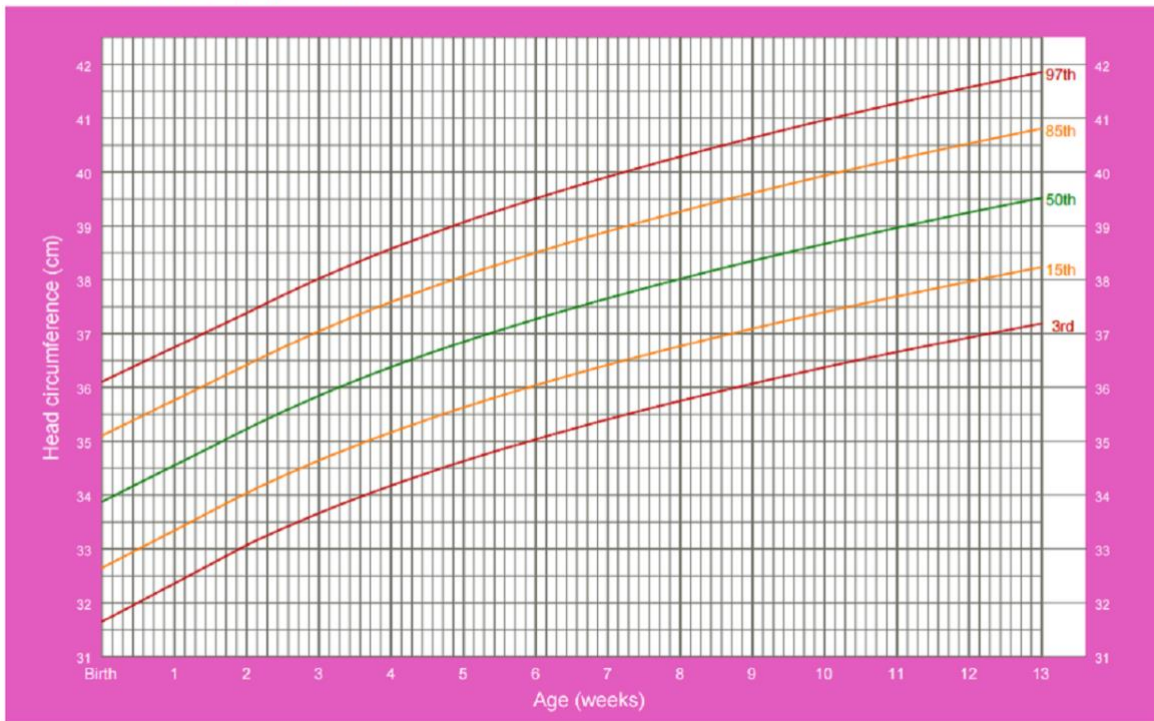
do nascimento aos 5 anos (percentis)



WHO Child Growth Standards

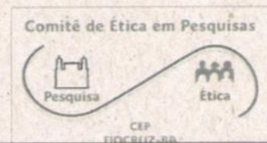
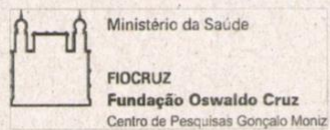
## Head circumference-for-age GIRLS

Birth to 13 weeks (percentiles)



WHO Child Growth Standards

## ANEXO 3 - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

### DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o protocolo CEP nº 486/2015, CAAE: 51889315.7.0000.0040, intitulado "Investigação do papel da infecção pelo vírus Zika na epidemia de recém-nascidos com microcefalia em Salvador-BA: um estudo de prevalência em gestantes e neonatos" de responsabilidade da pesquisadora Dra. Isadora Siqueira foi aprovado pelo Comitê de Ética do CPqGM/FIOCRUZ em 02/02/2016 conforme Parecer Consubstanciado nº 1.400.224.

Salvador, 04 de maio de 2016.

*Carlos Gustavo Regis da Silva*  
CARLOS GUSTAVO REGIS DA SILVA  
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-CPqGM/FIOCRUZ  
Carlos Gustavo Regis da Silva  
Pesquisador / FIOCRUZ  
SIAPE - 2628425

## ANEXO 4 – TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TCLE destinado ao responsável legal

#### INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

1. Instituto Gonçalo Moniz- Fiocruz, Salvador-BA
2. Maternidade de Referência Prof. José Maria de Magalhães Neto, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Salvador-BA
3. Instituto de Perinatologia da Bahia, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia.
4. Hospital Inácia Pinto dos Santos, Fundação hospitalar de Feira de Santana, Feira de Santana- Bahia
5. Departamento de Pediatria e Departamento de Neurociências e Saúde Mental - Faculdade de Medicina- Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA
6. Centro Estadual de prevenção e reabilitação da pessoa com deficiência (CEPRED) – Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, Salvador-BA

#### PROJETO:

Investigação do papel da infecção pelo vírus Zika na epidemia de recém-nascidos com microcefalia em Salvador-BA: um estudo de prevalência em gestantes e neonatos e seguimento de bebês com infecção congênita por vírus Zika.

#### PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Isadora Cristina de Siqueira: Telefone: 71-3176 2213/71-988013349

Como voluntário, seu filho (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizada em Salvador da Bahia, que tem como o objetivo entender mais sobre os vírus Zika, Chikungunya, e Dengue e a relação destes vírus com a infecção nas gestantes e nos recém-nascidos. Para isso, coletaremos um pouco de sangue do cordão umbilical do recém-nascido em que os responsáveis concordarem com a participação neste estudo. Convido seu filho(a) a participar deste estudo. Se concordar, nós solicitamos a sua aprovação para termos acesso aos dados constantes nos prontuários que estão com os médicos e enfermeiras desta unidade de saúde. Também solicitamos que nos forneça 5 ml de sangue do cordão umbilical (um colher de



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

chá), coletado pelos médicos na hora do parto e 5ml (uma colher de chá) de urina do recém-nascido e 2 ml (meia colher de chá) de saliva coletados nas primeiras 24 hs de vida.

Nós utilizaremos o sangue para testar a presença de anticorpos do recém-nascido para os vírus Zika, Dengue e Chikungunya e a urina e saliva para testar a presença do vírus Zika. A participação do seu filho (a) neste estudo não trará benefícios diretos a ele(a). Entretanto, o conhecimento obtido a partir desta pesquisa poderá contribuir para um melhor conhecimento em relação à infecção pelo Chikungunya, Zika e Dengue em gestantes e em recém-nascidos.

As etapas relatadas acima serão realizadas na maternidade de nascimento do seu filho (a). Na alta hospitalar ou posteriormente por telefone, seu filho (a) será encaminhado para acompanhamento com Pediatra e Neuropediatra no CEPRED ou na Faculdade de Medicina–UFBA. Este acompanhamento médico ocorrerá até seu filho (a) completar 2 anos e será solicitado que você leve ele/ela para as consultas aos 3 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses e 24 meses de idade e em outros momentos que for solicitado pelos profissionais de saúde que estiverem acompanhando seu filho (a).

Durante o acompanhamento nestas unidades serão aplicados questionários para avaliar o desenvolvimento cognitivo, motor e de linguagem do seu bebê. Ele (a) será encaminhado também para uma consulta com médico oftalmologista, para avaliar a visão do bebê e para a realização de uma audiometria, um exame que avalia a audição do bebê.

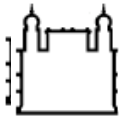
Nós solicitamos a sua aprovação para termos acesso aos dados constantes nos prontuários que estão com os médicos e enfermeiras destas unidades de saúde, assim como os resultados de exames de imagem (ultrassonografia, tomográfica ou ressonância magnética), exame de audiometria e avaliação oftalmológica que seu filho (a) realize no período do estudo. Também solicitamos que nos forneça 5 ml de sangue (uma colher de chá) nas visitas de 6 meses, 12 meses, 18 meses e 24 meses. Nós utilizaremos o sangue para testar a presença de anticorpos do bebê para os vírus Zika.

Os resultados dos exames do recém-nascido serão entregues ao laboratório da maternidade, onde você poderá retirá-los e também serão entregues ao Pediatra que entregará a você durante a consulta médica.

O senhor (a) poderá recusar a participar do seu filho (a) do estudo agora, ou em qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer constrangimento ou penalidade da instituição que está realizando este estudo.

A identidade do seu filho (a) será preservada e nenhum resultado obtido com esta pesquisa conterá o nome dele. Nós guardaremos os registros de cada indivíduo, em sala trancada, e somente o pesquisador responsável pela pesquisa e os médicos trabalhando na equipe terão acesso a estas informações. Cada indivíduo receberá um número para ser utilizado no laboratório. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, a identificação do paciente não será revelada, e confirmo que a seguinte informação constará nos artigos publicados: “Agradecemos a todos os pacientes que participaram desta pesquisa”. Os Resultados serão relatados de forma sumarizada e o indivíduo não será identificado.

O risco associado à coleta de sangue do recém-nascido é nulo, visto que a coleta de sangue será feita diretamente do cordão umbilical, a coleta de urina será por saco coletor externo e de saliva com passagem de swab (parece um cotonete) na boca, sendo assim, não causará desconforto para o recém-nascido. Estes procedimentos serão realizados conforme as normas vigentes desta



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Impressão datiloscópica:

Assinatura de testemunhas:

---

---

#### COMPROMISSO DO INVESTIGADOR

Eu discuti as questões acima apresentadas com os indivíduos participantes no estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e obrigações relacionadas a este projeto.

Salvador-BA, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura do investigador : \_\_\_\_\_

Dados do Pesquisador Responsável:

Nome: Dra. Isadora Cristina de Siqueira

Endereço: . Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-Ba, CEP 40295-001.

Telefones: (71) 3176-2213 ou (71) 98801-3349

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ/FIOCRUZ:**

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-BA, CEP: 40296-710, Telefone: 3176-2285.



## ANEXO 5 – CURVAS DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO

### RELAÇÃO PESO X IDADE GESTACIONAL



## Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus

Adriana Virginia Faiçal,<sup>1</sup> Juliana Cabral de Oliveira,<sup>2</sup> João Vitor Vieira Oliveira,<sup>2</sup> Breno Lima de Almeida,<sup>2</sup> Iluska Andrade Agra,<sup>1</sup> Luiz Carlos Junior Alcantara,<sup>2</sup> Angelina Xavier Acosta,<sup>1</sup> Isadora Cristina de Siqueira<sup>1,2</sup>

**To cite:** Faiçal AV, de Oliveira JC, Oliveira JW, et al. Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus. *BMJ Paediatrics Open* 2019;3:e000486. doi:10.1136/bmjpo-2019-000486

AXA and ICdS contributed equally.

Received 19 March 2019  
Accepted 5 June 2019



© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

<sup>1</sup>School of Medicine - Department of Pediatrics, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>2</sup>Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil

### Correspondence to

Dr Isadora Cristina de Siqueira, Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz Bahia, Salvador 40296-710, Bahia, Brazil; isadora.siqueira@bahia.fiocruz.br

### ABSTRACT

Neurodevelopment in 29 normocephalic children with in utero exposure to Zika virus (ZIKV) was evaluated by the Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition. Ten (35%) infants presented neurodevelopment delay. Language, cognitive and motor delays were identified in 9 (31%), 4 (14%) and 1 (3%) infants, respectively. Children exposed to ZIKV in utero must undergo careful evaluations for the early detection of any neurodevelopmental delays in order to implement prompt intervention.

### INTRODUCTION

Congenital Zika infection (CZI) was identified as a devastating consequence of Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy.<sup>1</sup> The clinical presentation of CZI is variable, including microcephaly, sensorineural hearing loss, visual impairment and arthrogryposis.<sup>2</sup> Moreover, a broad clinical spectrum of outcomes, including minor disorders, have also been identified.<sup>3</sup> Furthermore, late-onset microcephaly was reported in infants with confirmed CZI and normocephaly at birth.<sup>4</sup>

### METHODS

The present study aimed to investigate the neurodevelopment of non-microcephalic infants with intrauterine exposure to ZIKV who were born in Salvador, located in north-eastern Brazil, in an effort to contribute to the understanding of the broad spectrum of manifestations associated with this congenital infection.

Normocephalic infants were recruited from a previous CZI hospital surveillance programme,<sup>5</sup> if their serological testing or a quantitative PCR assay (RT-qPCR) for ZIKV was positive. Six (20%) of the newborns had ZIKV positivity by RT-qPCR and the others by serology. All their mothers had anti-ZIKV IgG positivity at the time of delivery. All infants were born during the 2016 ZIKV outbreak,

and all mothers reported ZIKV infection symptoms during pregnancy. Newborns were considered normocephalic if head circumference (HC) at birth measured within 2 SD for gestational age and sex, according to the INTERGROWTH-21 standards.<sup>6</sup>

Development was assessed using the Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition (BSID-III), which was previously validated for the Brazilian population.<sup>7</sup> An adjustment to the age at the time of testing was made to evaluate infants with prematurity. According to the BSID-III, deviations in an individual's composite score from the normative mean (100±15) are used to classify neurodevelopment as normal: within 1 SD of the mean (≥85); mild: -1 to -2 SD (≥70 and <85); moderate: -2 to -3 SD (≥55 and <70); or severe: more than 3 SD below the standard mean scores (<55).

Complementary evaluations included retinal mapping, refraction evaluation and the assessment of brainstem auditory evoked response. No neuroimaging was performed.

### PATIENT AND PUBLIC INVOLVEMENT

The present study did not include patient or public involvement.

### RESULTS

Thirty-one infants were enrolled and 29 infants were evaluated, as two were excluded due to hydrocephalus or genetic disorders. Of the total evaluated, 16 (55%) were male with a mean age of 18.2±3.8 months. All maternal and newborn sociodemographic data are presented in table 1.

Developmental assessment showed that 10 (34%) of the infants exhibited a delay in at least one of the BSID-III scale domains. Language delay was identified in 9 (31%)

**Table 1** Sociodemographic and clinical data of 29 children evaluated by the BSID-III, Salvador, Brazil

	n (%)
<b>Mothers</b>	
Mother's age (years)*	25±6.4
<b>Maternal schooling</b>	
Elementary	8 (27.6)
Secondary	20 (69.0)
University	1 (3.4)
<b>Marital status</b>	
Married	8 (27.6)
Single	21 (72.4)
<b>Household income (minimum monthly wage)</b>	
<1	13 (44.8)
1–3	14 (48.3)
>3	2 (6.9)
<b>Infants</b>	
Gestational age at birth* (weeks)	38.4±2.1
Prematurity	5 (17.2)
Birth weight (g)*	3060±573.5
Head circumference at birth (cm)*	33.5±1.8
Mean age at time of BSID evaluation (months)*	18.2±3.8
Male gender	16 (55.2)

\*Mean±SD; minimum monthly wage=SR954 (US\$=240). BSID-III, Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition.

infants, cognitive delay in 4 (14%) and motor delay in 1 (3%) child (table 2).

Regarding the nine infants who exhibited language impairment, one presented a severe delay, one had moderate delay and seven were classified as having mild delay. When analysing their respective scaled scores, 2 (22%) infants demonstrated an expressive ability below average.

Audiological evaluations were performed in 16 (55%) infants, who showed normal auditory conduction, including five of the infants with language delay.

Ophthalmological evaluations were performed in 23 (79%) infants, with no abnormalities identified. All HC were found to be within the normal range in accordance with age and gender.

## DISCUSSION

In this study, 10 (34%) normocephalic infants presented some type of neurodevelopmental delay. These findings corroborate results reported by a prospective cohort study in Rio de Janeiro that evaluated children by neuroimaging and the BSID-III, in which neurodevelopmental delays were observed in the cognitive, language and motor function domains.<sup>8</sup> Language function was found to be the most impaired domain among the children evaluated. Verbal abilities are known to be more sensitive to myelination in typical children, and children with language delays are reported to be at greater risk for below-average academic, social and emotional development, thereby compromising quality of life.<sup>9</sup>

This study suffers from some limitations, as the present design prevented us from establishing any causal relationships between exposure to ZIKV and developmental delay.

In conclusion, our evaluations identified abnormalities in neurodevelopmental outcome, especially language functioning, which should be confirmed by larger scale studies involving prospective cohorts and long-term follow-up. The systematic assessment of these children, through standardised tools, is crucial for the early detection of abnormal development, as well as to provide intervention to achieve best outcomes and prevent disabilities.

**Acknowledgements** The authors are grateful to the multidisciplinary team that evaluated the children in this study: Cristina Salles and Emilia Embrunçu (medical doctors); Lucas Oliveira Cardoso Reis and Nelfa Souza Ferreira (speech therapists); Marina Souza (psychologist); Maria Beatriz Cabral, Maria Isabel Viana and Érica D'Agostino (odontologists). Andris K Walter provided English language revision and manuscript copyediting assistance.

**Contributors** ICdS, AXA and LCJA contributed to study design, writing of the manuscript and data analysis. AVF, JCD, JWO, BLdA and IAA contributed to the enrolment of participants in the study, reviewed the medical records and clinical evaluations.

**Funding** CNPq-National Council for Scientific and Technological Development (443875/2018-9) and PPSUS/BA-FAPESB003/2017/SESAB/CNPq/MS (5125/2017).

**Table 2** Neurodevelopmental evaluations of 29 children with intrauterine exposure to ZIKV using the Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition (BSID-III), Salvador, Bahia, 2018

BSID-III domain	Mean score (SD)	Range	Categorisation of developmental delay, n (%)			
			Severe (score <55) −3 SD	Moderate (score 55–69) −2 SD/−3 SD	Mild (score 70–84) −1 SD/−2 SD	None (score ≥85) 1 SD
Cognitive	102.2±16.9	70–145	0	0	4 (13.8%)	25 (86.6%)
Language	93.8±18.5	47–135	1 (3.4%)	1 (3.4%)	7 (24.1%)	20 (69.1%)
Motor	103.5±12.0	79–127	0	0	1 (3.4%)	28 (96.6%)

BSID-III, Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition; ZIKV, Zika virus.

**Table 1** Sociodemographic and clinical data of 29 children evaluated by the BSID-III, Salvador, Brazil

	n (%)
<b>Mothers</b>	
Mother's age (years)*	25±6.4
<b>Maternal schooling</b>	
Elementary	8 (27.6)
Secondary	20 (69.0)
University	1 (3.4)
<b>Marital status</b>	
Married	8 (27.6)
Single	21 (72.4)
<b>Household income (minimum monthly wage)</b>	
<1	13 (44.8)
1–3	14 (48.3)
>3	2 (6.9)
<b>Infants</b>	
Gestational age at birth* (weeks)	38.4±2.1
Prematurity	5 (17.2)
Birth weight (g)*	3060±573.5
Head circumference at birth (cm)*	33.5±1.8
Mean age at time of BSID evaluation (months)*	18.2±3.8
Male gender	16 (55.2)

\*Mean±SD; minimum monthly wage=¥R954 (US\$–240). BSID-III, Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition.

infants, cognitive delay in 4 (14%) and motor delay in 1 (3%) child (table 2).

Regarding the nine infants who exhibited language impairment, one presented a severe delay, one had moderate delay and seven were classified as having mild delay. When analysing their respective scaled scores, 2 (22%) infants demonstrated an expressive ability below average.

Audiological evaluations were performed in 16 (55%) infants, who showed normal auditory conduction, including five of the infants with language delay.

Ophthalmological evaluations were performed in 23 (79%) infants, with no abnormalities identified. All HC were found to be within the normal range in accordance with age and gender.

## DISCUSSION

In this study, 10 (34%) normocephalic infants presented some type of neurodevelopmental delay. These findings corroborate results reported by a prospective cohort study in Rio de Janeiro that evaluated children by neuroimaging and the BSID-III, in which neurodevelopment delays were observed in the cognitive, language and motor function domains.<sup>8</sup> Language function was found to be the most impaired domain among the children evaluated. Verbal abilities are known to be more sensitive to myelination in typical children, and children with language delays are reported to be at greater risk for below-average academic, social and emotional development, thereby compromising quality of life.<sup>9</sup>

This study suffers from some limitations, as the present design prevented us from establishing any causal relationships between exposure to ZIKV and developmental delay.

In conclusion, our evaluations identified abnormalities in neurodevelopmental outcome, especially language functioning, which should be confirmed by larger scale studies involving prospective cohorts and long-term follow-up. The systematic assessment of these children, through standardised tools, is crucial for the early detection of abnormal development, as well as to provide intervention to achieve best outcomes and prevent disabilities.

**Acknowledgements** The authors are grateful to the multidisciplinary team that evaluated the children in this study: Cristina Salles and Emilia Embrinçu (medical doctors); Lucas Oliveira Cardoso Reis and Nelífa Souza Ferreira (speech therapists); Marina Souza (psychologist); Maria Beatriz Cabral, Maria Isabel Viana and Érica D'Agostino (odontologists). Andris K Walter provided English language revision and manuscript copyediting assistance.

**Contributors** ICdS, AXA and LCJA contributed to study design, writing of the manuscript and data analysis. AVF, JCD, JWO, BLdA and IAA contributed to the enrolment of participants in the study, reviewed the medical records and clinical evaluations.

**Funding** CNPq-National Council for Scientific and Technological Development (443875/2018-9) and PPSUS/BA-FAPESB003/2017/SESAB/CNPq/MS (5125/2017).

**Table 2** Neurodevelopmental evaluations of 29 children with intrauterine exposure to ZIKV using the Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition (BSID-III), Salvador, Bahia, 2018

Categorisation of developmental delay, n (%)						
BSID-III domain	Mean score (SD)	Range	Severe (score <55) –3 SD	Moderate (score 55–69) –2 SD/–3 SD	Mild (score 70–84) –1 SD/–2 SD	None (score ≥85) 1 SD
Cognitive	102.2±16.9	70–145	0	0	4 (13.8%)	25 (86.6%)
Language	93.8±18.5	47–135	1 (3.4%)	1 (3.4%)	7 (24.1%)	20 (69.1%)
Motor	103.5±12.0	79–127	0	0	1 (3.4%)	28 (96.6%)

BSID-III, Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition; ZIKV, Zika virus.

**IGM**

**JULIANA MENEZES GOMES CABRAL DE OLIVEIRA**

**Características clínicas de crianças normocefálicas expostas ao vírus zika no período gestacional**

**2020**