



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**ZIKA VÍRUS E GRAVIDEZ:
ACHADOS FETAIS AVALIADOS PELO ULTRASSOM E DOPPLER E SUA
ASSOCIAÇÃO COM O DESFECHO PERINATAL**

José Paulo Pereira Júnior

**Rio de Janeiro
Maio de 2019**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**ZIKA VÍRUS E GRAVIDEZ:
ACHADOS FETAIS AVALIADOS PELO ULTRASSOM E DOPPLER E SUA
ASSOCIAÇÃO COM O DESFECHO PERINATAL**

José Paulo Pereira Júnior

**Tese apresentada à Pós-
graduação do curso de
Doutorado em Pesquisa
Aplicada à Saúde da Criança e
da Mulher do Instituto Nacional
da Mulher, da Criança e do
Adolescente Fernandes
Figueira, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.**

ORIENTADORES: MARIA ELISABETH LOPES MOREIRA

PAULO ROBERTO NASSAR DE CARVALHO

**Rio de Janeiro
Maio de 2019**

Pereira Júnior, José Paulo.

**ZIKA VÍRUS E GRAVIDEZ: ACHADOS FETAIS AVALIADOS PELO
ULTRASSOM E DOPPLER E SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESFECHO
PERINATAL** / José Paulo Pereira Júnior. Rio de Janeiro, 2019.
100 f.

Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Nacional da Mulher, da
Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro – RJ, 2019

Orientadores: Maria Elisabeth Lopes Moreira e
Paulo Roberto Nassar de Carvalho

Bibliografia: Inclui Bibliografias

1.Zika. 2.Ultrassom 3. Doppler 4. Malformações 5.Perinatal
6. Desfecho 7. Infecções congênitas I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais José Paulo (*in memoriam*) e Vanda,
meus exemplos de dedicação ao trabalho e responsabilidade familiar,
aos meus sogros Murillo e Nara pelo estímulo
acadêmico incessante nesses trinta anos de convivência,
a Bruno Mühlmann Holanda pelas conversas científicas sempre instigantes,
à minha esposa Andréa e meus filhos Matheus e Gabriela
pela compreensão e parceria nessa longa jornada,
e ao amigo e Mestre Hermógenes Chaves Netto,
por me ensinar Obstetrícia e me estimular a trabalhar com Pesquisa Clínica.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora Doutora Maria Elisabeth Lopes Moreira, pelo companheirismo, apoio e estímulo nesses três anos de trabalho,

Ao meu orientador Professor Doutor Paulo Roberto Nassar de Carvalho, por acreditar e me ajudar a realizar esse projeto,

Aos colegas do Instituto Fernandes Figueira, administrativos, enfermeiros e médicos, que não pouparam esforços durante a epidemia de Zika, contribuindo para mitigar o sofrimento das nossas pacientes,

Um agradecimento especial aos doutores Renan Cardozo, Helena do Valle, Beatriz Dutra e Helder Dotta, colegas competentes e dedicados no atendimento das nossas pacientes, durante a epidemia,

À Professora Doutora Patrícia Brasil, pelo convite para desenvolver esse trabalho colaborativo interinstitucional e pelos ensinamentos na área da Infectologia,

À Professora Doutora Karin Nielsen-Saines pelo carinho, excelência e amizade, ao nos auxiliar na elaboração, organização e divulgação das pesquisas,

Meus sinceros agradecimentos à Professora Doutora Stephanie Gaw, pela parceria incondicional e apoio intelectual na construção desse trabalho.

RESUMO

A infecção congênita pelo vírus Zika (ICZ) produz um amplo espectro de complicações perinatais, destacando-se as anomalias estruturais. A associação de achados ultrassonográficos pré-natais (USO) com outros desfechos perinatais adversos, não foi descrita até o momento. Identificamos também um grupo de gestantes cujos conceitos apresentam anomalias estruturais suspeitas de ICZ, porém sem diagnóstico etiológico. Desenvolvemos duas linhas de trabalho. **O primeiro trabalho** teve como **objetivo** determinar se os resultados dos exames de ultrassom (USO) e dopplervelocimetria (doppler) realizados durante o pré-natal estavam associados a desfechos neonatais anormais em gestações afetadas pelo ZIKV. **Desenho:** recorte de um estudo de coorte prospectiva realizado em um único centro de referência no Rio de Janeiro, entre 01 de setembro de 2015 a 31 de maio de 2016, envolvendo 92 gestantes, portadoras de fetos únicos, infectadas pelo vírus ZIKV, com diagnóstico confirmado por exame de transcriptidase reversa aplicada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). **Medidas:** como desfecho primário, utilizamos o resultado neonatal adverso composto (RNAC) (morte perinatal, achados anormais no exame neonatal ou achados anormais na neuroimagem pós-natal). Os desfechos secundários incluíram a associação de achados específicos com desfechos neonatais. **Resultados:** Entre as 92 gestantes e seus conceitos, 55 (60%) apresentaram resultados normais e 37 (40%) resultados anormais nos exames USO. Dos 45 recém-nascidos (RN) com RNAC, 23 (51%) apresentaram resultados normais ao USO. Onze gestantes (12%) apresentaram resultados anormais no exame neonatal (odds ratio ajustado [aOR], 11,6; IC 95%, 1,8-72,8), na neuroimagem pós-natal (aOR, 6,7, IC 95%, 1,1-38,9) e RNAC (aOR, 27,2; IC 95%, 2,5-296,6). Resultados anormais no doppler da artéria cerebral média foram associados a anormalidades do exame neonatal (aOR, 12,8; 95% CI, 2,6-63,2), na neuroimagem pós-natal (aOR, 8,8; IC 95%, 1,7-45,9) e no RNAC (aOR, 20,5; 95% CI, 3,2-132,6). Houve 2 mortes perinatais. Achados anormais no USO pré-natal tiveram uma sensibilidade de 48,9% (IC95%, 33,7%-64,2%) e uma especificidade de 68,1% (IC95%, 52,9%-80,1%) quando associados com os RNAC. Para um resultado normal no USO pré-natal, a sensibilidade foi menor (22,2%; IC95%, 11,2%-37,1%), mas a especificidade foi maior (97,9%; IC95%, 88,7%-99,9%). **Conclusão:** Resultados anormais nos exames de USO e doppler em gestantes infectadas pelo ZIKV, foram associados a RNAC. Resultados normais no USO pré-natal não estiveram associadas a um desfecho neonatal normal. Frente aos resultados encontrados, recomendamos avaliação completa para todos os RNs expostos ao ZIKV. **O segundo trabalho objetivou** analisar o comprometimento fetal, utilizando a amniocentese, em gestantes portadoras de fetos com alterações estruturais suspeitas ao USO de ICZ, sem diagnóstico prévio da etiologia. **Desenho:** estudo de casos que incluiu 16 pacientes. A **exposição:** amniocentese para realização de RT-PCR para toxoplasmose, ZIKV e citomegalovírus; foi também oferecido cariótipo fetal. **Resultados:** o exame detectou 7/9 (78%) casos de ICZ; 2 RNs foram diagnosticados após o nascimento. O diagnóstico etiológico foi realizado em 63% dos casos (10/16). **Conclusão:** a amniocentese foi uma importante ferramenta para diagnosticar ICZ, TORCH e aneuploidias, permitindo o aconselhamento parental adequado, e a programação da assistência perinatal.

ABSTRACT

Congenital infection with the Zika virus (ICZ) produces a broad spectrum of perinatal abnormalities, including structural defects. The association of prenatal ultrasonographic findings (USO) with adverse perinatal outcomes has not been described so far. We also identified a group of pregnant women whose concepts have structural abnormalities suspected of having ICZ, but without an etiological diagnosis. We have developed two lines of work: The **aim** of the **first study** was to determine if the results of ultrasound and Doppler examinations performed during prenatal care were associated with abnormal neonatal outcomes in pregnancies affected by ZIKV. Design: a prospective cohort study conducted in a single referral center in Rio de Janeiro, between September 1, 2015 and May 31, 2016, involving 92 pregnant women with single fetuses infected with the ZIKV virus, diagnosed confirmed by reverse transcriptase examination applied to the polymerase chain reaction (RT-PCR). **Measurements:** As a primary endpoint, we used composite adverse neonatal outcome (RNAC) (perinatal death, abnormal findings on neonatal examination or abnormal findings in postnatal neuroimaging). Secondary outcomes included the association of specific findings with neonatal outcomes. **Results:** Among the 92 pregnant women and their concepts, 55 (60%) presented normal results and 37 (40%) had abnormal results in USO exams. Of the 45 newborns (NB) with RNAC, 23 (51%) presented normal results to the USO. Eleven pregnant women (12%) presented abnormal results in the neonatal exam (adjusted odds ratio [aOR], 11.6, 95% CI, 1.8-72.8), postnatal neuroimaging (aOR, 6.7, CI 95%, 1,1-38,9) and RNAC (aOR, 27.2, 95% CI, 2.5-296.6). Doppler abnormalities of the middle cerebral artery were associated with abnormalities of the neonatal examination (aOR, 12.8, 95% CI, 2.6-63.2), postnatal neuroimaging (aOR, 8.8, 95% CI, , 1.7-45.9) and RNAC (aOR, 20.5, 95% CI, 3.2-132.6). There were 2 perinatal deaths. Abnormal findings in prenatal USO had a sensitivity of 48.9% (95% CI, 33.7% - 64.2%) and a specificity of 68.1% (95% CI, 52.9% - 80.1%) when associated with RNACs. For a normal result in prenatal USO, the sensitivity was lower (22.2%, 95% CI, 11.2% -37.1%), but the specificity was higher (97.9%, 95% CI, 88, 7% -99.9%), in relation to RNAC. **Conclusion:** Abnormal results in USO and Doppler tests in pregnant women infected with ZIKV were associated with neonatal adverse outcomes. Normal results in prenatal USO were not associated with a normal neonatal outcome. In view of the results found, we recommend a complete evaluation for all NBs exposed to ZIKV. The **second study** aimed to analyze the fetal impairment, using amniocentesis, in pregnant women with fetuses with structural alterations suspected by USO, without previous diagnosis of the etiology. **Design:** case study involving 16 patients. **Exposure:** amniocentesis for the realization of RT-PCR for toxoplasmosis, ZIKV and cytomegalovirus; fetal karyotype was also offered. **Results:** the examination detected 7/9 (78%) cases of ICZ; 2 RNs were diagnosed after birth. The etiological diagnosis was performed in 63% of the cases (10/16). **Conclusion:** amniocentesis was an important tool to diagnose ICZ, TORCH and aneuploidies, allowing adequate parental counseling, and programming perinatal care.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACM – Artéria cerebral média
- AUmb – Artéria umbilical
- CA – Circunferência abdominal
- CC – Circunferência cefálica
- CCN – Comprimento cabeça-nádega
- CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
- CDPI – Centro de Diagnóstico Por Imagem
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- CER – Diâmetro transverso do cerebelo
- CIUR – Crescimento intrauterino restrito
- CKGV – vírus Chikungunya
- CM – Cisterna magna
- CMV – Citomegalovírus
- DBP – Diâmetro biparietal
- DENV – vírus da Dengue
- Doppler – Dopplervelocimetria
- DSV – Defeito do septo ventricular do coração
- DV – Ducto venoso
- EUA – Estados Unidos da América
- F – Fêmur
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- HFNI – Hidropsia fetal não imune
- HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida
- HSV – Vírus Herpes simplex tipos I e II
- ICO – Infecção congênita
- ICZ – Infecção congênita pelo vírus Zika
- IFF – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira
- INI – Instituto Nacional de Infectologia
- ISUOG - *International Society for Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*

MBV – Maior bolsão vertical

MCP - Microcefalia

mm – milímetros

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB19 – Parvovirus B19

PI – Índice pulsátil

PVS – pico de velocidade sistólica máxima

RM – Ressonância magnética

RT-PCR – *Reverse transcriptidase polimerase chain reaction*

SGB – Síndrome de *Guillan-Barré*

SNC – Sistema Nervoso Central

SPS- Sífilis primária e secundária

STORCH – Acrônimo para Sífilis, Toxoplasmose, Outras infecções, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes

TC – Tomografia computadorizada

TN – Translucência nugal

TORCH – Acrônimo para Toxoplasmose, Outras infecções, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes

TOX - Toxoplasmose

U - Úmero

USTF – Ultrassom transfontanela

USO – ultrassom obstétrico

Vp – corno posterior do ventrículo cerebral lateral

VZV – Vírus Varicela Zoster

ZIKV – Vírus Zika

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Referencial Teórico.....	15
2.1- A História da epidemia pelo vírus Zika.....	15
2.2- O vírus Zika, a Dengue e a Chikungunya.....	16
2.3- Ultrassom, Doppler e infecções congênitas.....	19
2.3.1- Citomegalovírus.....	22
2.3.2- Parvovirus B19.....	23
2.3.3- Toxoplasma gondii.....	24
2.3.4- Treponema pallidum.....	25
2.3.5- Herpes simplex.....	28
2.4- Amniocentese e infecções congênitas.....	30
3- Justificativa.....	32
4- Objetivos.....	39
4.1- Objetivo principal.....	39
4.2- Objetivos específicos.....	39
5- Métodos.....	41
5.1- Local do estudo.....	41
5.2- Delineamento do estudo.....	41
5.2.1- Pacientes com idade gestacional abaixo de 20 semanas.....	42
5.2.2- Pacientes com idade gestacional entre 20 e 29 semanas.....	43
5.2.3- Pacientes com idade gestacional acima de 29 semanas.....	44
5.3- Critérios de Inclusão.....	46
5.4- Critérios de exclusão.....	46
5.5- Diagnóstico por imagem.....	46
5.6- Exames laboratoriais.....	47
5.7- Análise estatística.....	47
5.8- Aspectos éticos.....	47
5.9- Fontes de financiamento.....	48
6- Artigos publicados.....	49
7- Considerações finais.....	83
8- Anexo 1.....	87
9- Referências bibliográficas.....	88

1- INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovirus que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. A infecção em humanos produz uma doença febril autolimitada, onde na fase aguda o paciente apresenta febre, dor de cabeça, mialgia e exantema, muito semelhante com a sintomatologia de outros arbovírus como o vírus Dengue (DENV) e o vírus Chikungunya (CKGV). Após a primeira detecção do vírus, em 1947, durante um programa de vigilância da febre amarela em Uganda, poucos relatos da doença foram comunicados até 2007, quando houve um grande surto na Micronésia Francesa⁽¹⁾. Em outubro de 2013, uma importante epidemia ocorreu na Polinésia Francesa, onde 396 casos confirmados laboratorialmente foram relatados. Até o momento, para o ZIKV, duas principais linhagens foram descritas, a Africana e a Asiática⁽²⁾.

Uma porção substancial de infecções por ZIKV é subclínica, quando os sinais e sintomas da doença são considerados moderados e autolimitados, e ainda, um número significativo de pacientes podem apresentar-se assintomáticos. Entretanto, foi descrita uma forte associação entre o surto de ZIKV e aumento do número de casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB) na Polinésia Francesa⁽³⁾, apontando uma primeira complicação importante resultante da infecção pelo ZIKV. Durante a mesma epidemia, pesquisadores relataram dois casos de complicações neonatais, após diagnóstico de infecção materna no terceiro trimestre⁽⁴⁾. Em outubro de 2015, o Ministério da Saúde do Brasil reporta o aumento dos casos de microcefalia demonstrando a importância do seu monitoramento com o objetivo de minimizar os possíveis prejuízos para gestantes, fetos ou recém-nascidos.

A primeira transmissão autóctone no Brasil foi observada em pacientes do Rio Grande do Norte, onde a sequência de um fragmento de proteína do

envelope revelou alta identidade com sequências de ZIKV linhagem asiática⁽⁵⁾. Em 15 de maio de 2015, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou a circulação de ZIKV no país, após a identificação em 16 amostras (oito da Bahia e oito no Rio Grande do Norte) pelo Laboratório de Referência Nacional.⁽⁵⁾ Os sintomas descritos mais comuns foram artralgia, edema das extremidades, febre ligeira, dor de cabeça, dor retro orbital, hiperemia conjuntival e erupções cutâneas maculopapulares muitas vezes espalhando do rosto para os membros, além de prurido, tonturas, mialgia e desordens digestivas.

No mesmo período, o Brasil estava sendo confrontado com o aumento do número de casos de recém-nascidos apresentando microcefalia⁽⁶⁾. Retrospectivamente, a anamnese das parturientes, revelou para algumas mulheres, episódios de doença febril e lesão exantemática durante a gravidez. Considerando a situação epidemiológica e os conhecimentos científicos na época, a hipótese da relação causal entre a infecção pelo ZIKV e a anomalia congênita começou a ser formulada.

As repercussões da infecção pelo ZIKV ainda não estão totalmente compreendidas, mas sabe-se que a presença do vírus no soro permitindo a detecção de RNA viral ocorre por tempo limitado. Existe excreção do vírus através do sêmen, leite humano, saliva e na urina^(7,8).

A patogênese da lesão no sistema nervoso central (SNC) causada pelas infecções virais congênitas ainda é desconhecida e complexa. Múltiplos mecanismos, agindo de maneira isolada ou em conjunto, têm sido propostos, tais como: ação de produtos de genes virais se comportando como agentes “teratogênicos”, interferência na morfogênese e na diferenciação celular normal atuando e modificando o ciclo celular, incluindo os mecanismos de apoptose,

indução da fragmentação cromossômica em sítios específicos, alteração da resposta inflamatória do hospedeiro potencializando a injúria causada diretamente pelo vírus no SNC, resposta imune materna não eficaz em controlar a infecção e a possibilidade de impacto direto da infecção na função placentária^(9,10).

A recente epidemia de Zika em nosso país, revelou uma situação inédita na literatura: a relação entre mulheres grávidas infectadas pelo vírus Zika e a presença de microcefalia na sua prole. A fase de viremia é transitória e curta, o que limita a aplicação dos testes moleculares para identificação de casos de infecção por ZIKV que já tenham ultrapassado a fase aguda. Os testes sorológicos são baseados na detecção de IgM e/ou IgG em diferentes amostras biológicas e têm a grande vantagem de ampliar o período de diagnóstico, após o início dos sintomas. Porém, a possibilidade de reação cruzada com outras arboviroses, a despeito dos avanços tecnológicos, ainda limita a sua utilização na prática clínica.⁽¹¹⁾

O objetivo inicial desse trabalho foi o de estudar os fetos com diagnóstico confirmado de infecção pelo ZIKV, através da positividade do teste de *reverse-transcriptase-polimerase-chain-reaction* (RT-PCR) em tecidos maternos ou fetais, coletados no período perinatal, utilizando o ultrassom para avaliar a anatomia e o ritmo de crescimento, e a dopplervelocimetria para analisar a hemodinâmica, buscando padrões de alterações estruturais e circulatórias e sua associação com o desfecho perinatal. Um segundo objetivo esteve focado na tentativa de melhorar o diagnóstico em um grupo de fetos cujas mães não foram testadas para a infecção pelo ZIKV por não terem apresentado sintomatologia da doença, pacientes assintomáticas, ou porque perderam a janela ideal para

coleta de tecidos maternos, urina e/ou sangue até 21 dias após o início dos sintomas, mas cujos fetos apresentaram anomalias estruturais suspeitas. Para tanto, oferecemos a amniocentese guiada por ultrassom, exame que permite a coleta de líquido amniótico durante a gestação, para a realização do exame de RT-PCR diretamente neste tecido, buscando o diagnóstico da infecção pelo ZIKV ou de outros microrganismos, além do cariótipo fetal quando indicado.

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1- A História da epidemia pelo vírus Zika

O vírus Zika, foi pela primeira vez isolado em um macaco Rhesus que se apresentava febril, encontrado na floresta de Zika, em Uganda, no ano de 1947. Cinco anos depois, no mesmo país, um homem com quadro febril apresentou confirmação da presença do ZIKV em seu sangue⁽¹²⁾. Casos isolados de transmissão para humanos foram identificados nas décadas de 50 e 60, na África Subsaariana. Cinco décadas se passaram para que a expansão do vírus se estendesse na direção da Ásia. A primeira grande epidemia relacionada ao ZIKV no mundo aconteceu em 2007, no arquipélago Yap, na Micronésia Francesa⁽¹³⁾. Com uma população estimada de 7.500 habitantes, exames laboratoriais detectaram taxa de infecção em 73% dos habitantes com idade igual ou maior que 3 anos. Entre os anos de 2013 e 2014, uma nova epidemia acometeu os habitantes dos 5 arquipélagos da Polinésia Francesa, onde, com uma população estimada de 270.000 habitantes, 11% (aproximadamente 28.000 pessoas) foram identificados como tendo tido a infecção pelo vírus Zika⁽¹⁴⁾.

Nas Américas, o primeiro caso autóctone, aquele contraído no próprio local, foi notificado no Chile, em fevereiro de 2014, em um habitante das Ilhas Galápagos⁽¹⁵⁾. No Brasil, o primeiro caso de infecção pelo vírus Zika foi confirmado em maio de 2015 pela Secretaria Estadual da Saúde da Bahia, a partir dos relatos do que se acreditava ser uma variante da Dengue, onde as pessoas apresentavam quadro de febre baixa, mal-estar, conjuntivite não purulenta, cefaleia, artralgia, mialgia e cansaço. Em outubro de 2015, médicos do estado de Pernambuco observaram um aumento significativo no número de

casos de microcefalia na cidade de Recife, comunicando às autoridades estaduais⁽¹⁶⁾. A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde foi então contatada pelo governo pernambucano, enviando um grupo para investigação. No mês de novembro, o laboratório de *Flavivirus* da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) identificou a presença de ZIKV em duas amostras de líquido amniótico, enviadas do estado da Paraíba, colhidas na cidade de Campina Grande, de gestantes cujos fetos apresentavam microcefalia e outras alterações no sistema nervoso central (SNC) diagnosticadas pelo ultrassom⁽¹⁷⁾. Uma força tarefa foi então montada pelo Governo Federal, resultando na publicação de dois protocolos, um de Vigilância e outro de Assistência, no mês de dezembro de 2015. No final deste ano, as 5 regiões do Brasil contabilizavam casos suspeito de ZIKV, com destaque para as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste.

2.2- O vírus Zika, a Dengue e a Chikungunya

O ZIKV é um flavivirus da família *Flaviviridae*, do tipo RNA, que possui 2 linhagens identificadas até o momento, a africana e a asiática. Ele é um arbovirus, semelhante a outros flavivirus como os vírus da Dengue (DENV) e da Febre amarela, e a um alfavirus, o vírus Chikungunya (CKGV), necessitando de um vetor para sua disseminação^(18,19). A expansão global dessas arboviroses nos últimos cinquenta anos foi precedida pela vigorosa disseminação de vetores, cabendo à espécie *Aedes*, representada principalmente pelo *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, papel de destaque. O *A. aegypti* originário da África, se distribui por toda a faixa tropical do globo. O *A. albopictus* é inicialmente identificado como originário das florestas asiáticas, e embora presente nas áreas tropicais,

consegue se reproduzir em áreas subtropicais⁽²⁰⁾. No Brasil, o *Aedes aegypti* tem sido o principal vetor associado à disseminação da epidemia. A fêmea do *Aedes* necessita de sangue para sua nutrição e para completar seu ciclo reprodutivo. Após o acasalamento, a fêmea do mosquito coloca seus ovos em receptáculos com água limpa, que eclodem ao final de 7 dias, dando origem a larvas que evoluirão para as formas adultas entre três e quatro semanas.

O *Aedes aegypti* já foi associado a outra epidemia no Brasil, a da Febre amarela, enfrentada por Oswaldo Cruz há mais de um século. Na época, um dos pilares para se combater a doença, consistia na erradicação dos criadouros do mosquito, o que acarretou, na prática, seu desaparecimento. Na década de 40, com o incremento da urbanização, industrialização e também da favelização das nossas cidades, o mosquito novamente encontrou condições sanitárias favoráveis à sua disseminação.

Na década de 70, o *Aedes aegypti* foi responsável pela propagação da Dengue na região norte do país, e quinze anos depois, praticamente em todo o território nacional. Habitualmente a DENV está associada à febre alta, dor retro ocular e importante queda do estado geral, percebida por 3 a 5 dias. Possui como principal complicação a forma hemorrágica que pode levar ao óbito se medidas de cuidados intensivos não forem adotadas.

O diagnóstico desta virose pode ser realizado através da técnica de PCR e por pesquisa da proteína NR-1, praticadas em amostras de sangue, durante a fase sintomática da doença⁽¹¹⁾. Existe também a possibilidade do diagnóstico sorológico, através da pesquisa de imunoglobulinas das classes “G” e “M”, após 10 a 14 dias do início dos sintomas. Existe uma dificuldade técnica para a utilização de testes sorológicos em regiões onde coexistem as infecções pela

DENV e o ZIKV, devido a possibilidade de reação cruzada no resultado das sorologias entre estas duas arboviroses^(21,22).

A CKGV, que em um dialeto africano significa “andar dobrado sobre suas próprias costas”, foi introduzida no Brasil em 2015, e tem como principal característica a dor e o edema articular que habitualmente duram uma semana, mas que podem perdurar por mais de 6 meses. Seu diagnóstico laboratorial pode ser realizado através das análises sorológicas ou pela técnica de PCR. Embora a CKGV seja considerada uma doença com evolução benigna, chama a atenção o grande impacto econômico negativo que esta virose trouxe para algumas regiões onde aconteceram epidemias, com a perda significativa da arrecadação de tributos, secundária ao afastamento das pessoas infectadas de suas atividades laborativas por longos períodos.

Em relação à infecção pelo ZIKV é interessante salientar, ainda, que até 2007, foram descritos casos esporádicos na África e Ásia, sendo considerada uma infecção relativamente benigna, não trazendo complicações ou mesmo risco de vida para as pessoas infectadas. Entretanto, durante a epidemia na Polinésia Francesa entre os anos de 2013 e 2014, foi observado um aumento na incidência de casos da Síndrome de Guillain-Barré (SGB) entre pessoas jovens e adultas^(11,13). A SGB se caracteriza por uma polirradiculite aguda que afeta simetricamente as raízes nervosas espinhais e com frequência também as raízes nervosas cranianas, sendo ocasionalmente precedida por uma doença infecciosa. Manifesta-se inicialmente por um quadro de fraqueza que se evidencia quase sempre nas extremidades inferiores e ascende então para o resto do corpo, acompanhada da perda de reflexos tendinosos e pequenos déficits sensitivos ou sensoriais. A forma aguda pode causar paralisia

respiratória transitória necessitando de ventilação artificial em uma unidade de tratamento intensivo, mas ainda assim tem um bom prognóstico. Durante esta epidemia não foram descritas complicações para mulheres grávidas e recém-nascidos filhos de mães infectadas.

2.3 – Ultrassom, Dopplervelocimetria e Infecções Congênitas

Infecções congênitas (ICO) podem ser responsáveis por doenças fetais com diferentes graus de comprometimento, estando também associadas à presença de sequelas no período neonatal, contribuindo para o aumento da morbiletalidade perinatal. Em 1971, foi proposto o termo TORCH, acrônimo das palavras Toxoplasmose (TOX), Outras, Rubéola, Citomegalovírus (CMV) e Herpes simplex (HSV), para designar um grupo de ICO que possuíam características similares ⁽²³⁾. Nessa época, a Sífilis era representada pela letra “O”, juntamente com outros microrganismos de menor relevância. Com o aumento do número de casos de Sífilis na última década, o acrônimo foi modificado para STORCH, reservando a letra “O” para outros microrganismos, capazes de produzir dano fetal. Atualmente, novos microrganismos foram incluídos nesse grupo: vírus da imunodeficiência humana (HIV), parvovirus B19 (PB19), os vírus das hepatites B e C, enterovírus, varicela (VZV), leptospiras além do ZIKV.⁽²⁴⁾

Sabemos que a prevalência de ICO varia segundo aspectos geográficos, climáticos, econômicos e étnicos. Não existe uma proposta universal para o rastreio dessas infecções em grávidas. Na Suíça, o rastreio para TOX foi abandonado em 2015, após a constatação que a prevalência da doença era extremamente baixa. Na Bélgica e na Holanda, países europeus com elevados

índices de desenvolvimento humano (IDH), utilizando dados governamentais, pesquisadores apresentaram os resultados do impacto das infecções congênitas por TOX e CMV, na Bélgica, e TOX, na Holanda, para a saúde pública desses países, utilizando metodologia estatística complexa e sofisticada.^(25,26) Embora geograficamente próximos, os resultados encontrados permitiram melhorar o planejamento das políticas públicas em relação a essas ICO. Assim, observamos a importância da realização de estudos nacionais ou regionais, com o objetivo de melhor avaliar a relação custo-efetividade dessas intervenções. No Brasil, segundo orientação do Ministério da Saúde, os exames para TOX, HIV, Sífilis e Hepatite B devem ser oferecidas a todas as gestantes na primeira consulta de Pré-Natal.⁽²⁷⁾

Quando utilizamos o ultrassom como exame de rastreio para complicações fetais, a partir de achados anormais na anatomia fetal, no ritmo de crescimento do concepto, em alterações na placenta e/ou no líquido amniótico, podemos suspeitar da presença de ICO. A literatura aponta alguns marcadores ultrassonográficos, que isoladamente ou em conjunto, orientam à realização do painel STORCH, objetivando melhorar o diagnóstico, citando como exemplos: crescimento intrauterino restrito (CIUR), poli- e oligodrâmnio, morte intrauterina, defeito de septo ventricular (DSV), translucência nucal (TN) alterada, ventriculomegalia cerebral, hidrocefalia, intestino hiperecogênico, cardiomegalia, hidropsia fetal não imune (HFNI), ascite, derrame pericárdico, derrame pleural, placentomegalia, calcificações hepáticas ou cerebrais e microcefalia (MCP).

Novamente existe uma discussão sobre a indicação e o custo-efetividade da aplicação do painel STORCH em gestantes com fetos apresentando alterações ultrassonográficas suspeitas. Assim, Alexandra e colaboradores⁽²⁴⁾

estudaram retrospectivamente os resultados do painel STORCH solicitados após o diagnóstico de anomalias fetais ao ultrassom, para gestantes e recém-nascidos (RN). Entre 2008 e 2012, identificaram 10.729 nascimentos na área de influência do Hospital Universitário de Basel, onde 392 gestações apresentaram alterações suspeitas de ICO (3.7%). O painel incluiu a pesquisa para os seguintes microrganismos: CMV, PB19, enterovírus, VZV, Borrelia, HSV, Leptospira, Sífilis, TOX e Rubéola. Estudando os casos de CMV, diagnosticaram 7 gestantes positivas para 4 fetos infectados; PB19 apresentou 6 infecções maternas para 3 fetos infectados; para enterovírus e VZV, 1 gestante infectada para cada doença e nenhum feto acometido, e para as demais infecções o rastreio materno foi negativo. Yamamoto e colaboradores⁽²⁸⁾ estudaram, no Japão, uma população de fetos com diagnóstico de CIUR, realizando ultrassom e painel STORCH, em 319 gestantes e seus conceptos, incluindo 26 casos de gestações múltiplas. Encontraram 17 casos (6%) de infecção materna pelo HSV cujos fetos não apresentaram ICO. Entre os 6 casos de infecção materna pelo CMV, 3 fetos apresentavam sinais de ICO ao ultrassom. A aplicação do painel nos RN revelou 6 crianças infectadas onde 3 mães apresentaram sorologias negativas. Em 246 gestantes com CIUR isolado, sem anomalias estruturais ou cromossômicas, 2 RNs apresentaram positividade para CMV. Ambos os estudos chamam a atenção para a necessidade de se reavaliar a inclusão sistemática da pesquisa do CMV durante o Pré-Natal, e o estudo suíço acrescenta a inclusão da pesquisa do PB19.

Algumas peculiaridades envolvem microrganismos causadores de ICO relacionadas às STORCH, devido à sintomatologia materna ausente ou inespecífica, dificultando seu diagnóstico.

2.3.1 – Citomegalovírus

O CMV humano é um beta herpesvirus presente em todo o mundo, apresentando a prevalência para ICO, durante a infecção primária de 30 a 40%, e na infecção chamada não primária, por reativação ou reinfecção, em torno de 0.2 a 2.0% dos casos. A infecção perinatal pode ser assintomática ou estar associada à perda da audição, deficiência visual e déficits cognitivos e motores.⁽²⁹⁾ Enders e colaboradores⁽³⁰⁾ estudaram 115 gestantes com diagnóstico sorológico positivo para infecção primária pelo CMV, utilizando o ultrassom para avaliação de alterações estruturais no feto, e a amniocentese e a cordocentese, para pesquisar a presença de infecção fetal, no líquido amniótico (111 coletas) e sangue fetal (106 coletas), respectivamente. Dezesesseis fetos apresentaram resultados positivos pela técnica de PCR. Os principais achados ultrassonográficos entre os fetos acometidos foram: hiperecogenicidade periventricular cerebral (10 casos), intestinos hiperecogênicos (9 casos), oligodrâmnio (3 casos), placentomegalia (3 casos), ventriculomegalia (3 casos), hepatoesplenomegalia (2 casos), calcificações intra-hepáticas (2 casos), cardiomegalia (2 casos), CIUR (1 caso), ascite (1 caso) e alteração no pico sistólico da artéria cerebral média (1 caso). O diagnóstico de infecção fetal com amostras de líquido amniótico foi realizado em cultura rápida de células e PCR, apresentando sensibilidade de 72.7% e concordância de resultados de 99.1%. Sensibilidade semelhante, 75.6%, foi encontrada na análise de sangue fetal, através da pesquisa de IgM específica para CMV e PCR, apresentando uma concordância inferior, de 84.9%. Outros achados ultrassonográficos descritos na literatura incluem: calcificações cerebrais,

hipoplasia cerebelar, hidropsia, microcefalia e edema do tecido celular subcutâneo.⁽³¹⁻³⁴⁾

2.3.2 – Parvovirus B19

O Parvovirus B19 é um vírus pequeno que apresenta 2 proteínas estruturais e uma fita de DNA, descrito pela primeira vez em 1974, e capaz de produzir ICO em seres humanos, a partir da transmissão vertical, com risco estimado de 25%. A maioria dos fetos infectados não apresenta alterações importantes. Porém, existem relatos associando a infecção a abortos e morte fetal. O vírus possui tropismo pelas células progenitoras dos eritrócitos, podendo levar a quadros importantes de anemia, com cardiomiopatia e eventualmente hidropsia fetal não imune, secundárias à anemia. Os principais achados ultrassonográficos relacionados com a ICO por PB19 incluem: alteração no pico de velocidade da artéria cerebral média (ACM), cardiomegalia, hidropsia, intestinos hiperecogênicos, ascite, polidramnia, peritonite meconial e placentomegalia. O diagnóstico materno pode ser realizado através de exames sorológicos e pela técnica de PCR. Já o diagnóstico fetal necessita da coleta de líquido amniótico para a realização do PCR. A ICO por PB19 não causa anomalias estruturais. Os achados ultrassonográficos se relacionam com o grau de anemia apresentado pelo feto. A morbiletalidade perinatal está relacionada à presença de hidropsia fetal, melhor e mais precocemente avaliada pela medida do pico de velocidade da ACM. O tratamento intrauterino consiste em corrigir a anemia fetal através da transfusão de hemácias. Mesmo assim, existe a possibilidade de dano neurológico em fetos infectados pelo PB19, provavelmente resultante da encefalopatia hipóxico isquêmica a que eles estão submetidos, durante o período anêmico. O monitoramento ultrassonográfico

através do Doppler da ACM, permite a indicação precoce da correção da anemia, evitando as suas complicações.^(35,36)

2.3.3 – Toxoplasma gondii

A Toxoplasmose é uma doença endêmica universal causada pelo *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular. Sua prevalência varia de acordo com a geografia, condições sanitárias e hábitos alimentares. Em 2015, a OMS relacionou a TOX como o terceiro patógeno mais importante para a disseminação de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, através do consumo de carnes cruas ou malcozidas, água e alimentos frescos mal higienizados. A prevalência da infecção congênita pela TOX no mundo varia de 0,1 a 0,3 por 1.000 nascidos vivos. No Brasil, a possibilidade de ICO associada à TOX está diretamente relacionada à prevalência, variando de 36 a 92% na nossa população.⁽³⁷⁾ O quadro clínico materno apresenta grande variação, desde pacientes assintomáticas ou oligossintomáticas, a gestantes com quadro de febre, cansaço, exantema e adenomegalia cervical. O diagnóstico materno da TOX pode ser realizado utilizando o rastreio sorológico, observando a soroconversão através de exames seriados. A associação com o teste de avidez permite estimar, com intervalo de 12 semanas, a fase da gestação em que ocorreu a viragem sorológica. A taxa de transmissão vertical aumenta com a evolução da idade gestacional, sendo menor de 10,0% antes de 12 semanas, 20,0% ao redor de 19 semanas, 52,3% com 28 semanas, alcançando 70,0% com 39 semanas.⁽³⁸⁾ A introdução da coleta de líquido amniótico na rotina para o diagnóstico da infecção fetal, pode ser realizada após a 16ª semana, respeitando um período maior que 4 semanas após a soroconversão materna, quando apresenta especificidade de 100%.^(39,40) A ICO por TOX permite o

tratamento do binômio materno-fetal. A espiramicina é a droga de escolha para iniciar a terapia. Se for possível a realização do exame de PCR no líquido amniótico, e esse resultado apresentar positividade, o esquema terapêutico pode ser modificado para sulfadiazina e pirimetamina, associadas ao ácido fólico. A espiramicina não atravessa a barreira placentária, diferentemente da associação sulfadiazina e pirimetamina, permitindo tratar o conceito. Os principais achados ultrassonográficos relacionados com a ICO por TOX são: ventriculomegalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais e hepáticas, ascite, hepatomegalia, derrame pericárdico, intestinos hiperecogênicos e placentomegalia.⁽⁴⁰⁾ Em uma série de casos, o achado isolado de calcificações no parênquima cerebral sem a presença de dilatação dos ventrículos cerebrais, esteve associada a bom prognóstico neonatal.⁽⁴¹⁾ A maioria dos RNs infectados nascem assintomáticos. É importante o segmento neonatal voltado para o rastreio de complicações oculares e neurológicas até 3 anos de vida. O rastreio materno e o tratamento correto durante o Pré-Natal reduzem significativamente a ocorrência de sequelas neurológicas e oculares.

2.3.4 – *Treponema pallidum*

A Sífilis é uma doença sexualmente transmissível, crônica e sistêmica, causada pelo *Treponema pallidum*. Historicamente, sua presença e rápida disseminação é reconhecida na Europa ao final do século XV. Até o início do século passado, era considerada uma doença neurológica.⁽⁴²⁾ A origem infecciosa só foi demonstrada em 1901, quando o cientista russo Ilya Ilyich Mecnikov inocula, com sucesso, macacos com o *T pallidum*. Porém, o agente etiológico da Sífilis só seria identificado pelo zoologista Fritz Schaudin e pelo dermatologista Paul Erick Hoffman em 1905.⁽⁴³⁾ Morfologicamente, o *T. pallidum*

é uma bactéria alongada e espiralada, muito sensível ao ressecamento no meio ambiente. A história natural da Sífilis apresenta uma importante mudança de rumo com a introdução do tratamento utilizando a penicilina na década de 40, embora tenhamos observado o aumento paulatino do número de casos em diferentes países nos últimos 50 anos. Como exemplo, podemos citar o recrudescimento da doença em três diferentes momentos nos Estados Unidos da América, um país desenvolvido: no final dos anos 70, com o aumento do número de relações sexuais desprotegidas entre homens, coincidindo com a emergência da epidemia da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA); a segunda onda ocorre no final dos anos 80, atingindo seu pico em 1990, onde a taxa de infecção alcança 20.3 casos por 100.00 habitantes; drogas, sexo desprotegido e a diminuição da vigilância epidemiológica e terapêutica por parte do governo americano, foram os principais contribuintes para esses aumentos. A terceira etapa acontece durante a segunda década desse século, com aumento lento, porém constante, atingindo em 2014 a taxa de 6.3 casos por 100.000 habitantes. Diferente das etapas anteriores, o número de casos novos de doença primária e secundária (DPS) apresentou aumento considerável em mulheres heterossexuais em idade reprodutiva (22,7% em relação ao ano anterior). Como consequência, a taxa de Sífilis congênita aumentou 27,5% no mesmo período, atingindo 11,6 casos por 100.000 habitantes (semelhante à 2001). Entre 2013 e 2017 a taxa de DPS na população americana aumentou 72,7% e, entre mulheres jovens, cresceu 155,6% (de 0,9 para 2,3 casos por 100.000 habitantes).⁽⁴⁴⁾ A transmissão heterossexual e a utilização de drogas injetáveis, com destaque para a metanfetaminas e a heroína, foram os principais agentes responsabilizados. Em contra partida, em um estudo prospectivo realizado no

Reino Unido entre 2010 e 2015, a incidência de Sífilis congênita ficou abaixo da meta estabelecida pela OMS (menor que 0,5 por 1.000 nascidos vivos).⁽⁴⁵⁾

Na última década, no Brasil, observou-se um aumento no número de notificações de casos de Sífilis adquirida, da doença em gestantes e da Sífilis congênita, que pode ser atribuído, em parte, ao aprimoramento do sistema de vigilância e à ampliação da utilização dos testes rápidos.⁽⁴⁶⁾ Em 2017, observou-se uma taxa de detecção de 17,2 casos de sífilis em gestantes por 1.000 nascidos vivos (28,4% superior à taxa observada no ano anterior). A taxa de detecção nacional foi superada pelas regiões Sudeste (20,8 / 1.000 nascidos vivos) e Sul (20,1/1.000 nascidos vivos). Em relação à Sífilis congênita, para o mesmo período, observou-se uma taxa de incidência de 8,6 casos por 1.000 nascidos vivos, tendo as Regiões Sudeste (9,4 casos/1.000 nascidos vivos) e Sul (9,1 casos/1.000 nascidos vivos) superado a taxa nacional. As principais complicações da doença para a gravidez incluem a elevada morbiletalidade perinatal e a possibilidade de sequelas neonatais. Até 60% de recém-nascidos de mães infectadas e não tratadas durante a gestação apresentarão sinais clínicos da doença: exantema maculopapular, hepatoesplenomegalia, osteocondrite, descarga nasal (semelhante à da gripe), surdez e cegueira. A apresentação tardia da doença nos neonatos inclui: defeitos de dentição, ceratite intestinal e surdez (Tríade de Hutchinson).⁽⁴²⁾ Um estudo de coorte retrospectivo, utilizando ultrassom e dopplervelocimetria, envolvendo 235 fetos cujas mães apresentaram diagnóstico de Sífilis após 18 semanas de idade gestacional, antes de iniciarem o tratamento com penicilina, encontrou 73 conceptos (30%) com anomalias: hepatomegalia (79%), placentomegalia (27%), polidramnia (12%), ascite (10%) e Doppler da ACM anormal (33%).⁽⁴⁷⁾ Entre as 173 crianças

com seguimento pós-natal completo, 32 RN foram diagnosticados como portadores de Sífilis congênita (18%); onde 39% apresentavam alterações no exame de ultrassom pré-natal. Mesmo com a possibilidade de rastreio e tratamento, a Sífilis continua sendo um grave problema de saúde pública mundial.

2.3.5 – Herpes simplex

Os vírus Herpes simplex tipos 1 e 2 vírus (HSV), possuem um envelope e uma dupla fita de DNA.⁽⁴⁸⁾ Pertencem à família *Herpesviridae*, que incluem outros seis vírus capazes de infectar os seres humanos: varicela-zoster, citomegalovírus, Epstein-Barr, e os herpes vírus 6, 7 e 8. Aproximadamente 85% das infecções perinatais causadas pelo HSV são adquiridas durante a passagem do feto pelo canal de parto; 10% acontecem devido ao contato do RN com secreções contaminadas de parentes ou cuidadores e 5% estão relacionadas à infecção intrauterina, que pode se manifestar no momento do parto.⁽⁴⁹⁾ A taxa de infecção congênita pelo HSV varia de 1 caso a cada 3.000 a 1 caso a cada 20.000 nascidos vivos. O risco da transmissão vertical é maior em gestantes que com a primo-infecção no terceiro trimestre, apresentando incidência de 25-60%. Enquanto um problema de saúde pública, a primo-infecção pelo HSV raramente pode acometer o feto (1 caso para 100.000 nascidos vivos).⁽⁵⁰⁾ Em uma revisão de literatura compreendendo os anos de 1963 a 2009, Marquez e colaboradores identificaram 64 casos de ICO por HSV, baseados em 3 critérios: manifestações clínicas perinatais, comprometimento de pelo menos um órgão e diagnóstico laboratorial positivo por cultura, imunohistoquímica ou PCR. A tríade clássica da ICO por HSV, comprometimento cutâneo (lesões bolhosas ou úlceras), do SNC (microcefalia ou hidrocefalia) e oftalmológico (coriorretinite ou microftalmia),

foram identificadas em 19 RNs (30%). Alterações cutâneas e do SNC, sem comprometimento oftalmológico, em 22 casos (34%) e 6 casos apresentaram somente alterações cutâneas e oftalmológicas. Entre os 61 RNs com lesões cutâneas, 55 apresentaram lesões ao nascimento ou em até 12 horas de vida. Quarente e três (67%) RNs apresentavam alterações no SNC, e em 29 crianças duas ou mais alterações no SNC foram percebidas. Vinte e cinco RNs (39%) apresentaram alterações oculares, sendo 18 com doença retiniana. A mortalidade perinatal ocorreu em 29 conceptos, incluindo 4 natimortos. Dentre as 25 mortes no período neonatal, 20 RNs faleceram no primeiro mês de vida (80%). Entre os sobreviventes com seguimento conhecido, 13 RNs cursaram com atraso de desenvolvimento e 8 RNs apresentaram seguimento normal até o 6º mês. Concordante com a literatura, mostrou que 60 a 80% das pacientes que tiveram RNs com ICO por HSV, não apresentavam sinais ou sintomas da doença no momento do parto ou história prévia da infecção. As principais alterações estruturais passíveis de diagnóstico ultrassonográfico nesse trabalho foram: calcificações no SNC (19 casos), porencefalia/encefalomalácia (16 casos), ventriculomegalia (13 casos), microcefalia (10 casos), hemorragia (8 casos), CIUR (7 casos), hidropsia (6 casos) e óbito fetal (4 casos).

Atualmente, recomenda-se a profilaxia com aciclovir contra o HSV para gestantes com crises recorrentes na região genital, após a 36ª semana de gestação, visando a proteção fetal no caso de parto transvaginal. Suspeitando-se de infecção por herpes simplex no momento do parto, devido a alterações no exame físico neonatal, a terapia antiviral deve ser iniciada imediatamente por até 14 dias, para os casos cutâneos, e até 21 dias para os casos com envolvimento do SNC.^(51,48) Deve-se instituir a profilaxia secundária antiviral por até seis meses

no período pós-natal, objetivando diminuir as recidivas cutâneas e melhorar o prognóstico neurológico.

2.4- Amniocentese e infecções congênitas

A amniocentese é uma técnica propedêutica utilizada para a coleta de líquido amniótico. Originalmente era praticada sem o auxílio do ultrassom. O líquido amniótico coletado era utilizado para a confecção do cariótipo fetal, através da cultura de amnióticos, para a avaliação da maturidade pulmonar fetal, utilizando a dosagem de lecitina e esfingomiélin, ou para a realização do exame de espectrofotometria, no acompanhamento da doença hemolítica perinatal. Com a introdução do ultrassom guiando a inserção da agulha através do abdome materno, o exame ganhou em segurança e qualidade, estimando-se atualmente o risco de perda gestacional associada ao exame em 0,5%. As pacientes devem ser previamente informadas da indicação e das limitações do método, através do Termo de Consentimento Informado. A amniocentese pode ser praticada a partir da 16ª semana de gestação e o volume coletado pode variar de 16 a 30 mililitros. A técnica consiste na introdução de uma agulha longa, 20g ou 22g, através do abdome materno, guiada pelo ultrassom, até alcançar um bolsão de líquido amniótico, aspirando então o volume desejado. ⁽⁵²⁻⁵⁵⁾

Nos últimos 20 anos, a utilização da amniocentese para a confirmação de infecção fetal através da identificação direta do microrganismo ou de seus fragmentos no líquido amniótico, se transformou em uma ferramenta valiosa na prática obstétrica. O material coletado pode ser inoculado em cobaias, semeado em cultura de células humanas ou de animais, ou ainda ser submetido a diferentes técnicas de biologia molecular, com destaque para o RT-PCR,

objetivando a confirmação ou exclusão da infecção. Diferentes tecnologias podem ser combinadas para aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

3- JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE

No dia primeiro de fevereiro de 2016, a diretora geral da Organização Mundial da Saúde (OMS), Margaret Chan, decretou “Estado de Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional”, com o objetivo de chamar a atenção dos governantes de todo o planeta, para a rápida disseminação da infecção causada pelo vírus Zika (ZIKV) no Brasil, associada aos efeitos ominosos para os fetos de gestantes infectadas, que apresentavam importante diminuição do perímetro cefálico ao nascimento, microcefalia, além de outras morbidades. Até então considerada pela literatura como uma infecção benigna para os seres humanos, a possibilidade de associação com o aparecimento de anomalias estruturais em fetos de mães afetadas pelo ZIKV, abria uma perturbadora janela para um cenário catastrófico, frente ao tamanho da população brasileira habitando áreas tropicais em condições sanitárias precárias. Embora a resposta do Ministério da Saúde tenha sido eficiente e satisfatória com a rápida construção de protocolos de Vigilância e Assistência^(56,57) a ignorância com relação ao potencial lesivo dessa infecção para as gestantes, tornava imperiosa a organização de uma rede de informações para disseminar os conhecimentos que dispúnhamos sobre a doença em 2016. Vários encontros realizados no Brasil e no exterior, patrocinados por diferentes organizações naquele ano, permitiram a congregação de cientistas nacionais e estrangeiros com o objetivo de melhorar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na mudança do perfil da infecção pelo ZIKV, disponibilizando inclusive o conhecimento acumulado através da gratuidade de acesso aos trabalhos científicos que estavam sendo publicados. Desses encontros, também nasceram parcerias que aceleraram a realização de pesquisas produzindo resultados consistentes e

definitivos, através da troca de materiais biológicos e compartilhamento de informações.

Neste contexto, a Área de Atenção a Gestante do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF) trabalhou em parceria com o Instituto Nacional de Infectologia (INI), ambos os institutos pertencentes à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), cabendo ao IFF, inicialmente, a realização de exames de ultrassom obstétrico (USO) e dopplervelocimetria (Doppler) de gestantes infectadas pelo ZIKV. Frente à necessidade de cuidados perinatais para essas gestantes, realizamos também o Pré-Natal e o parto de uma parte das pacientes encaminhadas (i) pelo INI para avaliação propedêutica; (ii) de pacientes oriundas das redes municipal e estadual; (iii) além das gestantes que procuraram diretamente o IFF.

Segundo informações publicadas na página da OMS⁽⁵⁸⁾ em agosto de 2016, observando um período de tempo começando em 2007 e se prolongando até agosto de 2016, 69 países ou territórios reportaram evidências da presença de ZIKV a partir da transmissão vetorial autóctone, sendo que 66 destes países, a partir do ano de 2015, incluindo 43 países (64%) nas Américas. No mesmo período de tempo, 15 países informaram sobre a ocorrência do nascimento de recém-nascidos com microcefalia e outras alterações no sistema nervoso central (SNC) potencialmente associadas à infecção pelo ZIKV e/ou infecção congênita. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América informou à OMS o nascimento de 15 crianças com malformações suspeitas e o resultado do exame de 6 abortos com malformações suspeitas em seu território, todos com evidências laboratoriais de infecção pelo ZIKV. Ainda,

segundo o relatório da OMS, cerca de 1.357.605.792 pessoas no mundo estão expostas ao vírus Zika, das quais 15,3% residentes em território brasileiro.

No Brasil, existem informações epidemiológicas referentes à microcefalia e/ou alterações do SNC, previstas nas definições vigentes no “Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou alterações do Sistema Nervoso Central (SNC) – versão 2.1/2016”(6), disponível no sítio www.saude.gov.br/svs. O Informe Epidemiológico de número 38⁽⁵⁹⁾ publicado em agosto de 2016, apresentava uma fotografia precisa dos primeiros 10 meses de epidemia no Brasil. Entre os dias 08 de novembro de 2015 e 06 de agosto de 2016, 8.890 casos haviam sido notificados, segundo as definições do protocolo, que incluíam recém-nascidos, natimortos, abortamento e fetos com anomalias estruturais. Desse total, 2.978 (33,5%) casos permaneciam em investigação; 5.912 casos foram investigados e classificados, sendo 1.806 confirmados para microcefalia e/ou alterações do SNC sugestivos de infecção congênita e 4.106 casos foram descartados. Quando analisamos a distribuição geográfica desses achados, encontramos que os 8.890 casos notificados se distribuíam por 1.590 municípios (28,5%) do total de 5.570 municípios brasileiros. Quando observamos a distribuição dos 1.806 casos confirmados por região, encontramos um total de 510 municípios na região Nordeste, 39 municípios na região Sudeste, 34 na região Centro-Oeste, 25 na região Norte e 13 na região Sul, totalizando 621 municípios em todo o território nacional. O último Boletim epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde em 2019, compreendendo as semanas epidemiológicas 45/2015 a 52/2018, e intitulado “Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias”, apresenta 2.865 casos confirmados da infecção com

alterações em recém-nascidos e crianças, e 357 casos confirmados de óbitos fetais, neonatais e infantis.⁽⁶⁰⁾

No estado do Rio de Janeiro, entre setembro de 2015 e fevereiro de 2016, um grupo de 88 gestantes apresentando exantema foi testado para ZIKV pela técnica de RT-PCR⁽⁶¹⁾. Setenta e duas pacientes (82%) apresentaram resultado positivo no sangue, urina ou ambos. A idade gestacional no momento do exantema, que caracteriza a fase aguda da infecção, variou entre 5 e 38 semanas. As queixas maternas mais comuns encontradas foram exantema macular ou maculopapular, prurido, artralgia, conjuntivite não purulenta e cefaleia; 28% apresentaram febre baixa e de curta duração. Exames de ultrassom e Doppler foram realizados em 42 gestantes ZIKV RT-PCR positivas, sendo encontradas alterações em 12 fetos (29%): 2 fetos natimortos (36 e 38 semanas), 5 fetos foram diagnosticados com crescimento intrauterino restrito (CIUR) com ou sem microcefalia, 7 fetos apresentaram alterações estruturais no SNC e em 7 fetos encontraram alterações de volume do líquido amniótico ou anormalidades no exame de dopplervelocimetria. Dois recém-nascidos apresentaram lesões maculares no exame de fundo de olho.

Os dois casos que apresentaram PCR(s) positivos para o Zika vírus no estado da Paraíba (16) apresentavam alterações estruturais significativas no sistema nervoso central: microcefalia, atrofia cerebral, calcificações, disgenesia de corpo caloso e ventriculomegalia. Naquela época, todo o esforço das equipes multidisciplinares que atendiam as gestantes com suspeita de infecção, centrava na possibilidade do diagnóstico intrauterino de microcefalia.

A importância do trabalho publicado em Fevereiro de 2016 pelo grupo do Rio de Janeiro foi o de demonstrar, a partir de um estudo de coorte em gestantes

infectadas pelo ZIKV, que a microcefalia fazia parte de um espectro muito maior de anomalias estruturais e funcionais, que poderiam comprometer o desenvolvimento fetal, independentemente do trimestre em que ocorria a infecção, além de estar associada com diminuição no ritmo de crescimento intrauterino e na qualidade de vida logo após o nascimento.

Destacou também a possibilidade de alterações nos globos oculares, a partir de achados suspeitos durante a realização dos exames de ultrassom obstétricos. O estudo sistemático de todas as crianças filhas de mães infectadas durante a gravidez, utilizando o exame de fundo de olho, fundoscopia, permitiu o diagnóstico de lesões maculares no período pós-natal imediato, associadas ou não à microcefalia⁽⁶²⁻⁶⁶⁾, que posteriormente foram tratadas com a utilização de óculos para a correção da disfunção visual.

Este estudo ainda contribuiu para atestar a associação entre a infecção pelo ZIKV e a microcefalia⁽⁶⁷⁾.

Publicações posteriores, sendo em sua maioria relatos de casos ou série de casos, realizados a partir de material de necropsias ou de aborto, confirmaram o potencial lesivo da infecção pelo ZIKV principalmente no SNC e na placenta⁽⁶⁸⁻⁷²⁾. Estudos de imagem utilizando tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), realizados em recém-nascidos infectados pelo ZIKV confirmaram os achados de anomalias estruturais detectados nos exames de ultrassom, realizados durante a gestação^(73,74).

Os estudos experimentais demonstraram de maneira inequívoca a capacidade do vírus Zika causar lesão direta nas células neuronais, levando à diminuição do número total de células e/ou atraso na multiplicação dos neurônios

progenitores acometidos pela infecção, resultando na diminuição da migração neuronal, acarretando hipoplasia e desorganização encefálica ⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾.

Nos últimos três anos várias perguntas clínicas e experimentais foram parcialmente respondidas. A gravidade da infecção materna assim como a carga viral e a presença de anticorpos contra a DENV não se relacionam com o desfecho perinatal⁽⁷⁹⁾. Entretanto, um estudo de coorte realizado em uma população do estado da Bahia, encontrou associação entre altos títulos de anticorpos contra a DENV com a redução do risco de contrair a infecção pelo ZIKV.⁽⁸⁰⁾ Outras formas de contágio além da mordida do mosquito infectado foram suspeitadas e posteriormente comprovadas, como a via sexual, quando um dos parceiros está infectado^(81,82). Partículas virais com capacidade infectante foram isoladas na saliva e na urina ⁽⁸⁾. A ultraestrutura do ZIKV e o sequenciamento do genoma de amostras sul-americanas foram completados⁽⁸³⁾.

Infelizmente terapias antivirais e a possibilidade de utilização de uma vacina para prevenir a doença ainda não estão disponíveis.

Assim, passados pouco mais de 36 meses desde o início da epidemia em nosso país, a infecção pelo ZIKV e seus efeitos deletérios sobre os fetos de gestantes acometidas ainda constitui um grande desafio para a Ciência Moderna.

HIPÓTESE

A hipótese formulada para o nosso primeiro estudo foi que a utilização de dois métodos propedêuticos biofísicos, o ultrassom e o Doppler, poderiam auxiliar na identificação de fetos de risco para anomalias estruturais e hemodinâmicas, associadas a infecção pelo ZIKV.

Para o segundo artigo, constituímos como hipótese, que a utilização da amniocentese para a coleta de líquido amniótico, poderia contribuir para a identificação do diagnóstico etiológico de anomalias estruturais suspeitas durante a epidemia, em um grupo de gestantes sem diagnóstico prévio da infecção pelo ZIKV.

4. OBJETIVOS

4.1- Objetivo principal

Estudar a morfologia de fetos cujas mães foram infectadas pelo ZIKV durante a gestação, utilizando o ultrassom e o Doppler, buscando identificar padrões de alterações estruturais e/ou no ritmo de crescimento fetal, além de alterações hemodinâmicas características.

4.2- Objetivos específicos

1. Descrever detalhadamente a anatomia fetal utilizando o ultrassom, com ênfase para alterações comumente associadas às infecções congênitas
2. Analisar o ritmo de crescimento fetal realizando estudos ultrassonográficos seriados
3. Identificar as alterações anatômicas encontradas na tentativa de estabelecer padrões de anormalidades relacionadas à síndrome da infecção pelo ZIKV
4. Analisar os vasos do cordão umbilical, as artérias umbilicais, utilizando a técnica de dopplervelocimetria, que demonstram indiretamente a qualidade da perfusão placentária
5. Estudar a artéria cerebral média fetal, utilizando a técnica de Doppler, na tentativa de identificar alterações hemodinâmicas possíveis de serem encontradas em fetos cujas mães foram infectadas
6. Determinar se a normalidade destes exames durante a gestação se associa com o prognóstico perinatal.

7. Utilizar a amniocentese como recurso propedêutico para o diagnóstico diferencial das pacientes com fetos suspeitos da Síndrome da Zika Congênita.

5. MÉTODOS

5.1- Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), hospital materno-infantil pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), como parte de um estudo de coorte intitulado “Exposição vertical ao Zika Vírus e suas consequências no neurodesenvolvimento”.

5.2- Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo descritivo, longitudinal e prospectivo, como parte de um estudo de coorte desenvolvido em nosso hospital, entre 14 de dezembro de 2015 e 31 de dezembro de 2017, composto por um grupo de gestantes, portadoras de gestações únicas ou múltiplas, em qualquer idade gestacional, que tenham diagnóstico laboratorial confirmado de infecção pelo ZIKV, através da técnica de RT-PCR, no período perinatal. Todas as pacientes foram convidadas a realizar exames de ultrassom e dopplervelocimetria no Setor de Medicina Fetal do Departamento de Obstetrícia do IFF. Os exames foram realizados com aparelhos de ultrassonografia modelos E6, Voluson 730 e S8, todos fabricados pela General Electric, GE (Alemanha), utilizando sondas convexas. Para a avaliação de gestações no primeiro trimestre foram utilizadas sondas endocavitárias. As pacientes realizaram os exames em posição de decúbito dorsal, semi-inclinadas. Laudos padronizados foram emitidos ao final dos exames e colocados no prontuário, segundo a rotina do setor, utilizando o programa de laudos Astraia, versão 1.24.10, 2019 (Astraia Software GmbH, Alemanha). O examinador

principal do estudo, responsável pela realização, supervisão e treinamento da equipe, possuía o título de especialista em Ultrassom emitido pela Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) e pelo Colégio Brasileiro de Radiologia (CBR). Todos os exames de ultrassonografia e dopplervelocimetria foram praticados seguindo os protocolos da *International Society for Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG)*.⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾

As gestantes foram divididas em três diferentes grupos, de acordo com a idade gestacional quando da chegada ao Setor de Medicina Fetal. Cada grupo foi estudado de forma distinta, com rotinas pré-estabelecidas de exames de ultrassonografia e dopplervelocimetria.

5.2.1- Pacientes com idade gestacional < 20 semanas

Ultrassonografia:

Para gestações cujos fetos apresentam comprimento cabeça-nádega (CCN) menores que 45 mm, foram realizadas as medidas do CCN e anotada a frequência cardíaca fetal. Para fetos com CCN medindo entre 45 e 84 mm, foram realizadas as medidas do CCN, do diâmetro biparietal (DBP) e da circunferência cefálica (CC), além da medida da translucência nucal (TN), observação da presença do osso nasal e aferição do índice pulsátil (PI) do ducto venoso (DV). Foi realizada também a avaliação morfológica compatível com a idade gestacional. O cálculo de risco para aneuploidias foi disponibilizado para as pacientes.

Para gestações que apresentam CCN maiores ou iguais a 85 mm, foram realizadas as medidas do diâmetro biparietal (DBP), da circunferência cefálica (CC), da circunferência abdominal (CA), do comprimento do fêmur (F),

comprimento do úmero (U), comprimento transverso do cerebelo (CER), espessura do corno posterior do ventrículo cerebral lateral (Vp) e cisterna magna (CM). Todas as medidas foram expressas em milímetros (mm). A espessura da placenta foi medida em mm, na região central. A avaliação quantitativa do líquido amniótico foi realizada através da medida do maior bolsão vertical (MBV), medido em mm. O estudo da morfologia fetal apropriada para esta idade gestacional compreendeu: a identificação do perfil, da calota craniana, do encéfalo, coluna, posição e visualização do coração, posição e visualização do estômago, inserção do cordão umbilical na parede abdominal, visualização dos rins e bexiga e identificação dos quatro membros. Foram também anotadas a presença de derrames cavitários além de quaisquer outras alterações estruturais ou funcionais.

Dopplervelocimetria:

Foi realizada a insonação do cordão umbilical para a confecção de sonograma da artéria umbilical, objetivando a avaliação do índice de pulsatilidade (PI).

5.2.2- Pacientes com idade gestacional entre 20 e 29 semanas

Ultrassonografia:

Foram realizadas as medidas do diâmetro biparietal (DBP), da circunferência cefálica (CC), da circunferência abdominal (CA), do comprimento do fêmur (F) e comprimento do úmero (U), comprimento transverso do cerebelo (CER), espessura do corno posterior do ventrículo cerebral lateral (Vp) e cisterna magna (CM). Todas as medidas foram expressas em milímetros (mm). A espessura da placenta foi medida em mm, na região central. A avaliação

quantitativa do líquido amniótico foi realizada através da medida do maior bolsão vertical (MBV), medido em mm. O estudo da morfologia fetal apropriada para esta idade gestacional compreendeu: a identificação do perfil, da calota craniana, do parênquima cerebral, estudo da anatomia do coração e pulmões, posição e visualização do estômago, inserção do cordão umbilical na parede abdominal, visualização da bexiga e rins, estudo da coluna e contagem dos ossos longos. Foram também anotadas a presença de derrames cavitários além de quaisquer outras alterações estruturais ou funcionais.

Dopplervelocimetria:

Foi realizada a insonação do cordão umbilical para a confecção de sonograma da artéria umbilical, objetivando a avaliação do índice de pulsatilidade (PI). Foi realizada também a insonação da artéria cerebral média (ACM) no seu terço proximal objetivando a avaliação do índice de pulsatilidade (PI) e anotado o pico de velocidade sistólica máxima (PVS).

5.2.3- Pacientes com idade gestacional \geq 30 semanas

Ultrassonografia:

Foram realizadas as medidas do diâmetro biparietal (DBP), da circunferência cefálica (CC), da circunferência abdominal (CA), do comprimento do fêmur (F) e comprimento do úmero (U), comprimento transverso do cerebelo (CER), espessura do corno posterior do ventrículo lateral do cérebro (Vp) e cisterna magna (CM). Todas as medidas foram expressas em milímetros (mm). A espessura da placenta foi medida em mm, na região central. A avaliação quantitativa do líquido amniótico foi realizada através da medida do maior bolsão vertical (MBV), medido em mm. Embora o estudo da morfologia fetal a partir

dessa idade gestacional possa ficar prejudicada, tentamos manter o padrão de estudo do sistema nervoso central (SNC), quando foi possível. Foram também anotadas a presença de derrames cavitários além de quaisquer outras alterações estruturais ou funcionais.

Dopplervelocimetria:

Foi realizada a insonação do cordão umbilical para a confecção de sonograma da artéria umbilical, objetivando a avaliação do índice de pulsatilidade (PI). Foi realizada também a insonação da ACM no seu terço proximal, objetivando a avaliação do índice de pulsatilidade (PI) e anotado o pico de velocidade sistólica máxima (PVS).

Todas as medidas aferidas nos exames de ultrassom e Doppler foram submetidas às tabelas de normalidade inclusas no programa de laudos Astraia®, determinando padrão de normalidade/anormalidade dos resultados.⁽⁸⁷⁻⁹²⁾

Para as pacientes sem confirmação laboratorial da infecção pelo ZIKV cujos fetos apresentaram malformações suspeitas de infecção congênita, foram oferecidos exames de amniocentese e/ou cordocentese, guiados por ultrassom, de acordo com a idade gestacional, para a realização de RT-PCR no líquido amniótico ou sangue fetal, respectivamente, além da realização de cariótipo fetal quando indicado. Foram utilizadas agulhas 20g e 22g, com 7 cm de comprimento. O volume de líquido amniótico coletado variou de 18 ml a 24 ml.

Exames de ressonância magnética (RM) durante a gestação foram realizados em 17 gestantes.

O resultado perinatal foi avaliado através de um conjunto de parâmetros clínicos perinatais, de imagem e laboratoriais pós-natais, anotados em uma ficha específica (Anexo 1).

As pacientes realizaram os partos no IFF e em outras maternidades públicas ou privadas.

Tentamos colher sangue do cordão umbilical e fragmentos da placenta de todas as pacientes para estudos laboratoriais e de anatomia patológica.

Os recém-nascidos que nasceram no IFF foram avaliados de acordo com o protocolo de assistência do Departamento de Neonatologia do hospital, alinhado ao protocolo do Ministério da Saúde.

5.3- Critério de Inclusão

Gestantes portadoras de gestações únicas ou múltiplas, em qualquer idade gestacional, que tenham diagnóstico laboratorial confirmado de infecção pelo ZIKV, através da técnica de RT-PCR, em qualquer tecido materno, fetal ou neonatal,

e/ou

pacientes sem diagnóstico da infecção por ZIKV cujos fetos apresentavam anomalias estruturais suspeitas ao ultrassom.

5.4- Critérios de Exclusão

Perda de seguimento perinatal.

5.5- Diagnóstico por imagem

Os exames de ultrassom e Doppler foram realizados pela equipe do Setor de Medicina Fetal do IFF. Exames de RM foram realizados pela equipe do Centro de Diagnóstico por Imagem (CDPI) através de um convênio estabelecido. Os exames de ultrassom transfontanela (USTF) e tomografia computadorizada (TC)

dos recém-nascidos foram realizados pela equipe do Departamento de Radiologia do IFF.

5.6- Exames laboratoriais

Os exames de cariótipo no sangue fetal ficaram sob a responsabilidade do Departamento de Genética do IFF. Os exames de cariótipo no líquido amniótico foram realizados por um laboratório privado, DLE, através de um convênio preestabelecido. Os exames de RT-PCR foram confeccionados pela equipe do Laboratório de Alta Complexidade do nosso instituto. Os exames da placenta e as necropsias foram executados pela equipe do Departamento de Anatomia Patológica do hospital.

5.7- Análise estatística

O banco de dados para a coleta das informações foi montado utilizando o programa EPI 7 (Center for Disease and Preventing Control – CDC; Estados Unidos da América, 2016). Para a análise estatística foi utilizado o Programa SPSS *for Windows* (Statistical Package for the Social Sciences Inc. - IBM, Estados Unidos da América, 2017), aceitando como significativo os resultados de um intervalo de confiança de 95% ($p < 0.05$).

5.8- Aspectos éticos

Este estudo faz parte de um projeto apresentado aos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) do INI/FIOCRUZ aprovado sob número CAAE 0026.0.009.000-07, e do IFF aprovado sob o número CAAE 52675616.0.0000.5269 “Exposição vertical ao Zika Vírus e suas consequências

no neurodesenvolvimento”, pareceres números 1.397.153 e 1.431.820, em consonância com a resolução 466/12, proferida pelo Conselho Nacional de Saúde e foi registrado no ClinicalTrials.gov sob o protocolo NCT 03255369.

5.9- Fontes de financiamento

Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) do Ministério da Saúde do Brasil, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e os consórcios ZikaPlan e Wellcome Trust.

6. ARTIGOS PUBLICADOS

Artigo 1:

JAMA
Network | **Open.**



Original Investigation | Obstetrics and Gynecology

Association of Prenatal Ultrasonographic Findings With Adverse Neonatal Outcomes Among Pregnant Women With Zika Virus Infection in Brazil

Jose Paulo Pereira Jr, MD; Karin Nielsen-Saines, MD; Jeffrey Sperling, MD; Melanie M. Maykin, MD; Luana Damasceno, PharmD; Renan Fonseca Cardozo, MD; Helena Abreu Valle, MD; Beatriz Ribello Torres Dutra, MD; Helder Dotta Gama, MD; Kristina Adachi, MD; Andrea A. Zin, MD, PhD; Irena Tsui, MD; Zilton Vasconcelos, PhD; Patricia Brasil, MD, PhD; Maria E. Moreira, MD, PhD; Stephanie L. Gaw, MD, PhD

Artigo 2:

The Role of Amniocentesis in the Diagnosis of Congenital Zika Syndrome

Jose Paulo Pereira Jr., MD^{1*}; Melanie M. Maykin, MD^{2*}; Zilton Vasconcelos, PhD¹; Elyzabeth Avvad-Portari, MD, PhD¹; Andrea A. Zin, MD, PhD¹; Irena Tsui, MD³; Patricia Brasil, MD, PhD⁴; Karin Nielsen-Saines, MD⁵; Maria E. Moreira, MD, PhD¹; Stephanie L. Gaw, MD, PhD²

Original Investigation | Obstetrics and Gynecology

Association of Prenatal Ultrasonographic Findings With Adverse Neonatal Outcomes Among Pregnant Women With Zika Virus Infection in Brazil

Jose Paulo Pereira Jr, MD; Karin Nielsen-Saines, MD; Jeffrey Sperling, MD; Melanie M. Maykin, MD; Luana Damasceno, PharmD; Renan Fonseca Cardozo, MD; Helena Abreu Valle, MD; Beatriz Ribeiro Torres Dutra, MD; Helder Dotta Gama, MD; Kristina Adachi, MD; Andrea A. Zin, MD, PhD; Irena Tsui, MD; Zilton Vasconcelos, PhD; Patricia Brasil, MD, PhD; Maria E. Moreira, MD, PhD; Stephanie L. Gaw, MD, PhD.

Abstract

IMPORTANCE Congenital Zika virus infection causes a spectrum of adverse birth outcomes, including severe birth defects of the central nervous system. The association of prenatal ultrasonographic findings with adverse neonatal outcomes, beyond structural anomalies such as microcephaly, has not been described to date.

OBJECTIVE To determine whether prenatal ultrasonographic examination results are associated with abnormal neonatal outcomes in Zika virus–affected pregnancies.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS A prospective cohort study conducted at a single regional referral center in Rio de Janeiro, Brazil, from September 1, 2015, to May 31, 2016, among 92 pregnant women diagnosed during pregnancy with Zika virus infection by reverse-transcription polymerase chain reaction, who underwent subsequent prenatal ultrasonographic and neonatal evaluation.

EXPOSURES Prenatal ultrasonography.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES The primary outcome measure was composite adverse neonatal outcome (perinatal death, abnormal finding on neonatal examination, or abnormal finding on postnatal neuroimaging). Secondary outcomes include association of specific findings with neonatal outcomes.

RESULTS Of 92 mother-neonate dyads (mean [SD] maternal age, 29.4 [6.3] years), 55 (60%) had normal results and 37 (40%) had abnormal results on prenatal ultrasonographic examinations. The median gestational age at delivery was 38.6 weeks (interquartile range, 37.9-39.3). Of the 45 neonates with composite adverse outcome, 23 (51%) had normal results on prenatal ultrasonography. Eleven pregnant women (12%) had a Zika virus–associated finding that was associated with an abnormal result on neonatal examination (adjusted odds ratio [aOR], 11.6; 95%CI, 1.8-72.8), abnormal result on postnatal neuroimaging (aOR, 6.7; 95%CI, 1.1-38.9), and composite adverse neonatal outcome (aOR, 27.2; 95%CI, 2.5-296.6). Abnormal results on middle cerebral artery Doppler ultrasonography were associated with neonatal examination abnormalities (aOR, 12.8; 95%CI, 2.6-63.2), postnatal neuroimaging abnormalities (aOR, 8.8; 95%CI, 1.7-45.9), and composite adverse neonatal outcome (aOR, 20.5; 95%CI, 3.2-132.6). There were 2 perinatal deaths. Abnormal findings on prenatal ultrasonography had a sensitivity of 48.9% (95%CI, 33.7%-64.2%) and a specificity of 68.1% (95%CI, 52.9%-80.1%) for association with composite adverse neonatal outcomes. For a Zika virus–associated abnormal result on prenatal ultrasonography, the sensitivity

(continued)

Key Points

Question Are prenatal ultrasonographic findings in maternal Zika virus infection associated with adverse neonatal outcomes?

Findings In this cohort study of 92 women with confirmed Zika virus infection in pregnancy, 37 had an abnormal result on prenatal ultrasonography that was associated with adverse composite neonatal outcomes. However, 23 of 55 neonates who had normal results on prenatal ultrasonography still had adverse neonatal outcomes.

Meaning Abnormal results on prenatal ultrasonography are associated with adverse neonatal outcomes; however, a

comprehensive neonatal evaluation is recommended for all infants with suspected in utero Zika exposure.

[+ Invited Commentary](#) [+ Supplemental content](#)

Author affiliations and article information are listed at the end of this article.

Open Access. This is an open access article distributed under the terms of the CC-BY License.

Abstract (continued)

was lower (22.2%; 95%CI, 11.2%-37.1%) but the specificity was higher (97.9%; 95%CI, 88.7%-99.9%).

CONCLUSIONS AND RELEVANCE Abnormal results on prenatal ultrasonography were associated with adverse outcomes in congenital Zika infection. The absence of abnormal findings on prenatal ultrasonography was not associated with a normal neonatal outcome. Comprehensive evaluation is recommended for all neonates with prenatal Zika virus exposure.

Introduction

The rate of abnormal perinatal outcomes after maternal Zika virus infection has been estimated to be from 6% to 55% for infections acquired in the first trimester and from 3% to 29% for infections acquired in the third trimester.¹ The spectrum of anomalies associated with maternal Zika virus infection is still being characterized, and most information to date has been gleaned from retrospective cohorts and case-control studies.²⁻¹⁰ Recent reports evaluating the predictive value of prenatal ultrasonography are limited because they included cohorts identified prenatally or postnatally with microcephaly alone and did not include all pregnant women infected with Zika virus.^{11,12} Similarly, variation in the case definition of Zika virus infection by different groups, particularly the reliance on serologic diagnosis in endemic areas, complicates the interpretation of results owing to the cross-reactivity of antibodies with other common flaviviruses, such as dengue virus.^{13,14} Although microcephaly was among the birth defects initially associated with congenital Zika virus, additional brain abnormalities have been identified in its absence, and the spectrum of postnatal abnormalities is not yet fully characterized.^{10,15-19} Reports have primarily focused on the predictive value of prenatal ultrasonography in identifying microcephaly among affected neonates.²⁰ However, it is likely that not all Zika virus-infected fetuses will be affected to the same degree, such as with cytomegalovirus infection²¹; thus, focusing prenatal diagnosis on the detection of microcephaly will fail to identify all infants at risk for adverse outcome.

As such, the challenge for clinicians is to identify which maternal Zika virus infections will have an abnormal neonatal outcome.^{1,22} Prenatal screening of potentially infected fetuses is critical for patient counseling of pregnancy care options, as well as optimizing the delivery setting and care of the neonate. However, the association of prenatal ultrasonographic findings with neonatal outcomes from Zika virus infection remains to be fully defined. The aim of this study was to assess the association between prenatal ultrasonographic findings and neonatal outcomes among pregnant women with confirmed Zika virus infection.

Methods

Study Design and Participants

This was a nested, prospective cohort study evaluating the clinical manifestations and neonatal outcomes of symptomatic Zika virus infection during pregnancy. Data were reported according to the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) reporting guidelines for cohort studies. This study was approved by the institutional review boards at Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil, and the University of California, Los Angeles, and considered exempt at the University of California, San Francisco. Written informed consent was obtained from each patient at the time of enrollment. From September 1, 2015, through May 31, 2016, 345 pregnant women

who presented to Fundação Oswaldo Cruz with a rash the previous 5 days were eligible and included after providing informed consent. Details of the initial cohort have been previously described.² No fetal malformations were identified before study enrollment, and the study population was without chronic medical conditions. All of the patients underwent serologic or molecular testing for dengue, chikungunya, measles, parvovirus B19, cytomegalovirus, HIV, and syphilis as part of the study protocol and through routine prenatal care through Brazilian guidelines. In this study, we included women with a positive result for Zika virus confirmed by serum or urine reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) who underwent at least 1 prenatal ultrasonography session after infection and had known neonatal outcomes. All infants were born and examined at Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, Brazil, a tertiary maternal and pediatric referral center. Gestational age was confirmed by the earliest ultrasonographic measurements available (either through prenatal records or at the study site) in all patients.

Procedures

All patients who were included in the study were referred for prenatal ultrasonography at enrollment, between 20 and 30 weeks' gestation, and after 30 weeks' gestation per national guidelines. Perinatologists certified by the Brazilian College of Radiology and Diagnostic Imaging and the Brazilian Federation of Gynecology and Obstetrics Associations (FEBRASGO) performed all prenatal ultrasonography with a 4-mHz to 8-mHz probe (Voluson 730 Expert or Voluson E6; GE Healthcare). Standard fetal biometric measurements (biparietal diameter, head circumference, abdominal circumference, and femur length) were obtained as well as an anatomic survey of the fetus as previously described. The Hadlock formula and standards were used to define fetal growth restriction (fetal weight <10th percentile) and macrosomia (fetal weight >90th percentile) for gestational age.²³ Microcephaly was defined as fetal head circumference less than 2 SDs below the mean for a given gestational age or below the third percentile for gestational age as per standards set by the Brazilian Ministry of Health.²⁴ Ventriculomegaly was defined as the downside lateral ventricle at the level of the atria measuring 10mm or more. Mega cisterna magna was defined as a cisterna magna measurement greater than 10mm on the oblique transverse plane in the setting of normal cerebellar hemispheres and vermis. Oligohydramnios and polyhydramnios were defined as a deepest vertical pocket less than 2 cm and greater than 8 cm, respectively. Placentomegaly was defined as greater than 4 cm in maximal placenta thickness. For Doppler studies, the pulsatility indexes of the umbilical artery and middle cerebral artery (MCA) were defined as abnormal if greater than the 95th percentile or if the peak systolic velocity of the MCA was greater than 1.5 multiples of the median. Detailed prenatal ultrasonographic data were collected prospectively and abstracted for each patient. Each patient was considered as a single case, irrespective of the number of ultrasonographic scans performed. The ultrasonographic result was defined as abnormal if any of the following was noted on at least 1 examination: any structural anomaly, abnormal fetal growth measurements (fetal growth restriction or macrosomia), abnormal umbilical artery or MCA Doppler measurements, abnormal amniotic fluid assessment (oligohydramnios or polyhydramnios), or placentomegaly. Abnormal results found on ultrasonography were then categorized as a Zika-associated abnormality or an ultrasonographic finding of unknown significance in Zika infection. Zika-associated ultrasonographic findings included any major central nervous system (CNS) abnormality (microcephaly, calcifications, ventriculomegaly, Blake pouch cyst, cerebellar vermis hypoplasia, or agenesis of the corpus callosum), fetal growth restriction, or arthrogryposis. Ultrasonographic findings of unknown significance in Zika infection included those not previously described in Zika infection and of unclear clinical significance if they were to be identified in isolation, such as abnormal Doppler results, amniotic fluid abnormalities, macrosomia, placentomegaly, mega cisterna magna, and others.

Perinatal data collected at the time of birth included gestational age at delivery, mode of

delivery, neonatal intensive care unit (NICU) admission, duration of NICU admission, and perinatal death. All neonates had physical examinations performed by pediatricians from the study team, including neonatologists, pediatric infectious disease specialists, geneticists, and neurologists. Funduscopic eye examinations were performed by trained pediatric ophthalmologists as previously described.²⁵ Hearing assessments were performed through brainstem evoked response audiometry. Anthropometric measures at birth were obtained for all live births as previously described, and microcephaly at birth was defined as a head circumference z score less than -2.2 . Small and large for gestational age were defined per International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (INTERGROWTH-21st) standards.²⁶ Neuroimaging was performed at the clinician's discretion or patient preference by transfontanelle ultrasonography, computerized tomography of the brain, or brain magnetic resonance imaging. Not all infants underwent eye, hearing, or neuroimaging studies. The primary outcome was a composite adverse neonatal outcome, defined as perinatal death (stillbirth or death within 28 days of life), an abnormal finding on neonatal examination, or an abnormal finding on postnatal neuroimaging.

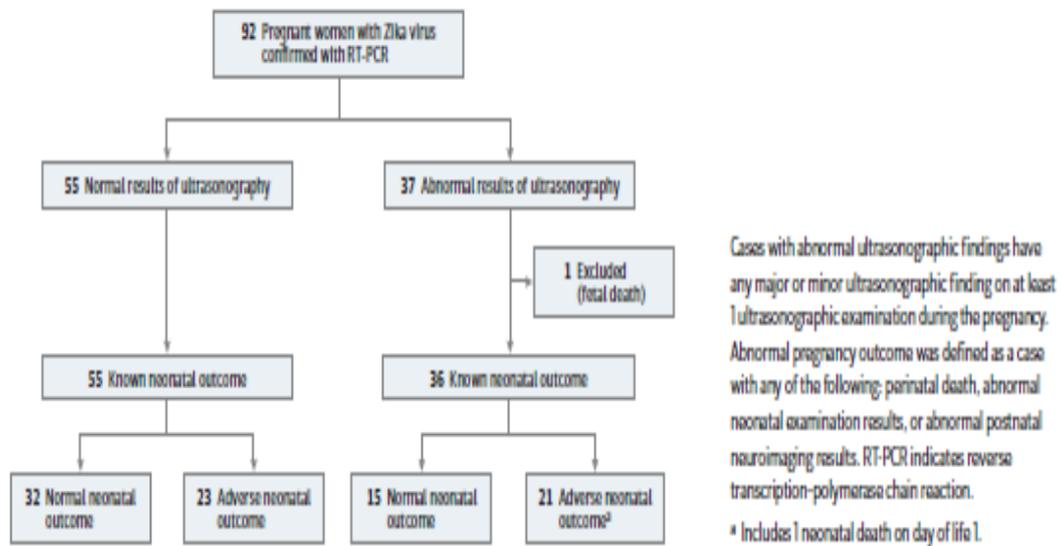
Statistical Analysis

We analyzed the association between prenatal ultrasonographic findings and neonatal outcomes. Secondary outcomes were associations between abnormal results on ultrasonography and adverse neonatal outcomes at neonatal examination or abnormal postnatal neuroimaging results. Categorical variables were compared with the Fisher exact test or χ^2 test, and continuous variables were compared using a 2-tailed *t* test (parametric) or Wilcoxon rank sum test (nonparametric). Adjusted odds ratios (aORs) and 95% CIs were calculated by multivariate logistic regression. All *P* values were 2-sided and were considered statistically significant if less than .05. Statistical analysis was performed using Stata, version 14.2 (Stata Corp). When data were missing or not obtained, the appropriate denominator was indicated in the tables.

Results

During the study period, 182 pregnant women (mean [SD] maternal age at enrollment, 29.4 [6.3] years) had positive results for Zika virus confirmed by RT-PCR and were offered ultrasonographic examination, of whom 92 pregnant women (51%) opted for at least 1 prenatal ultrasonographic examination and had known neonatal outcomes. The most common reason stated for declining prenatal ultrasonography was fear of discovering a fetal anomaly with no ability to change the pregnancy outcome. Of the 92 mother-neonate dyads included in the final analysis, 55 pregnant women (60%) had normal results on ultrasonography and 37 pregnant women (40%) had at least 1 abnormal result on ultrasonography (Figure). In patients with normal results on prenatal ultrasonography, all pregnancies resulted in live births, from which 23 of 55 neonates (42%) had an adverse neonatal outcome. Of the 37 patients with abnormal findings on prenatal ultrasonography, there was 1 fetal death at 36 weeks' gestation, and 21 of 36 neonates (58%) had an abnormal outcome, including 1 neonatal death on day 1 of life.

Figure. Flow of Patients Through the Study



The spectrum and classification of prenatal ultrasonographic findings are shown in Table 1. Thirty-seven of the 92 pregnant women (40%) were found to have at least 1 abnormal finding on prenatal ultrasonography. Ultrasonographic findings were grouped into Zika-associated abnormalities and findings of unknown significance in Zika infection. The most common Zika associated abnormalities were CNS abnormalities (10 of 92 fetuses [11%]), including microcephaly, calcifications, and ventriculomegaly. Abnormal umbilical artery and MCA Doppler abnormalities were also found in 5 (5%) and 16 (17%) fetuses, respectively, and were sometimes transiently abnormal. There were 26 fetuses with an isolated ultrasonographic finding of unknown significance. All cases with a Zika-associated abnormal result on ultrasonography had at least 1 ultrasonographic finding with no prior association with Zika infection, most commonly abnormal Doppler measurements. Comparison of baseline characteristics between pregnant women with normal results on ultrasonography vs those with abnormal results on ultrasonography revealed that pregnant women with abnormal results on ultrasonography were younger (mean [SD] age, 27.8 [6.5] years for pregnant women with normal ultrasonographic results vs 30.5 [6.1] years for pregnant women with abnormal ultrasonographic results; $P = .05$) and underwent more frequent ultrasonographic examinations (mean [SD] of 3.5 [1.9] examinations for pregnant women with normal ultrasonographic results vs 2.6 [1.3] examinations for pregnant women with abnormal ultrasonographic results; $P = .01$) (eTable 1 in the Supplement). There were no significant differences in gestational age at the time of Zika virus infection between the 2 groups. One pregnant woman had

Table 1. Classification of Abnormal Findings on Prenatal Ultrasonography Among 92 Women Diagnosed During Pregnancy With Zika Virus Infection

Classification of Abnormal Prenatal Ultrasonographic Findings	No. of Pregnant Women (% of Total Cohort) ^a
Any abnormal finding	37 (40)
Zika virus-associated abnormal finding	11 (12)
Major CNS abnormality	10 (11)
Microcephaly	7 (8)
Calcifications	9 (10)
Ventriculomegaly	6 (7)
Blake pouch cyst	3 (3)
Cerebellar vermis hypoplasia	3 (3)
Agonesis of the corpus callosum	2 (2)
Fetal growth restriction	7 (8)
Arthrogryposis	1 (1)
Findings of unknown significance	37 (40)
Minor result only	26 (28)
Abnormal Doppler examination finding	17 (18)
Umbilical artery	5 (5)
Middle cerebral artery	16 (17)
Fluid abnormalities	13 (14)
Oligohydramnios	6 (7)
Polyhydramnios	7 (8)
Placentalomegaly	11 (12)
Macrosomia	8 (9)
Mega cisterna magna	4 (4)
Other ^b	8 (9)

Abbreviation: CNS, central nervous system.

^a The total cohort was 92 pregnant women. Pregnant women may have more than 1 finding.

^b Included pelviectasis (n = 2), brachycephaly (n = 2), hypoechogenic area in chest (n = 2), choroid plexus cyst (n = 1), and liver calcification (n = 1).

a positive test result for co-infection with chikungunya virus by RT-PCR; this pregnant woman had a normal result on prenatal ultrasonography and a normal neonatal outcome. There were no differences in serologic evidence of other congenital infections, including chikungunya virus, cytomegalovirus, dengue, measles, syphilis, and toxoplasmosis (data not shown).

Perinatal outcomes for the 91 liveborn infants in the 2 groups (normal ultrasonographic results group and abnormal ultrasonographic results group) are shown in **Table 2**. The median gestational age at delivery was 38.6 weeks (interquartile range, 37.9-39.3 weeks). There were no significant between-group differences in gestational age at delivery, neonate sex, preterm birth, birth weight, or emergency cesarean delivery. The abnormal ultrasonographic results group was more likely to require admission to the NICU (11 of 36 neonates [31%] in the abnormal ultrasonographic results group vs 7 of 54 [13%] in the normal ultrasonographic results group; $P = .04$). Most NICU admissions were for full-term infants born after 37 weeks' gestation. There were 6 cases of neonatal microcephaly, all of which were detected on prenatal ultrasonography. Both cases of perinatal death had an abnormal finding on prenatal ultrasonography.

A composite adverse neonatal outcome was determined for each fetus in the abnormal ultrasonographic results group. Of the 92 mother-neonate dyads, 45 neonates (49%) had an adverse neonatal outcome (eTable 2 in the [Supplement](#)). There were 2 perinatal deaths. One fetal death occurred at 36 weeks' gestation. In this case, maternal infection occurred at 25 weeks, and the pregnant woman had a normal ultrasonographic finding at 30 weeks, followed by a second ultrasonographic scan at 33 weeks that showed abnormal MCA Doppler measurements. The other was a neonatal death occurring on day 1 of life in an infant with multiple CNS anomalies, hydrocephalus, arthrogryposis, and severe fetal growth restriction. There were 41 of 91 neonates (45%) with abnormal results on neonatal examination. The most common abnormal findings on neonatal examination were hypertonia (n = 12), seizures (n = 8), hypotonia (n = 6), microcephaly (n = 6), congenital contractures (n = 3), and dysmorphic features (n = 3). Of the 64 infants who underwent a fundoscopic eye examination, 8 (13%) were found to have ophthalmologic findings

consistent with congenital Zika syndrome. Three of the 27 neonates had hearing loss when given a hearing test. Postnatal neuroimaging was performed in 68 neonates, of whom 23 (34%) had abnormal results. In this cohort of 92 neonates whose mothers had prenatal ultrasonography, there was no association between gestational age at delivery, gestational age at time of Zika virus infection,

Table 2. Neonatal Outcomes According to Ultrasonographic Findings Among Women Diagnosed During Pregnancy With Zika Virus Infection^a

Neonatal Outcome	Prenatal Ultrasonographic Finding, No./Total No. (%)		P Value ^b
	Normal (n = 55)	Abnormal (n = 36)	
Gestational age at birth, median (IQR), wk	38.7 (34.4-41.0)	38.4 (32.7-42.0)	.06
Preterm, <37 wk gestational age	5 (9)	7 (19)	.15
Male sex	29 (53)	20 (56)	.79
Cesarean delivery	31/45 (69)	24/31 (77)	.41
Emergency cesarean delivery	5/26 (19)	6/16 (38)	.19
Birth weight, mean (SD), g	3175 (410)	3154 (584)	.84
Low birth weight, <2500 g	4 (7)	4 (11)	.71
Macrosomia, >4000 g	1 (2)	2 (6)	.56
Weight percentiles			
Appropriate for gestational age	45 (82)	23 (64)	.05
Small for gestational age	4 (7)	7 (19)	.11
Large for gestational age	6 (11)	6 (17)	.43
NICU admission	7/54 (13)	11/36 (31)	.04
Preterm, <37 wk gestational age, (n = 12)	3/5 (60)	4/7 (57)	>.99
Term, ≥37 wk gestational age, (n = 78)	4/49 (8)	7/29 (24)	.05
NICU length of stay, median (IQR), d	2.0 (2-10)	6.5 (1-30)	.62
Postnatal microcephaly	0	6 (17)	.003

Abbreviations: IQR, interquartile range; NICU, neonatal intensive care unit.

^a Neonatal outcomes for all liveborn infants (n = 91). When data were missing, denominators are noted.

^b P values were 2-sided and calculated by the t test, Fisher exact, χ^2 , or Kruskal-Wallis test as appropriate. P values less than .05 were considered significant.

trimester of maternal Zika virus infection, and adverse neonatal outcomes (eTable 3 in the [Supplement](#)).

Associations between abnormal results on prenatal ultrasonography and abnormal results on neonatal examination, abnormal findings on postnatal neuroimaging, and composite adverse neonatal outcome were investigated (Table 3 and eTable 4 in the [Supplement](#)). After adjusting for maternal age and number of ultrasonographic examinations performed, a major Zika virus-associated abnormal finding on ultrasonography, which occurred in 11 of the 92 pregnant women (12%), was associated with significantly increased probability of abnormal results on neonatal examination (aOR, 11.6; 95%CI, 1.8-72.8), abnormal results on postnatal neuroimaging (aOR, 6.7; 95%CI, 1.1-38.9), and composite adverse neonatal outcome (aOR, 27.2; 95%CI, 2.5-296.6). Abnormalities of the CNS and fetal growth restriction were both associated with significantly increased risk of composite adverse neonatal outcome (aOR, 2.2; 95%CI, 2.4-301.5] for CNS abnormalities and 14.6; 95%CI, 1.2-174.0 for fetal growth restriction). Abnormal MCA Doppler measurements were associated with abnormal results on neonatal examination (aOR, 12.8; 95%CI, 2.6-63.2), postnatal neuroimaging (aOR, 8.8; 95%CI, 1.7-45.9), and composite adverse neonatal outcome (aOR, 20.5; 95%CI, 3.2-132.6). Oligohydramnios was associated with an increased risk of abnormal result on neonatal examination (aOR, 13.5; 95%CI, 1.1-170.3).

Table 4 shows the distribution of the mother-neonate dyads with abnormal results on prenatal ultrasonography (n = 37), abnormal results on neonatal examination (n = 41), and abnormal results on postnatal neuroimaging (n = 23). Of the 37 pregnant women with abnormal results on prenatal ultrasonography, 20 neonates (54%) had an abnormal result on neonatal examination and 27 neonates (73%) had at least 1 postnatal neuroimaging study, of whom 12 of the 27 neonates (44%) had an abnormal result. Two neonates had both normal results on prenatal ultrasonography and on neonatal examinations but abnormal results on postnatal neuroimaging: 1 neonate had a posterior fossa hemorrhage and the second neonate had cerebral calcifications that were not detected antenatally. Detailed descriptions of neonatal outcome for each case by mother-neonate dyad are shown in the supplemental material (eTable 5 in the [Supplement](#)).

In our cohort, an abnormal result on prenatal ultrasonography had a sensitivity of 48.9% (95% CI, 33.7%-64.2%) and a specificity of 68.1% (95%CI, 52.9%-80.1%) for association with a composite

adverse neonatal outcome. For a major Zika-associated abnormal result on prenatal ultrasonography, the sensitivity was lower (22.2%; 95%CI, 11.2%-37.1%), but the specificity was higher (97.9%; 95% CI, 88.7%-99.9%). In this study of pregnant women with confirmed Zika virus infection, the positive predictive value of any abnormality on prenatal ultrasonography for composite adverse neonatal outcome was 59.5%(95%CI, 46.7%-71.0%) and the negative predictive value was 58.2%(95%CI, 49.6%-66.3%); for major, Zika-associated abnormal results, the positive and negative predictive values for composite adverse neonatal outcome were 90.9%(95%CI, 57.2%-98.7%) and 56.8% (95%CI, 52.8%to 60.7%), respectively.

Discussion

In this study, we describe the spectrum of prenatal ultrasonographic findings in Zika virus–confirmed pregnancies and evaluate the associations with neonatal examination and postnatal neuroimaging abnormalities. We found that major Zika virus–associated abnormalities observed on prenatal ultrasonography were associated with a 6-fold to 27-fold increase in the odds of composite adverse neonatal outcomes of abnormal results on neonatal examination or postnatal neuroimaging. Specific ultrasonographic findings associated with adverse neonatal outcome include CNS abnormalities, cerebral calcifications, ventriculomegaly, fetal growth restriction, and abnormal MCA Doppler measurements. The sensitivity of prenatal ultrasonography to predict overall composite adverse neonatal outcomes was low (48.9%) because more than half of the patients with abnormal results on neonatal examinations had no structural findings on prenatal ultrasonography. This study adds to

Table 3. Adjusted Associations Between Prenatal Ultrasonographic Result and Neonatal Outcomes Among Women Diagnosed During Pregnancy With Zika Virus Infection

	Neonatal Examination			Postnatal Neuroimaging			Composite Neonatal Outcome			
	Normal Result, No. (%) (n = 51) ^b	Abnormal Result, No. (%) (n = 41) ^b	aOR (95% CI)	Normal Result, No. (%) (n = 45)	Abnormal Result, No. (%) (n = 23)	aOR (95% CI) ^b	Normal Result, No. (%) (n = 47)	Abnormal Result, No. (%) (n = 45) ^b	aOR (95% CI) ^b	p Value
Ultrasonographic Result										
Amygdala finding (n = 37)	17 (33.3)	20 (48.8)	2.15 (0.9-5.3)	16 (35.6)	12 (52.2)	1.5 (0.5-4.4)	15 (31.9)	22 (48.9)	2.4 (1.0-5.8)	
Zika virus-associated abnormal finding (n = 11) ^c	2 (3.9)	9 (22.0)	11.6 (1.8-77.8)	2 (4.4)	7 (30.4)	6.7 (1.1-38.9)	1 (2.1)	10 (22.2)	27.2 (2.5-296.6)	
CNS abnormality (n = 10)	2 (3.9)	8 (19.5)	11.0 (1.7-73.4)	1 (2.2)	7 (30.4)	13.9 (1.4-140.0)	1 (2.1)	9 (20.0)	27.2 (2.4-310.5)	
Microcephaly (n = 7)	1 (2.0)	6 (14.6)	23.4 (1.8-296.5)	0	5 (21.7)	NA	1 (2.1)	6 (13.3)	17.8 (1.4-218.9)	.003 ^d
Calcifications (n = 9)	7 (17.1)	7 (17.1)	9.2 (1.4-61.6)	1 (2.2)	6 (26.1)	11.5 (1.1-118.1)	1 (2.1)	8 (17.8)	22.8 (2.0-257.2)	
Ventriculomegaly (n = 6)	1 (2.0)	5 (12.2)	12.8 (1.1-150.0)	0	5 (21.7)	NA	0	6 (13.3)	NA	.01 ^d
Fetal growth restriction (n = 7)	1 (2.0)	6 (14.3)	18.7 (1.5-229.5)	1 (2.2)	4 (17.4)	4.9 (0.4-57.5)	1 (2.1)	6 (13.3)	14.6 (1.2-175.0)	
Ultrasonographic findings of unknown significance (n = 37)	17 (33.3)	20 (48.8)	2.2 (0.9-5.3)	16 (35.6)	12 (52.2)	1.5 (0.5-4.4)	15 (31.9)	22 (48.9)	2.4 (1.0-5.8)	
Without Zika virus-associated finding (n = 26)	15 (29.4)	11 (26.8)	0.9 (0.4-2.3)	14 (31.1)	5 (21.7)	0.6 (0.2-2.0)	14 (29.8)	12 (26.7)	0.9 (0.4-2.2)	
Abnormal Doppler results (n = 17)	4 (7.8)	13 (31.7)	7.0 (2.0-31.3)	4 (8.9)	9 (39.1)	4.6 (1.1-20.5)	4 (8.5)	13 (28.9)	6.0 (1.6-23.5)	
Umbilical artery (n = 5)	2 (3.9)	3 (7.3)	2.2 (0.3-14.1)	2 (4.4)	2 (8.7)	1.3 (0.2-11.7)	2 (4.3)	3 (6.7)	1.8 (0.3-11.6)	
Middle cerebral artery (n = 16)	3 (5.9)	13 (31.7)	12.8 (2.6-63.2)	3 (6.7)	10 (43.5)	8.8 (1.7-45.9)	2 (4.3)	14 (31.1)	20.5 (3.2-132.6)	
Fluida in normalities (n = 13)	5 (9.8)	8 (19.5)	2.4 (0.7-8.9)	6 (13.3)	6 (26.1)	1.4 (0.3-5.7)	5 (10.6)	8 (17.8)	2.0 (0.5-7.1)	
Oligohydramnios (n = 6)	1 (2.0)	5 (12.2)	13.5 (1.1-170.3)	2 (4.4)	4 (17.4)	2.2 (0.2-18.2)	1 (2.1)	5 (11.1)	10.8 (0.9-133.7)	
Polyhydramnios (n = 7)	4 (7.8)	3 (7.3)	0.9 (0.2-4.2)	4 (8.9)	2 (8.7)	1.0 (0.2-6.1)	4 (8.5)	3 (6.7)	0.8 (0.2-3.6)	

Abbreviations: aOR, adjusted odds ratio; CNS, central nervous system; NA, not available.

^a The stillbirth case was included and considered to have an abnormal finding on neonatal examination and composite adverse neonatal outcome.

^b The aORs and 95% CIs were calculated by logistic regression, adjusting for maternal age and number of ultrasonographic examinations.

^c Zika virus-associated CNS anomalies included microcephaly, calcifications, ventriculomegaly, Blake pouch cyst, cerebellar vermis hypoplasia, and agenesis of the corpus callosum. Most common findings are shown. See eTable 4 in the Supplement for complete results.

^d When ORs were unable to be calculated, the Fisher exact test was performed and 2-way P values are presented.

the current published literature that is, to date, primarily composed of retrospective studies of patients already with ultrasonographic findings suggestive of congenital Zika syndrome. Our results suggest that prenatal ultrasonography may have a limited ability to provide reassurance of a normal neonatal outcome in maternal Zika virus infection. As we learn more about the spectrum of clinical sequelae of Zika virus infection, it has become clear that congenital Zika syndrome encompasses not only structural malformations (which may be identified by prenatal ultrasonography), but also disorders of neurologic function (which may not be evaluated on routine prenatal ultrasonography). Although previously of unknown significance in Zika virus infection, we have provided an analysis of ultrasonographic measurements that may have potential to be helpful in the identification of fetuses at risk for adverse neonatal outcomes. Although our numbers were small, abnormalities in MCA Doppler measurements and oligohydramnios were associated with adverse neonatal outcomes in our study sample. Monitoring of MCA Doppler measurements and amniotic fluid levels could be important components of fetal monitoring and surveillance. Future research in validating prenatal ultrasonography techniques that could provide clues to functional outcomes is clearly needed. The ability to predict functional outcomes prenatally could guide patient counseling and decision making regarding the pregnancy as well as aid in delivery planning to ensure optimal support services for a potentially affected neonate. As with cerebral palsy, neurodevelopmental outcomes may not manifest in the neonatal period,²⁷ and data on neurobehavioral outcomes in congenital Zika syndrome remain unknown.

Recently, Pomar et al¹³ reported on the spectrum of ultrasonographic findings in an observational cohort of Zika virus–positive patients and found a 9.0% rate of CNS abnormalities and a 1.7% rate of microcephaly. Rates of major CNS abnormalities were similar to those observed in our study; however, other differences between both studies (including a higher rate of microcephaly in our cohort) may be due to varying definitions of Zika virus positivity. All the patients in our cohort were confirmed by serum or urine RT-PCR, whereas Pomar et al included serologic tests to diagnose Zika virus, which may be confounded by cross-reactivity with other arboviruses. Our study only evaluated women who were symptomatic during pregnancy, whereas the study by Pomar et al performed Zika virus screening in pregnant women, of whom only 17.3% (52 of 301 pregnant women) were symptomatic. More prospective data are needed to clarify the Zika virus spectrum of disease and transmission risk in symptomatic vs asymptomatic infections.

Strengths and Limitations

Our study had several strengths. This is a well-characterized prospective cohort of pregnant women and their neonates. All prenatal and postnatal evaluations were conducted at a single institution; a

Table 4. Distribution of Mother-Neonate Dyads by Abnormal Findings on Prenatal Ultrasonography, Neonatal Examination, and Postnatal Neuroimaging Among 92 Women Diagnosed During Pregnancy With Zika Virus Infection

Abnormal Findings	No. of Mother-Neonate Dyads
Prenatal ultrasonography	37
Ultrasonography only	15
Ultrasonography and neonatal examination	20
Ultrasonography and neonatal examination only	10
Ultrasonography and postnatal neuroimaging	12
Ultrasonography and postnatal neuroimaging only	2
Ultrasonography, neonatal examination, and postnatal neuroimaging	10
Neonatal examination	41
Neonatal examination only	12
Neonatal examination and postnatal neuroimaging	19
Neonatal examination and postnatal neuroimaging only	9
Postnatal neuroimaging	23
Postnatal neuroimaging only	2

single protocol was followed by the same group of investigators who examined every patient, with

the same set of diagnostic studies performed on all patients in the same laboratory. This greatly reduced variability in practices and definitions used in the study, thus favoring reproducibility of results. Prenatal ultrasonographic studies were interpreted prior to delivery and neonatal outcomes obtained shortly after delivery. Second, maternal Zika virus infection was confirmed molecularly by RT-PCR at the time of acute infection. In addition, the presence of other congenital infections (which could lead to CNS findings) was rigorously excluded in all patients.

Our study also had several limitations. One potential limitation is that this cohort is derived from patients at a single study site in Brazil, which may limit the generalizability of our findings to other regions that have reported varying rates of birth defects from Zika virus infection.¹ Because this was an observational cohort, many women enrolled in the parent study declined prenatal ultrasonographic examination, citing the burden of traveling to the obstetrical facility (although all were offered transportation from their homes) or fear of possible fetal abnormalities related to Zika virus infection.² This could contribute to selection bias in our cohort, although patient autonomy in decision making surrounding prenatal screening tests is a real-world consideration. Although most of the neonates in our cohort underwent transfontanelle ultrasonography, this study is unable to compare the relative performance of computed tomography, magnetic resonance imaging, or transfontanelle ultrasonography in identifying clinically significant lesions because not every infant underwent each modality. However, we did not find that the prenatal identification of an ultrasonographic abnormality was associated with increased use of postnatal neuroimaging in our study population. Neonates with concerning findings on neonatal examination were more likely to undergo further evaluation with postnatal neuroimaging.

Conclusions

In the setting of confirmed Zika virus infection in pregnancy, prenatal ultrasonography is a useful tool for anticipating an association with adverse neonatal outcomes, but its negative predictive value for adverse neonatal outcomes is low. This information is critical for patient counseling and to prepare clinicians to optimize postnatal care and follow-up for Zika virus–exposed pregnancies.

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: October 29, 2018.

Published: December 28, 2018. doi:[10.1001/jamanetworkopen.2018.6529](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.6529)

Open Access: This is an open access article distributed under the terms of the [CC-BY License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).^c2018 Pereira JP Jr et al. *JAMA Network Open*.

Corresponding Author: Stephanie L. Gaw, MD, PhD, Maternal-Fetal Medicine, Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, University of California, San Francisco, 513 Parnassus Ave, 16HSE Box 0556, San Francisco, CA 94143 (stephanie.gaw@ucsf.edu).

Author Affiliations: Instituto Nacional de Saude da Mulher, da Crianca e do Adolescente Fernandes Figueira–Fundacao Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (Pereira, Cardozo, Valle, Dutra, Gama, Zin, Vasconcelos, Moreira); Division of Pediatric Infectious Diseases, Department of Pediatrics, University of California, Los Angeles (Nielsen-Saines, Adachi); Division of Maternal-Fetal Medicine, Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, University of California, San Francisco (Sperling, Maykin, Gaw); Laboratorio de Doencas Febris Agudas, Instituto de Infectologia Evandro Chagas–Fundacao Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (Damasceno, Brasil); Jules Stein Eye Institute, Retina Division, UCLA (University of California, Los Angeles) (Tsui).

Author Contributions: Drs Pereira and Gaw had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of data analysis.

Concept and design: Pereira, Nielsen-Saines, Brasil, Moreira, Gaw.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: Pereira, Nielsen-Saines, Sperling, Maykin, Damasceno, Cardozo, Valle, Dutra, Gama, Adachi, Zin, Tsui, Vasconcelos, Moreira, Gaw.

Drafting of the manuscript: Nielsen-Saines, Sperling, Maykin, Gaw.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Pereira, Nielsen-Saines, Adachi, Zin, Tsui, Vasconcelos, Brasil, Moreira.

Statistical analysis: Nielsen-Saines, Sperling, Gaw.

Obtained funding: Nielsen-Saines, Zin, Tsui, Moreira, Gaw.

Administrative, technical, or material support: Nielsen-Saines, Damasceno, Cardozo, Valle, Dutra, Gama, Vasconcelos.

Supervision: Pereira, Nielsen-Saines, Zin, Moreira.

Conflict of Interest Disclosures: Dr Adachi reported receiving grants from the Thrasher Research Foundation. No other disclosures were reported.

Funding/Support: This work was supported by grants K12 HD000849 from the Reproductive Scientist Development Program of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development of the National Institutes of Health (Dr Gaw), 441098/2016-9 from the Departamento de Ciencia e Tecnologia do Ministerio da Saude do Brasil (Dr Moreira), E_18/2015TXB from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Dr Moreira), R21AI28697 and R21AI29534-01 from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Dr Nielsen-Saines), R21EY028318 from the National Eye Institute (Drs Nielsen-Saines and Tsui), 205377/Z/16/Z from Wellcome Trust (Dr Moreira), and 734584 from European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (Dr Moreira); the BurroughsWellcome Fund for the Reproductive Scientist Development Program (Dr Gaw), the Queenan Fellowship from the Foundation for the Society of Maternal-Fetal Medicine (Dr Gaw), UK Department for International Development, and the University of California, San Francisco National Center of Excellence in Women's Health.

Role of the Funder/Sponsor: The funders had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or decision to submit the manuscript for publication.

Additional Contributions: We thank the mothers and their children for participating in the study.

REFERENCES

- Hobbins JC, Platt LD, Copel JA, et al. Gottesfeld-Hohler Memorial Foundation Zika virus think tank summary. *Obstet Gynecol*. 2018;131(4):661-665. doi:[10.1097/AOG.0000000000002538](https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002538)
- Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2321-2334. doi:[10.1056/NEJMoa1602412](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412)
- Vouga M, Baud D. Imaging of congenital Zika virus infection: the route to identification of prognostic factors. *Prenat Diagn*. 2016;36(9):799-811. doi:[10.1002/pd.4880](https://doi.org/10.1002/pd.4880)
- Honein MA, Dawson AL, Petersen EE, et al; US Zika Pregnancy Registry Collaboration. Birth defects among fetuses and infants of US women with evidence of possible Zika virus infection during pregnancy. *JAMA*. 2017;317(1):59-68. doi:[10.1001/jama.2016.19006](https://doi.org/10.1001/jama.2016.19006)
- Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *Lancet*. 2016;387(10033):2125-2132. doi:[10.1016/S0140-6736\(16\)00651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6)
- de Fatima Vasco Aragao M, van der Linden V, Brainer-Lima AM, et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ*. 2016;353:i1901. doi:[10.1136/bmj.i1901](https://doi.org/10.1136/bmj.i1901)
- de Araujo TVB, Ximenes RAA, Miranda-Filho DB, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):328-336. doi:[10.1016/S1473-3099\(17\)30727-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30727-2)
- Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*. 2016;388(10047):898-904. doi:[10.1016/S0140-6736\(16\)30883-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30883-2)
- Soares de Oliveira-Szejnfeld P, Levine D, Melo AS de O, et al. Congenital brain abnormalities and Zika virus: what the radiologist can expect to see prenatally and postnatally. *Radiology*. 2016;281(1):203-218. doi:[10.1148/radiol.2016161584](https://doi.org/10.1148/radiol.2016161584)
- Melo AS de O, Aguiar RS, Amorim MM, et al. Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol*. 2016;73(12):1407-1416. doi:[10.1001/jamaneurol.2016.3720](https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.3720)
- Meneses JDA, Ishigami AC, de Mello LM, et al. Lessons learned at the epicenter of Brazil's congenital Zika epidemic: evidence from 87 confirmed cases. *Clin Infect Dis*. 2017;64(10):1302-1308. doi:[10.1093/cid/cix166](https://doi.org/10.1093/cid/cix166)
- Sarno M, Aquino M, Pimentel K, et al. Progressive lesions of central nervous system in microcephalic fetuses with suspected congenital Zika virus syndrome. *Ultrasonography Obstet Gynecol*. 2017;50(6):717-722. doi:[10.1002/uog.17303](https://doi.org/10.1002/uog.17303)
- Pomar L, Malinger G, Benoist G, et al. Association between Zika virus and fetopathy: a prospective cohort study in French Guiana. *Ultrasonography Obstet Gynecol*. 2017;49(6):729-736. doi:[10.1002/uog.17404](https://doi.org/10.1002/uog.17404)

14. Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, et al; MTS. Interim guidance for interpretation of Zika virus antibody test results. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(21):543-546. doi:[10.15585/mmwr.mm6521e1](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6521e1)
15. Aragao MFVV, Holanda AC, Brainer-Lima AM, et al. Nonmicrocephalic infants with congenital Zika syndrome suspected only after neuroimaging evaluation compared with those with microcephaly at birth and postnatally: how large is the Zika virus “iceberg”? *AJNR Am J Neuroradiol*. 2017;38(7):1427-1434. doi:[10.3174/ajnr.A5216](https://doi.org/10.3174/ajnr.A5216)
16. van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, 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*. 2016;65(47):1343-1348. doi:[10.15585/mmwr.mm6547e2](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6547e2)
17. Reynolds MR, Jones AM, Petersen EE, et al; US Zika Pregnancy Registry Collaboration. Vital signs: update on Zika virus-associated birth defects and evaluation of all US infants with congenital Zika virus exposure—US Zika pregnancy registry, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017;66(13):366-373. doi:[10.15585/mmwr.mm6613e1](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6613e1)
18. Parra-Saavedra M, Reefhuis J, Piraquive JP, et al. Serial head and brain imaging of 17 fetuses with confirmed Zika virus infection in Colombia, South America. *Obstet Gynecol*. 2017;130(1):207-212. doi:[10.1097/AOG.0000000000002105](https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002105)
19. Sanz Cortes M, Rivera AM, Yopez M, et al. Clinical assessment and brain findings in a cohort of mothers, fetuses and infants infected with Zika virus. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218(4):440.e1-440.e36. doi:[10.1016/j.ajog.2018.01.012](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.01.012)
20. Chibueze EC, Parsons AJQ, Lopes KDS, et al. Diagnostic accuracy of ultrasonography scanning for prenatal microcephaly in the context of Zika virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):2310. doi:[10.1038/s41598-017-01991-y](https://doi.org/10.1038/s41598-017-01991-y)
21. Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfeld P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol*. 2001;97(3):443-448.
22. Adebajo T, Godfred-Cato S, Viens L, et al; Contributors. Update: interim guidance for the diagnosis, evaluation, and management of infants with possible congenital Zika virus infection—United States, October 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017;66(41):1089-1099. doi:[10.15585/mmwr.mm6641a1](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6641a1)
23. Hadlock FP, Harrist RB, Martinez-Poyer J. In utero analysis of fetal growth: a sonographic weight standard. *Radiology*. 1991;181(1):129-133. doi:[10.1148/radiology.181.1.1887021](https://doi.org/10.1148/radiology.181.1.1887021)
24. Microcephaly Epidemic Research Group. Microcephaly in infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(6):1090-1093. doi:[10.3201/eid2206.160062](https://doi.org/10.3201/eid2206.160062)
25. Zin AA, Tsui I, Rossetto J, et al. Screening criteria for ophthalmic manifestations of congenital Zika virus infection. *JAMA Pediatr*. 2017;171(9):847-854. doi:[10.1001/jamapediatrics.2017.1474](https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1474)
26. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, 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*. 2014;384(9946):857-868. doi:[10.1016/S0140-6736\(14\)60932-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60932-6)
27. Granild-Jensen JB, Rackauskaite G, Flachs EM, Uldall P. Predictors for early diagnosis of cerebral palsy from national registry data. *Dev Med Child Neurol*. 2015;57(10):931-935. doi:[10.1111/dmcn.12760](https://doi.org/10.1111/dmcn.12760)

SUPPLEMENT.

eTable 1. Patient Demographics

eTable 2. Classification of Adverse Neonatal Outcomes

eTable 3. Association Between Trimester of Infection and Neonatal Outcome

eTable 4. Unadjusted Associations Between Prenatal Ultrasound and Neonatal Outcomes

eTable 5. Detailed Neonatal Outcomes by Mother-Neonate Dyad

Supplementary Online Content

Pereira JP Jr, Nielsen-Saines K, Sperling J, et al. Association of prenatal ultrasonographic findings with adverse neonatal outcomes among pregnant women with Zika virus infection in Brazil. *JAMA Netw Open*. 2018;1(8):e186529. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.6529

eTable 1. Patient Demographics

eTable 2. Classification of Adverse Neonatal Outcomes

eTable 3. Association Between Trimester of Infection and Neonatal Outcome

eTable 4. Unadjusted Associations Between Prenatal Ultrasound and Neonatal Outcomes

eTable 5. Detailed Neonatal Outcomes by Mother-Neonate Dyad

This supplementary material has been provided by the authors to give readers additional information about their work.

eTable 1. Patient Demographics

	Prenatal ultrasound		<i>p</i>
	Normal (n=55)	Abnormal (n=37)	
Maternal age (years)	30.5 ± 6.1	27.8 ± 6.5	0.05
Advanced maternal age (≥ 35 years)	13 (23.6%)	5 (13.5%)	0.23
No. of ultrasound examinations performed	2.6 ± 1.3	3.5 ± 1.9	0.01
Gestational age at infection (median weeks (range))	18.3 (4.0-31.3)	14.6 (4.3-35.1)	0.11
First trimester infection (< 14 weeks, n=30)	14 (25.5%)	16 (43.2%)	0.07
Second trimester infection (14 to 27 weeks, n=59)	40 (72.7%)	19 (51.3%)	
Third trimester infection (≥ 28 weeks, n=3)	1 (1.8%)	2 (5.4%)	

Data presented as mean ± standard deviation or n (%) unless otherwise noted. *P* values are two-sided and calculated by t-test, chi-squared, Fisher's exact test, or Kruskal-Wallis as appropriate. *P* values < 0.05 are considered significant.

eTable 2. Classification of Adverse Neonatal Outcomes

	n	%
Abnormal outcomes	45/92	48.9
Perinatal death	2	2.2
Fetal demise	1	1.1
Neonatal demise (<28 days of life)	1	1.1
Abnormal neonatal examination*	41/91	45.1
Physical examination	39	42.4
Fundoscopic exam of eye	8/64	12.5
Hearing exam	3/27	11.1
Abnormal postnatal Imaging	23/68	33.8
Transfontanelle ultrasound	11/62	17.7
Head CT	7/17	41.2
Head MRI	17/40	42.5

Data is presented as n (%). Not all infants underwent each examination or study; the denominator for each is indicated. CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging. Abnormal neonatal outcomes include perinatal death, abnormal neonatal examination, and/or abnormal imaging findings.

eTable 3. Association Between Trimester of Infection and Neonatal Outcome

	Neonatal examination			Postnatal Neuroimaging			Composite Neonatal Outcome		
	Normal (n=51)	Abnormal (n=41)	<i>p</i>	Normal (n=45)	Abnormal (n=23)	<i>p</i>	Normal (n=47)	Abnormal (n=45)	<i>p</i>
Gest. age at birth	39.0 (38.0 to 39.1)	38.2 (37.9 to 39.3)	0.29	38.7 (38.0 to 39.6)	38.6 (37.1 to 39.3)	0.40	39.0 (38.0 to 39.1)	38.2 (37.5 to 39.3)	0.27
Gest. age at infection	16.0 (10.9 to 20.6)	18.1 (13.6 to 22.4)	0.15	18.3 (15.3 to 23.3)	14.6 (9.3 to 21.4)	0.13	15.7 (10.9 to 20.6)	18.0 (13.6 to 22.4)	0.13
1st trimester (n=30)	19 (37.3%)	11 (26.8%)	0.45	10 (22.2%)	9 (39.1%)	0.20	18 (38.3%)	12 (26.7%)	0.48
2nd trimester (n=59)	31 (60.8%)	28 (69.3%)		32 (71.1%)	14 (60.9%)		28 (59.6%)	31 (68.9%)	
3rd trimester (n=3)	1 (2.0%)	2 (4.9%)		3 (6.7%)	0 (0%)		1 (2.1%)	2 (4.4%)	

Data are presented as median weeks (IQR) or n (%). *P* values are two-sided and calculated from Kruskal-Wallis or Fisher exact tests as appropriate. *P* values < 0.05 were considered significant. Not all infants underwent each examination or study; the denominator for each is indicated. Abnormal composite neonatal outcomes include perinatal death, abnormal neonatal examination, and/or abnormal imaging findings. The stillbirth case was included and considered to have an abnormal neonatal exam and abnormal composite neonatal outcome.

Table 4. Unadjusted Associations Between Prenatal Ultrasound and Neonatal Outcomes

	Neonatal examination			Postnatal Neuroimaging			Composite Neonatal Outcome		
	Normal (n=51)	Abnormal (n=41)	OR (95% CI)	Normal (n=45)	Abnormal (n=23)	OR (95% CI)	Normal (n=47)	Abnormal (n=45)	OR (95% CI)
Abnormal prenatal US (n=37)	17 (33.3%)	20 (48.8%)	1.9 (0.8 to 4.4)	16 (35.6%)	12 (52.2%)	2.0 (0.7 to 5.5)	15 (31.9%)	22 (48.9%)	2.0 (0.9 to 4.8)
Zika-associated US finding (n=11)	2 (3.9%)	9 (22.0%)	6.9 (1.4 to 34.0)	2 (4.4%)	7 (30.4%)	9.4 (1.8 to 50.1)	1 (2.1%)	10 (22.2%)	13.1 (1.6 to 107)
CNS abnormality (n=10)	2 (3.9%)	8 (19.5%)	5.9 (1.2 to 29.8)	1 (2.2%)	7 (30.4%)	19.3 (2.2 to 168)	1 (2.1%)	9 (20.0%)	11.5 (1.4 to 95.0)
Microcephaly (n=7)	1 (2.0%)	6 (14.6%)	8.6 (1.0 to 74.4)	0	5 (21.7%)	0.003*	1 (2.1%)	6 (13.3%)	7.1 (0.8 to 61.3)
Calcifications (n=9)	2 (3.9%)	7 (17.1%)	5.0 (0.9 to 25.8)	1 (2.2%)	6 (26.1%)	15.5 (1.7 to 139)	1 (2.1%)	8 (17.8%)	10.0 (1.2 to 83.2)
Ventriculomegaly (n=6)	1 (2.0%)	5 (12.2%)	6.9 (0.8 to 62.0)	0	5 (21.7%)	0.003*	0	6 (13.3%)	0.01*
Blake pouch cyst (n=3)	0	3 (7.3%)	0.09*	0	3 (13.0%)	0.04*	0	3 (6.7%)	0.11*
Cerebellar vermian hypoplasia (n=3)	0	3 (7.3%)	0.09*	0	2 (8.7%)	0.11*	0	3 (6.7%)	0.13*
Agenesis of corpus callosum (n=2)	0	2 (4.9%)	0.20*	0	1 (4.4%)	0.14*	0	2 (4.4%)	0.24*
Fetal growth restriction (n=7)	1 (2.0%)	6 (14.3%)	8.6 (0.9 to 74.4)	1 (2.2%)	4 (17.4%)	9.3 (1.0 to 88.5)	1 (2.1%)	6 (13.3%)	7.1 (0.8 to 61.3)
Arthrogyposis (n=1)	0	1 (2.4%)	0.45*	0	1 (4.4%)	0.34*	0	1 (2.2%)	0.49*
US findings of unknown significance (n=37)	17 (33.3%)	20 (48.8%)	1.9 (0.8 to 4.4)	16 (35.6%)	12 (52.2%)	2.0 (0.7 to 5.5)	15 (31.9%)	22 (48.9%)	2.0 (0.9 to 4.8)
Without Zika-associated US finding (n=26)	15 (29.4%)	11 (26.8%)	0.9 (0.4 to 2.2)	14 (31.1%)	5 (21.7%)	0.6 (0.2 to 2.0)	14 (29.8%)	12 (26.7%)	0.9 (0.4 to 2.1)
Abnormal Doppler (n=17)	4 (7.8%)	13 (31.7%)	5.5 (1.6 to 18.4)	4 (8.9%)	9 (39.1%)	6.6 (1.8 to 24.8)	4 (8.5%)	13 (28.9%)	4.4 (1.3 to 14.7)
Umbilical artery (n=5)	2 (3.9%)	3 (7.3%)	1.9 (0.3 to 12.2)	2 (4.4%)	2 (8.7%)	2.1 (0.3 to 15.8)	2 (4.3%)	3 (6.7%)	1.6 (0.3 to 10.1)
Middle cerebral artery (n=16)	3 (5.9%)	13 (31.7%)	7.4 (2.0 to 28.3)	3 (6.7%)	10 (43.5%)	10.8 (2.6 to 45.1)	2 (4.3%)	14 (31.1%)	10.2 (2.2 to 47.9)
Fluid abnormalities (n=13)	5 (9.8%)	8 (19.5%)	2.2 (0.7 to 7.4)	6 (13.3%)	6 (26.1%)	2.3 (0.7 to 8.1)	5 (10.6%)	8 (17.8%)	1.8 (0.6 to 6.0)
Oligohydramnios (n=6)	1 (2.0%)	5 (12.2%)	6.9 (0.8 to 62.0)	2 (4.4%)	4 (17.4%)	4.5 (0.8 to 26.9)	1 (2.1%)	5 (11.1%)	5.8 (0.6 to 51.3)
Polyhydramnios (n=7)	4 (7.8%)	3 (7.3%)	0.9 (0.2 to 4.4)	4 (8.9%)	2 (8.7%)	1.0 (0.2 to 5.8)	4 (8.5%)	3 (6.7%)	0.8 (0.2 to 3.8)
Placentomegaly (n=11)	7 (13.7%)	4 (9.8%)	0.7 (0.2 to 2.5)	4 (8.9%)	3 (13.0%)	1.5 (0.3 to 7.5)	7 (14.9%)	4 (8.9%)	0.6 (0.2 to 2.1)
Macrosomia (n=8)	5 (9.8%)	3 (7.3%)	0.7 (0.2 to 3.2)	3 (6.7%)	2 (8.7%)	1.3 (0.2 to 8.6)	5 (10.6%)	3 (6.7%)	0.6 (0.1 to 2.7)
Mega cisterna magna (n=4)	1 (2.0%)	3 (7.3%)	4.0 (0.4 to 39.5)	1 (2.2%)	2 (8.7%)	4.2 (0.4 to 48.9)	1 (2.1%)	3 (6.7%)	3.3 (0.3 to 32.8)

Data are presented as n (%). Unadjusted odds ratios and 95% confidence intervals were calculated by logistic regression. When odds ratios were unable to be calculated, Fisher's exact test was performed and two-way p values are presented and indicated with asterisk (*). Values were considered statistically significant if p<0.05. The stillbirth case was included and considered to have an abnormal neonatal exam and abnormal composite neonatal outcome.

Abbreviations: US, ultrasound; OR, odds ratio; CI, confidence interval; CNS, central nervous system

eTable 5. Detailed Neonatal Outcomes by Mother-Neonate Dyad

Dyad No.	Gest. Age Infection (weeks)	Gest. Age 1st US (Weeks)	Time from Infection to 1st US (Weeks)	No. of Prenatal US	Abnormal Finding on US	Gest. Age Birth	Abnormal Neonatal Exam	Abnormal Neonatal Imaging	Imaging Modality	NICU Admission	Adverse Neonatal Outcome Composite	Outcome
1*	18.29	21.71	3.42	3	Yes	36.86	No	No	US, MRI	Yes	No	NICU admission 30 days
2*	30.71	34.00	3.29	1	Yes	38.71	No	No	US	No	No	
3*	31.29	33.86	2.57	1	No	37.86	Yes	No	US	No	Yes	Hypertonia, polydactyly
4*	14.00	17.86	3.86	1	No	39.43	Yes	Yes	US, MRI	No	Yes	Cortical thumb, hyperreflexia
5*	13.57	19.00	5.43	4	No	39.14	Yes	No	US	No	Yes	Abnormal neurologic exam, hypertonia
6*	21.14	28.00	6.86	2	No	38.00	Yes	Yes	US, CT, MRI	No	Yes	Hyperreflexia, hypertonia, clonus
7*	9.57	15.57	6.00	4	No	39.29	Yes	Yes	CT, MRI	Yes	Yes	Abnormal neurologic exam, seizures
8*	14.43	19.71	5.28	4	Yes	38.57	Yes	Yes	US, MRI	No	Yes	Cortical thumb, hypertonia
9*	14.00	19.14	5.14	3	Yes	35.57	Yes	No	US	No	Yes	Abnormal neurologic exam
10*	25.57	30.71	5.14	2	Yes		Yes				Yes	Stillbirth at 36 weeks
11*	18.00	22.00	6.00	1	No	37.86	No	No	US, MRI	No	No	
12*	22.29	28.71	6.42	5	Yes	32.71	Yes	Yes	US, MRI	Yes	Yes	Microcephaly, small for gestational age, eye lesions, abnormal neurologic exam
13*	10.86	17.00	6.14	4	No	38.86	No	No	MRI	No	No	
14*	20.43	27.86	7.43	3	No	40.71	No	No	US	No	No	
15*	23.00	28.71	5.71	1	No	39.14	No	No	US	No	No	Hyperreflexia, excess scalp
16*	25.57	30.71	5.14	2	No	38.71	Yes	No	US	No	Yes	Brachycephaly, dysmorphic features
17*	22.00	26.57	4.57	3	Yes	39.86	No	No	US, MRI	No	No	
18*	22.43	27.86	5.43	3	No	38.00	Yes	No	US, CT, MRI	No	Yes	Eye abnormalities, hyperreflexia, abnormal neurologic exam
19*	8.00	35.71	27.71	3	Yes	39.29	Yes	Yes	US, CT, MRI	Yes	Yes	Microcephaly, hypertonia, seizures
20*	18.86	25.00	6.14	3	No	39.00	No	No	US, MRI	No	No	
21*	18.29	21.43	5.14	3	Yes	37.00	Yes		None	No	Yes	Seizures, abnormal neurologic exam
22*	19.71	25.86	6.15	3	No	38.00	Yes	No	US	No	Yes	Eye abnormalities
23*	35.14	40.43	5.29	1	Yes	40.57	Yes	No	US, CT	Yes	Yes	Hypotonia, abnormal neurologic exam

Dyad No.	Gest. Age Infection (weeks)	Gest. Age 1st US (Weeks)	Time from Infection to 1st US (Weeks)	No. of Prenatal US	Abnormal Finding on US	Gest. Age Birth	Abnormal Neonatal Exam	Abnormal Neonatal Imaging	Imaging Modality	NICU Admission	Adverse Neonatal Outcome Composite	Outcome
24*	12.00	29.14	17.14	8	Yes	42.00	Yes	Yes	US, CT, MRI	Yes	Yes	Microcephaly, hypertonia, arthrogryposis
25	8.14	12.29	4.15	5	Yes	38.71	Yes	Yes	US, CT, MRI	No	Yes	Abnormal neurologic exam
28*	16.57	22.71	6.14	3	No	38.00	Yes	No	US, MRI	No	Yes	Cortical thumb, abnormal neurologic exam
27*	16.43	24.86	8.43	3	No	39.29	Yes	No	US	No	Yes	Abnormal neurologic exam, clenched fists
28*	23.43	30.71	7.28	3	No	39.14	No	No	US	No	No	
29	4.00	14.71	10.71	5	No	40.29	No	No	US	No	No	
30*	26.00	33.43	7.43	1	No	40.57	Yes	No	US, CT	No	Yes	Abnormal neurologic exam, hyperexcitable
31*	14.57	21.71	7.14	4	Yes	35.57	Yes	Yes	US, CT, MRI	Yes	Yes	Hypertrophic cardiomyopathy, hypoactive
32*	18.00	24.43	6.43	2	No	37.14	No	Yes	US, CT, MRI	Yes	Yes	
33	22.57	28.29	5.72	3	No	39.86	No	No	US	No	No	
34*	23.29	32.00	8.71	1	Yes	40.14	Yes	No	US	Yes	Yes	Small for gestational age, abnormal neurologic exam, posturing, hearing abnormalities
35*	25.43	35.43	10.00	1	No	39.57	No	No	US	No	No	
38*	26.71	35.86	9.15	1	Yes	35.57	Yes	No	US	Yes	Yes	Small for gestational age
37	12.29	19.29	7.00	2	Yes	36.00	No	No	MRI	No	No	
38*	26.71	35.29	8.58	2	Yes	39.14	No	Yes	US, CT	No	Yes	
39*	21.00	30.29	9.29	3	Yes	39.57	Yes	No	US	No	Yes	Abnormal neurologic exam, hypertonia
40*	8.57	17.86	9.29	6	Yes	38.29	Yes	Yes	US, CT	No	Yes	Congenital hip dislocation
41*	17.43	30.29	12.86	2	Yes	35.71	Yes	No	US	No	Yes	Sacral dimple, abnormal neurologic exam
42	7.71	21.57	13.86	5	No	39.00	No		None	No	No	
43	17.29	23.29	6.00	5	No	38.57	No	No	US, MRI	No	No	
44	24.00	31.71	7.71	2	No	39.14	No		None	No	No	
45*	18.14	28.86	10.72	2	Yes	38.57	Yes	Yes	US, MRI	No	Yes	Abnormal neurologic exam, hypotonia, hyperreflexia, hyperexcitability
46*	15.29	24.71	9.42	4	No	38.29	No	No	US	Yes	No	Meconium aspiration syndrome
47*	13.29	21.86	8.57	5	Yes	39.00	No		None	No	No	

Dyad No.	Gest. Age Infection (weeks)	Gest. Age 1st US (Weeks)	Time from Infection to 1st US (Weeks)	No. of Prenatal US	Abnormal Finding on US	Gest. Age Birth	Abnormal Neonatal Exam	Abnormal Neonatal Imaging	Imaging Modality	NICU Admission	Adverse Neonatal Outcome Composite	Outcome
48*	26.71	35.71	9.00	1	No	38.00	Yes	Yes	US, MRI	No	Yes	Abnormal neurologic exam
49*	11.57	21.43	9.86	4	Yes	38.00	No	No	US, MRI	No	No	
50*	24.29	34.00	9.71	1	No	38.00	No	No	US, MRI	No	No	
51	7.29	16.71	9.42	4	Yes	38.29	No	No	US, MRI	Yes	No	Abnormal neurologic exam
52*	18.71	28.43	9.72	2	No	38.00	Yes	No	US, MRI	No	Yes	Abnormal neurologic exam
53	21.00	29.14	8.14	3	No	37.43	No		None	No	No	
54*	27.29	38.43	9.14	1	No	40.14	No	No	US	No	No	
55	5.57	15.43	9.86	5	No	40.57	No		None	No	No	Small for gestational age
56*	22.14	30.57	8.43	2	No	38.57	Yes	Yes	US, MRI	No	Yes	Abnormal neurologic exam, hypertonia
57	5.29	15.00	9.71	4	Yes	39.00	No	No	US, MRI	No	No	
58	17.43	24.57	7.14	3	Yes	41.57	No	Yes	US, CT, MRI	No	Yes	Small for gestational age, abnormal neurologic exam
59	7.57	17.14	9.57	3	No	40.43	No		None	No	No	
60*	17.00	34.71	17.71	2	Yes	38.00	Yes	No	MRI	No	Yes	Arthrogyposis, abnormal neurologic exam
61*	12.86	21.57	8.71	3	No	34.43	Yes	Yes	US, MRI	Yes	Yes	
62*	20.86	28.00	7.14	3	No	39.00	No	No	US	No	No	
63*	18.29	25.43	7.14	1	No	38.57	Yes		None	No	Yes	Laryngomalacia
64	5.29	15.00	9.71	3	No	34.43	Yes		None	Yes	Yes	Abnormal neurologic exam, hypotonia
65*	18.14	21.43	3.29	3	No	36.00	No	No	US	Yes	No	
66	5.43	15.57	10.14	5	No	39.00	No	No	US	No	No	
67*	21.43	30.43	9.00	4	No	40.14	Yes	Yes	US, CT, MRI	Yes	Yes	Seizures, abnormal neurologic exam
68*	10.86	22.14	11.28	5	Yes	37.00	No	No	MRI	No	No	
69*	27.00	34.71	7.71	2	No	41.00	Yes	No	US	No	Yes	
70	4.29	11.86	7.57	3	Yes	39.71	No	No	MRI	Yes	No	
71	15.71	27.71	12.00	3	Yes	40.71	No		None	No	No	
72	18.29	31.86	13.57	1	No	38.43	No	No	US	No	No	
73	8.86	21.14	12.28	4	No	38.00	No		None	No	No	
74	12.14	25.00	12.86	4	No	38.71	No		None	No	No	

Dyad No.	Gest. Age Infection (weeks)	Gest. Age 1st US (Weeks)	Time from Infection to 1st US (Weeks)	No. of Prenatal US	Abnormal Finding on US	Gest. Age Birth	Abnormal Neonatal Exam	Abnormal Neonatal Imaging	Imaging Modality	NICU Admission	Adverse Neonatal Outcome Composite	Outcome
75	14.29	22.00	7.71	4	No	37.00	No		None	No	No	
76	20.00	35.71	15.71	1	Yes	39.14	No		None	No	No	
77*	23.86	36.43	12.57	1	No	37.88	Yes	Yes	US, MRI	No	Yes	Abnormal neurologic exam
78	9.29	22.00	12.71	10	Yes	38.00	Yes	Yes	US, CT, MRI	No	Yes	Microcephaly, abnormal neurologic exam
79*	19.00	36.00	17.00	1	No	37.00	Yes	Yes	MRI	No	Yes	Abnormal neurologic exam, hypertonia of limbs, axial hypotonia, hyperreflexia
80	6.00	15.71	9.71	4	No	35.29	No	Yes	US, CT	No	Yes	
81*	17.29	30.43	13.14	1	No	38.00	No	No	US	No	No	
82	11.43	23.29	11.86	4	Yes	38.00	No		None	No	No	
83	9.14	26.29	17.15	8	Yes	40.00	Yes	Yes	US, CT, MRI	No	Yes	Microcephaly, abnormal neurologic exam, seizures
84	15.29	26.71	11.42	4	No	39.00	No		None	No	No	
85	15.29	22.29	7.00	4	Yes	37.00	No		None	No	No	
86*	19.00	37.43	18.43	1	No	35.00	No		None	No	No	
87	10.86	23.43	12.57	3	Yes	38.00	No		None	No	No	
88	10.14	33.14	23.00	1	No	39.00	No		None	No	No	
89	20.57	33.71	13.14	1	No	37.88	No		None	No	No	
90	14.57	27.43	12.86	2	No	39.00	No		None		No	
91	5.57	29.86	24.29	3	Yes	38.00	Yes		None	Yes	Yes	Arthrogyposis, microcephaly, multiple brain abnormalities, hydrocephalus, neonatal death on day of life 1.
92	16.86	35.14	18.28	2	No	40.43	No	No	US	No	No	

Gestational age (Gest. Age) is presented as weeks. Asterisks (*) indicated cases that were previously reported in Brasil, et al, NEJM, 2016 (patient numbers have changed).

Abbreviations: No., number; US, ultrasound; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; NICU, neonatal intensive care unit; OR, odds ratio; CI, confidence interval; CNS, central nervous system

The Role of Amniocentesis in the Diagnosis of Congenital Zika Syndrome

José Paulo Pereira Jr., MD^{1*}; Melanie M. Maykin, MD^{2*}; Zilton Vasconcelos, PhD¹;
Elyzabeth Avvad-Portari, MD, PhD¹; Andrea A. Zin, MD, PhD¹; Irena Tsui, MD³;
Patricia Brasil, MD, PhD⁴; Karin Nielsen-Saines, MD⁵; Maria E. Moreira, MD, PhD¹;
Stephanie L. Gaw, MD, PhD²

*JPP, Jr and MMM contributed equally to the manuscript

¹ Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira -
Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

² Division of Maternal-Fetal Medicine, Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive
Sciences, University of California, San Francisco, San Francisco, California, USA

³ Jules Stein Eye Institute, Retina Division, University of California, Los Angeles, Los Angeles,
California, USA

⁴ Laboratório de Doenças Febris Agudas, Instituto – Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Division of Pediatric Infectious Diseases, Department of Pediatrics, University of California, Los
Angeles, Los Angeles, California, USA

Corresponding Author: Stephanie L. Gaw, MD, PhD; Dept. of Obstetrics, Gynecology, and
Reproductive Sciences, 513 Parnassus Ave, Box 0556, HSE16, San Francisco, CA, 94143,
USA. Tel: 415-476-0535. Email: stephanie.gaw@ucsf.edu

Abstract

There is limited data on amniocentesis as a diagnostic tool for congenital Zika syndrome. Here we report on a prospective cohort of 16 women with suspected Zika virus infection in a highly endemic area, and discuss the role of amniocentesis in the prenatal diagnosis of fetal Zika infection.

Keywords: ZIKV, TORCH infection, perinatal infection, pregnancy, vertical transmission

The identification of Zika virus (ZIKV) from the amniotic fluid of two fetuses with severe central nervous system (CNS) abnormalities in 2016 was the first evidence of vertical transmission of ZIKV [1]. ZIKV has since been established as the etiology of congenital Zika syndrome (CZS), characterized in its most severe form by microcephaly and severe CNS malformations, with rates of adverse pregnancy outcome exceeding 40% in some studies [2]. Prenatal diagnosis of CZS informs management of the pregnancy and care of the ZIKV-exposed infant. However, the optimal method of prenatal screening and diagnosis of ZIKV infection remains undetermined. Testing is complicated by the asymptomatic course of most infections, the narrow window of viral RNA detection in maternal serum and/or urine, and limitations in maternal serologic testing due to delayed seroconversion, and false positive results from cross-reactivity with other flaviviruses [2,3]. Amniocentesis, the gold standard for prenatal diagnosis of vertical transmission in other infections, has not been routinely recommended in cases of suspected CZS, due to the invasive nature of the test (which carries a small risk of pregnancy complications), the limited data available to guide the timing of testing and interpretation of results, and limited therapeutic options [3]. Available data on the performance of ZIKV detection in amniotic fluid has been limited to isolated case reports and small case series of confirmed CZS that have reported a total of 27 cases [1,4-11].

Here, we report on a prospective cohort of patients referred for suspected ZIKV infection during the 2015-2016 Rio de Janeiro epidemic. Instituto Fernandes Figueira of Fiocruz is the Ministry

of Health referral center for Rio de Janeiro state, and provides comprehensive prenatal, obstetric, and postnatal care for high risk pregnancies complicated by complex fetal diagnoses. In this cohort, 16 women underwent amniocentesis after being referred for clinical suspicion of ZIKV infection due to abnormal CNS ultrasound findings suggestive of ZIKV or another TORCH infection. Some of the women reported symptoms compatible with ZIKV infection earlier in pregnancy and had exceeded the 3 weeks window for blood and urine testing for ZIKV RNA at our institution, or had negative maternal testing earlier in pregnancy.

Upon referral, all women underwent a comprehensive prenatal ultrasound evaluation, performed by perinatologists certified by the Brazilian College of Radiology and the Brazilian Federation of Societies of Gynecology and Obstetrics. Amniotic fluid was collected, and patients were offered fetal karyotype analysis, as well as nucleic acid testing for ZIKV, cytomegalovirus (CMV), and toxoplasmosis. Patients also underwent maternal blood testing for HIV with viral load, toxoplasmosis IgM/IgG, rubella IgM/IgG, and VDRL for syphilis. After delivery, neonates underwent a comprehensive evaluation, including neonatal examination, ophthalmologic exam, and neuroimaging with transfontanelle ultrasound and/or head CT. Placenta, infant urine, serum, and/or cerebrospinal fluid were tested for ZIKV by RT-PCR as available.

From January to October 2016, 16 women underwent amniocentesis for possible ZIKV infection. All had fetuses exhibiting CNS abnormalities on ultrasound. **(Table)**. Twelve of 16 (75%) women reported symptoms consistent with ZIKV infection. Of the patients who had symptoms, all but one reported symptoms in the first trimester of pregnancy. Case 11 tested positive for ZIKV in urine at 12 weeks gestation. Two patients (Cases 1 and 8) had negative ZIKV testing earlier in pregnancy for suspected infection. The most common ultrasound abnormalities were: ventriculomegaly (12/16, 75%), CNS calcifications (8/16, 50%), microcephaly (defined as <2 SD below the mean; 6/16, 38%), and fetal growth restriction (defined as <10%ile; 10/16, 63%).

Detailed description of ultrasound results and relevant prenatal testing are shown in the **Supplemental Table.**

The median gestational age at the time of amniocentesis was 26 weeks (range 18 to 34). Eight mothers reported symptoms of ZIKV infection. For symptomatic cases, the median elapsed time from suspected infection to amniocentesis was 16.5 weeks (range 10 to 27). There were 7 cases of ZIKV detected by RT-PCR in amniotic fluid, ranging from 10 to 19 weeks after suspected infection. There were two other cases of TORCH infection (CMV and toxoplasmosis, respectively), with amniocentesis detecting congenital infection in 56% of pregnancies. Eight patients consented for karyotype testing, of which one case confirmed trisomy 18.

In this cohort of fetuses with CNS abnormalities, amniocentesis detected 7/9 (78%) of CZS cases. Two additional cases were diagnosed through postnatal evaluation and testing of the neonate: Case 4 by placenta and fetal cord blood, and Case 11 by placenta, neonatal blood, and PCR of cerebrospinal fluid. Of the two CZS cases that were not detected on amniocentesis, the elapsed times from suspected infection to amniotic fluid testing were 27 weeks and >17 weeks. There were three patients who were found to be positive for CZS by amniocentesis but had PCR-negative postnatal samples. These included: Case 5 (negative neonatal blood, urine, placenta, and cerebrospinal fluid), Case 9 (negative neonatal blood and cord blood), and Case 15 (negative cord blood, urine, placenta, and cerebrospinal fluid). Detailed results of postnatal outcomes (evaluation, neuroimaging, and relevant tests) are reported in the Supplemental Table. Overall, there were 2 cases of stillbirth (13%) and 4 cases of neonatal death (25%), with a perinatal/postnatal death rate of 38% in this high-risk cohort.

Discussion

To our knowledge, this is the first prospective cohort examining the role of amniocentesis as a diagnostic tool in cases of suspected ZIKV infection. In our cohort of 16 fetuses with CNS

abnormalities on ultrasound during the 2016 ZIKV epidemic in Rio de Janeiro, there were 9 confirmed cases of CZS. Amniocentesis had a ZIKV detection rate of 63% (7/9).

The majority of cases were likely infected in the first trimester based on reported symptoms, and only two patients had maternal ZIKV testing by RT-PCR at the time of symptoms—all with negative results. All patients were referred for CNS abnormalities on ultrasound during the epidemic, where there was high risk of exposure to ZIKV and a high potential for CZS. Amniocentesis for genetics or suspected TORCH infection is not commonly performed in Brazil, as it is not routinely accepted by patients due to fear of pregnancy loss or other complications, such as infection or premature rupture of membranes, and the lack of pregnancy options.

As of July 2018, review of the literature found a total of 27 cases reported on the use of amniocentesis for the diagnosis of ZIKV infection. However, we found no prospective reports, and determination of the sensitivity and specificity of ZIKV PCR as a diagnostic tool could not be determined. Our results suggest that in the setting of ultrasound abnormalities and high risk of ZIKV exposure, amniocentesis is helpful as a diagnostic tool to aid in prenatal diagnosis, pregnancy care, and optimization of pediatric support. The optimal time to perform amniocentesis remains to be determined. Meaney-Delman *et al.* detected ZIKV in amniotic fluid as early as 3 weeks after infection [12]. The window for molecular detection of ZIKV is longer than the usual time of active viral shedding in maternal blood or urine, which is between 1-4 weeks in pregnant women, although prolonged viremia is possible [2]. We successfully detected ZIKV RNA in amniotic fluid between 10 and 19 weeks after suspected infection, which is consistent with other reports.

Importantly, a negative result on amniocentesis does not rule out vertical transmission and CZS. Viral shedding in amniotic fluid may be transient, as demonstrated in two of our cases (Cases 4 and 11), as well as in other reports [7,8]. In cases of high suspicion for CZS, testing of the placenta and the infant after birth is a critical component of comprehensive evaluation, especially as knowledge of the full spectrum of findings in CZS continues to be elucidated.

One limitation of our study is generalizability to cases of suspected ZIKV infection and normal ultrasound. Prospective studies in this population are urgently needed. Additionally, this cohort does not address the timing of vertical transmission from mother to fetus or the timing of development of ultrasound findings, as the majority of women were not tested at the time of symptoms, did not undergo a standardized protocol for ultrasound screening, and were not referred until they had an abnormal ultrasound. Women in our cohort had very high risk pregnancies, with serious CNS fetal defects, leading to fetal or neonatal demise in almost 40% of cases (2 stillbirths due to Zika and toxoplasmosis, 2 of 4 neonatal deaths due to Zika or chromosomal abnormalities, and 2 others of unknown etiology). Furthermore, greater numbers of cases with varying degrees of fetal disease severity are needed to more accurately determine sensitivity and specificity, as well as the effect of timing with respect to infection.

This study supports the utility of amniotic fluid testing for the diagnosis of vertical transmission of ZIKV. A diagnostic result was determined in 63% of cases, all of whom presented outside the established window for maternal ZIKV testing, and three of which had PCR-negative postnatal testing. Confirmatory testing of CZS is important for prenatal counseling, informed decision-making for the pregnancy, as well as delivery planning and care of the affected infant.

Acknowledgments

We thank the mothers and infants who participated in this study. We also thank Dr. Helder Dotta Gama, Dr. Beatriz Ribeiro Torres Dutra, Dr. Helena Abreu Valle, and Dr. Renan Fonseca Cardozo for their assistance with data collection.

Funding

This work was supported by the National Institutes of Health [K12 HD000849 to SLG, R21AI28697, R21AI129534, and R21EY028318], the Queenan Fellowship for Global Health [to

SLG], the Brazilian Ministry of Health; the Wellcome Trust [205377/Z/16/Z], and European Union's 2020 Research and Innovation Programme [Zika-PLAN 734584]. MEM reports grants from CNPq, United Kingdom's Department for International Development, and FAPERJ, during the conduct of the study.

Conflict of Interest

All authors have no conflicts of interests to declare.

References

1. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* **2016**; 47:6–7.
2. Eppes C, Rac M, Dunn J, et al. Testing for Zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2017**; 216:209–225.
3. Adebajo T, Godfred-Cato S, Viens L, et al. Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, October 2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2017**; 66:1089–1099.
4. Chimelli L, Moura Pone S, Avvad-Portari E, et al. Persistence of Zika Virus After Birth: Clinical, Virological, Neuroimaging, and Neuropathological Documentation in a 5-Month Infant With Congenital Zika Syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2018**; 77:193–198.
5. Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601824> **2016**; 374:2142–2151.
6. Acosta-Reyes J, Navarro E, Herrera MJ, et al. Severe Neurologic Disorders in 2 Fetuses with Zika Virus Infection, Colombia. *Emerging Infect. Dis.* **2017**; 23:982–984.
7. Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Guillemette-Artur P, et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Euro Surveill.* **2016**; 21:302.
8. Schaub B, Vouga M, Najioullah F, et al. Analysis of blood from Zika virus-infected fetuses: a prospective case series. *Lancet Infect Dis* **2017**; 17:520–527.
9. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* **2016**; 16:653–660.

10. Herrera K, Bernasko J, Garry D, Vahanian S, Kaplan C. Vertical transmission of Zika virus (ZIKV) in early pregnancy: two cases, two different courses. *Case Reports in Perinatal Medicine* 5:374.
11. Benjamin I, Fernández G, Figueira JV, Parpacén L, Urbina MT, Medina R. Zika virus detected in amniotic fluid and umbilical cord blood in an in vitro fertilization-conceived pregnancy in Venezuela. *Fertil. Steril.* **2017**; 107:1319–1322.
12. Meaney-Delman D, Oduyebo T, Polen KND, et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. *Obstet Gynecol* **2016**; 128:724–730.

Case	GA of infection‡	GA of amnio	Time after infection*	ZIKV PCR in AF	KT	TORCH	GA at birth†	BW	ZIKV PCR Postnatal	Final Diagnosis
Symptomatic										
1	12w (Neg)	25w3d	13w	Neg	-	T. gondii	25w4d†	862	Neg	Toxoplasmosis Stillbirth
2	11w	24w6d	13w	Neg	46XX	Neg	38w4d	2375	Neg	Unknown etiology SGA (3%)
3	8w	27w2d	19w	Pos	46XY	Neg	32w2d†	-	Pos	ZIKV Stillbirth
4	7w	34w3d	27w	Neg	46XY	Neg	40w1d	2562	Pos	ZIKV SGA (2%)
5	8w	18w6d	10w	Pos	46XY	Neg	38w3d	3410	Neg	ZIKV
6	5w	32w6d	27w	Neg	-	Neg	38w3d	1700	Neg	Unknown etiology SGA (<1%) Neonatal death
7	16w	32w1d	16w	Pos	-	Neg	40w2d	2020	Pos	ZIKV SGA (<1%) Neonatal death
8	12w (Neg)	25w5d	13w	Neg	46XY	CMV	37w5d	3360	Neg	CMV
9	10w	25w4d	15w	Pos	46XX	Neg	41w1d	2620	Neg	ZIKV SGA (2%)
10	7w	24w6d	17w	Pos	-	Neg	39w4d	2224	Pos	ZIKV SGA (<1%)
11	12w (Pos)	30w4d	18w	Neg	-	Neg	40w6d	2710	Pos	ZIKV SGA (2%)

12	<13w	24w5d	>11w	Pos	46XY	Neg	37w6d	1920	Pos	ZIKV SGA (<1%)
Asymptomatic										
13	-	31w6d	-	Neg	Neg	Neg	34w0d	1870	Neg	Toxoplasmosis (Infant T. gondii IgM+)
14	-	24w4d	-	Neg	47XX;T 18	Neg	30w2d	924	Neg	Trisomy 18 Neonatal death
15	-	29w6d	-	Pos	-	Neg	39w1d	2400	Neg	ZIKV SGA (2%ile)
16	-	30w2d	-	Neg	-	Neg	-	-	-	Unknown etiology Neonatal death

Table. Main characteristics of cases that underwent amniocentesis for evaluation of suspected Zika virus (ZIKV) infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2016.

Abbreviations: GA, gestational age; amnio, amniocentesis; AF, amniotic fluid; KT, karyotype; TORCH, results of PCR testing for cytomegalovirus (CMV), *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), and syphilis (serum VDRL); BW, birth weight (g); Postnatal, postnatal testing of placenta, cord blood, and/or neonatal serum, urine, or cerebrospinal fluid for ZIKV; pos, positive; neg, negative, SGA, small for gestational age (percentile).

‡ Result of maternal PCR if performed is in parenthesis.

* Time in weeks from gestational age at infection to amniocentesis

† stillbirth

Supplemental Table: Prenatal ultrasound findings and postnatal evaluation and imaging of cases that underwent amniocentesis for suspected Zika virus (ZIKV) infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2016.

Case	GA of infection	GA of ultrasound	Prenatal Evaluation	Postnatal Evaluation	Final Diagnosis
Symptomatic					
1	12w	23w1d	VM, hydrocephalus, hydrops, echogenic bowel, liver and heart calcifications, placentomegaly Toxoplasmosis IgG+/IgM+ ZIKV urine PCR-	Stillbirth	Toxoplasmosis
2	11w	24w3d	VM, CNS calcifications, abnormal doppler, FGR	TFUS: MCP, calcifications, VM, MCM CT: calcifications, lissencephaly, cerebral atrophy, Dandy-Walker malformation Eye: chorioretinal atrophy, optic nerve hypoplasia, nystagmus	Unknown etiology SGA (3%)
3	8w	27w2d	VM, ACC, vermian agenesis, cerebellar agenesis, arthrogryposis, hydrops, single umbilical artery	Stillbirth	ZIKV
4	7w	32w2d	MCP, VM, CNS calcifications, CPC, redundant skin, FGR	TFUS: MCP CT: cortical thinning, calcifications, cerebellar hypoplasia	ZIKV SGA (2%)
5	8w	17w6d	Lemon sign, hydrocephalus, single umbilical artery, MCM, blake pouch cyst, vermian agenesis, cerebellar hypoplasia	TF: posterior fossa cyst, Dandy-Walker malformation CT: cortical thinning, hydrocephalus, calcifications, cerebellar hypoplasia Eye: Normal Negative ZIKV PCR: neonatal blood, urine, placenta, CSF	ZIKV
6	5w	32w0d	MCP, VM, CNS calcifications, FGR	MCP, arthrogryposis	Unknown etiology SGA (<1%) Neonatal death
7	16w	29w1d	MCP, VM, vermian agenesis, FGR	MCP, arthrogryposis	ZIKV SGA (<1%) Neonatal death
8	12w	24w5d	VM, CNS calcifications, ACC, suspected arthrogryposis ZIKV blood PCR- ZIKV urine PCR-	TFUS: periventricular calcifications, MCM, cortical thinning CT: MCP, calcifications, MCM Eye: spotted macular pigmentation, optic nerve pallor	CMV
9	10w	25w1d	MCP, VM, CNS calcifications, blake pouch cyst, FGR	TFUS: MCP, calcifications, VM CT: MCP, calcifications, VM, cerebral atrophy Negative ZIKV PCR: neonatal blood, cord blood	ZIKV SGA (2%)
10	7w	23w3d	VM, CNS calcifications, MCM, vermian agenesis, FGR	Arthrogryposis TFUS: VM, calcifications, Dandy-Walker malformation CT: VM, calcifications, Dandy-Walker malformation Eye: optic nerve pallor, diffuse retinal hemorrhages	ZIKV SGA (<1%)
11	<13	29w4d	MCP, VM, MCM, FGR ZIKV blood PCR- ZIKV urine PCR+	Arthrogryposis TFUS: MCP, calcifications, VM, MCM CT: MCP, calcifications, pachygyria, VM Eye: optic nerve hypoplasia, macular atrophy	ZIKV SGA (2%)

12	<13w	21w5d	VM, CNS calcifications, micrognathia, suspected arthrogyrosis, FGR	Arthrogyrosis TFUS: calcifications, MCM CT: MCP, calcifications, cerebellar hypoplasia, VM Eye: optic nerve pallor, macular atropy	ZIKV SGA (<1%) Neonatal death
Asymptomatic					
13	N/A	31w3d	VM, CNS calcifications, cardiomegaly, pericardial effusion Toxoplasmosis IgG+/IgM+	TFUS: VM, calcifications CT: periventricular calcifications, mega cisterna magna Eye: microphthalmia, active toxoplasmosis	Toxoplasmosis (Infant Tgondii IgM+)
14	N/A	24w4d	FGR, bilateral CPC, blake pouch cyst, brachycephaly, bilateral club feet	None	Trisomy 18 Neonatal death
15	N/A	25w3d	MCP, VM, abnormal dopplers, FGR	TFUS: MCP CT: MCP, calcifications, cortical thinning, cerebellar hypoplasia Negative ZIKV PCR: cord blood, urine, placenta, CSF	ZIKV SGA (2%ile)
16	N/A	28w1d	Occipital encephalocele	Occipital encephalocele	Unknown etiology Infant death

Abbreviations: ACC, agenesis of the corpus collosum; CNS, central nervous system; CPC, choroid plexus cysts; CT, computed tomography; FGR, fetal growth restriction; GA, gestational age (week day); MCM, mega cisterna magna; MCP, microcephaly; , SGA, small for gestational age (percentile); TFUS, transfontanelle ultrasound; VM, ventriculomegaly; ZIKV, Zika virus; CSF, cerebrospinal fluid

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A epidemia causada pelo vírus Zika no Brasil durante o biênio 2015-2016, e suas consequências deletérias para a saúde de adultos e gestantes, trouxe angústia e medo para a população mundial. Nossa ignorância inicial sobre o comportamento devastador dessa epidemia, paulatinamente foi substituída por estudos colaborativos internacionais que, rapidamente, construíram os alicerces de condutas para a Saúde Pública e para o manejo clínico dos pacientes afetados. Medidas de prevenção, através do controle dos criadouros dos vetores, e protocolos de vigilância e assistência foram instituídos e aplicados. Em relação à população de gestantes, a preocupação inicial, focada no diagnóstico de microcefalia, foi também substituída pela observação da presença de outros agravos, comprometendo a saúde e o desenvolvimento perinatal. Comprometidos com o estudo das alterações estruturais e hemodinâmicas fetais, utilizando o ultrassom e a dopplervelocimetria, e desejando melhorar o diagnóstico etiológico em fetos portadores de anomalias estruturais suspeitas, e sem diagnóstico prévio da infecção, através da pesquisa do vírus diretamente em tecidos fetais, desenvolvemos dois projetos de pesquisa.

O primeiro trabalho, utilizando o ultrassom e o Doppler, estudou a associação de achados anormais nesses exames com o resultado neonatal adverso composto (RNAC), avaliando a mortalidade perinatal, achados anormais no exame clínico neonatal e de neuroimagem pós-natal (desfecho primário). Os desfechos secundários incluíram achados específicos dos dois exames, com os três desfechos neonatais. Observamos que os achados de anomalias nos

exames de ultrassom durante a gravidez estiveram associados a um aumento de 6 a 27 vezes na chance de encontrarmos RNAC. Os achados ultrassonográficos específicos que se associaram ao RNAC fora: anomalias estruturais no SNC, calcificações cerebrais, ventriculomegalia, crescimento intrauterino restrito e anormalidades no Doppler da artéria cerebral média. A sensibilidade do ultrassom para predizer RNAC foi baixa, 48,9%, já que mais da metade dos fetos que apresentaram RNAC, não foram identificados pelo exame. A especificidade encontrada foi de 68,1%.

Esse achado é consistente com a literatura em relação às infecções congênicas em geral, e é mais significativo em relação à infecção por ZIKV, onde encontramos alterações funcionais neurológicas que não estavam associadas às anormalidades estruturais. Um outro achado importante desse trabalho foi a associação entre alterações da ACM e do líquido amniótico (oligodramnia) com RNAC. A avaliação do PI e do PVS da ACM, e do volume de líquido amniótico, através da técnica de MBV, podem ser importantes para uma melhor monitorização e vigilância fetal durante a gestação. Nossos achados, embora apresentem números pequenos, apontam para a mesma direção: a capacidade do vírus de produzir inflamação no tecido do SNC e placentário, levando a uma alteração no fluxo sanguíneo local, que pode ser percebida pela avaliação direta da ACM, e indiretamente, pela medida do volume do líquido amniótico. Assim, a utilização dos exames de ultrassom e Doppler em gestantes infectadas pelo ZIKV, é uma ferramenta útil para antecipar desfechos neonatais adversos, mesmo apresentando valor preditivo negativo baixo. Recomendamos que todos os RNs expostos, mesmo aqueles que não apresentem anomalias estruturais ou funcionais ao nascimento, recebam assistência clínica neonatal especializada,

incluindo avaliação otoacústica, oftalmológica, neurológica, genética e de neuroimagem. Entendemos também ser necessário o seguimento dessas crianças por um período não inferior há 3 anos, incluindo testes para avaliação do neurodesenvolvimento.

O segundo trabalho objetivou analisar a etiologia de alterações estruturais fetais suspeitas, detectadas pelo ultrassom, durante a epidemia de ZIKV, em gestantes assintomáticas ou oligossintomáticas para a infecção, e/ou fora da janela para a aplicação do RT-PCR nos tecidos maternos, sangue e urina. Utilizamos a amniocentese para coleta de líquido amniótico e testagem direta para ZIKV, TOX e CMV, pela técnica de RT-PCR. Oferecemos também a realização de cariótipo fetal. Entre as 16 pacientes estudadas, o diagnóstico etiológico foi conseguido em 10 casos (63%). Entre os 9 fetos portadores de ICO por ZIKV, 7 fetos apresentaram RT-PCR positivos no líquido amniótico (78%). Dois fetos foram diagnosticados no período pós-natal. Dois fetos apresentaram infecção por CMV e TOX, respectivamente. Um feto foi diagnosticado como portador de trissomia do 18.

A amniocentese foi uma importante ferramenta para esclarecer a etiologia nesses casos, permitindo o aconselhamento parental adequado e possibilitando, ainda, a programação da assistência perinatal multidisciplinar. Nossos resultados estão alinhados com a literatura, através da a proposta de investigar a presença de microrganismos diretamente no líquido amniótico ou sangue fetal, utilizando técnicas em cultura celular, inoculação animal ou de biologia molecular, como o RT-PCR. Durante a epidemia de ZIKA, a possibilidade de oferecer diagnóstico etiológico para as ICO e para aneuploidias, foi muito bem recebida pelas pacientes, independentemente dos resultados encontrados.

Nossa experiência com a TOX nos últimos 10 anos contribuiu em muito para uma atitude positiva das pacientes, frente a um risco basal de perda fetal associada ao procedimento de 0,5%.

Nos últimos 3 anos aprendemos muito. Durante essa caminhada, descobrimos que algumas questões importantes ainda não estão resolvidas. Não antevemos a possibilidade de atitude preventiva contra o ZIKV, já que as campanhas com foco na erradicação do vetor, são insipientes ou inexistem. O desenvolvimento de vacinas ainda não prosperou. A disponibilidade de testes sorológicos específicos, que não sofram a interferência de reações cruzadas, para aplicação na rotina pré-natal, ainda não é uma realidade. Como a maioria das gestantes infectadas são assintomáticas, ignoramos o resultado perinatal desses fetos expostos ao vírus.

Assim, encontramos vários motivos para continuarmos na nossa jornada. Precisamos aprender mais sobre essa e outras doenças, para melhor assistir aos nossos pacientes.

8 – ANEXO 1

Ficha para coleta de dados Zika e Gestação

1. **Nomepaciente:** _____ **RegIFF** _____ 2. **NumeroPac:** _____

3. **Nome RN:** _____ **RegRN:** _____

4. **Data parto:** ____/____/____ 4.1. **Idade RN em Dias:** _____ dias

5. **IG parto:** ____ sem ____ dias 6. **Hospital:** IFF other _____

7. **Tipo parto:** () Normal () C-Sec () Forceps () Outros

8. **C-Sec emergência?** () Sim () Não 9. **C-Sec indicação:** _____

10. **CTG basal?** () Normal () Anormal () Não realizado () Ignorado

11. **Morte perinatal?** () Sim () Não

12. **Momento óbito:** () Não () Natimorto () <8 dias () <28dias () <90 dias

13. **Apgar** 1 o min _____ 5o min _____ 10o min _____

14. **Capurro** ____ sem ____ dias 15. **Ballard** ____ sem ____ dias

16. **Sexo RN** () Masculino () Feminino () Ambiguous () Ignorado

17. **PesoFetal** _____ gramas 18. **Altura** _____ cm 19. **PerimetroCef** _____ cm

20. **Placenta peso:** _____ gramas 21. **Tipo placenta:** () Normal () Anormal () NR () IGN

22. **Anatomia Patologica:** () Sim () Não 23. **Classificação do RN:** AIG PIG GIG

24. **UTI_Neo?** () Sim () Não 25. **SE SIM, Quantos dias?** _____ dias

26. **Exame físico RN préalta:** () Normal () Anormal 27. **Amamentou no parto?** () Sim () Não

28. **Anomalias Congênitas** () Sim () Não 29. **Cariótipo:** () Normal () Anormal () NR

30. **Qual An Congênita?** _____

31. **US transfontanela(TF):** () Normal () abnormal () NR _____

32. **CT:** () Normal () Anormal () NR _____

33. **RNM:** () Normal () Anormal () NR _____

34. **Oftalmo/ Retcam:** () Normal () Anormal () NR _____

35. **Otoexam:** () Normal () Anormal () NR _____

36. **Data da alta hospitalar ou óbito:** ____/____/201____

PCRZK_RN_blood: () Pos () Neg () ND () IGN **PCRZK_RN_urine:** () Positive () Negative () ND () IGN

PCRZK_RN_CSF: () Pos () Neg () ND () IGN **PCRZK_RN_cord:** () Positive () Negative () ND () IGN

PCRZK_RN_placenta: () Posi () Neg () ND () IGN **PCRZK_RN_UmbBI:** () Positive () Negative () ND () IGN

PCRZK_RN_other tissues: () Posi () Neg () ND () IGN **Other tissues?** _____

VDRL_RN: () Posivel () Neg () ND () IGN **PCR_RN_CMV_urine:** () Posivel () Negative () ND () IGN

Mot_TOXO: 1. Pos/Neg 2. Neg/Neg 3. Neg/Pos 4. Pos/Pos 5. IGN **Mot_VDRL:** 1. Pos 2. Neg 3. IGN

Mot_Dengue: 1. Pos/Neg 2. Neg/Neg 3. Neg/Pos 4. Pos/Pos 5. IGN **Mot_CKG:** :1. Pos 2. Neg 3.. IGN

Mot_Rub: 1. Pos 2. Neg 3.. IGN **Mot_CMV:** 1. Pos 2. Neg 3.. IGN **Mot_Parvo:** 1. Pos 2. Neg 3.IGN

Mother_other: 1. Pos 2. Neg 3.. IGN **Mother_which_other?** _____

Data Coleta: ____/____/____ **Coletador:** _____ **Banco:** _____

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1232–9.
2. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1477.
3. Oehler E, Watrin L, Larre P, Lastère S, Valour F, Baudouin L, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré - case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*. 2014;19(9):pii=20720.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20720%0AArticle>
4. Besnard M, Lastere S, Teissier A. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia. *Euro Surveill*. 2014;19(13):8–11.
5. Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
6. 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 Zika vírus Zika Vesão 1.2 - 2015. 2015;1–11. Available from:
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/09/Microcefalia---Protocolo-de-vigil-ncia-e-resposta---vers--o-1----09dez2015-8h.pdf>
7. Gourinat A, Connor OO, Calvez E, Goarant C. Detection of Zika virus in

- urine. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):84–6.
<http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140894>
8. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, dos Santos AAC, Menezes LSR, da Cruz SOD, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(6):1–17.
 9. Cheeran MCJ, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: Disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):99–126.
 10. Schleiss MR. Congenital cytomegalovirus infection: molecular mechanisms mediating viral pathogenesis. *Infect Disord Drug Targets.* 2011;11(5):449–65.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827434><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3869401>
 11. Braga JU, Bressan C, Dalvi PR, Calvet GA, Daumas RP, Rodrigues N, et al. Accuracy of Zika virus disease case definition during simultaneous Dengue and Chikungunya epidemics. *PLoS One.* 2017;12(6):1–14.
 12. Nhan T, Cao-Loemeau V, Musso D. Les infections à virus Zika. *Rev Francoph des Lab.* 2014;467:45–52.
 13. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med [Internet].* 2009;360(24):2536–43.
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0805715>
 14. Iosifidis S, Mallet H, Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine Mal Infect.* 2014;44(7):302–7.

15. Pan American Health Organization. Epidemiological Alert -Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. 2015;(May):1–8.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32405&lang=em
16. Brito C. Zika Virus: A New Chapter in the History of Medicine. *Acta Med Port.* 2016;28(6):679.
<http://actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/7341>
17. Melo A, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld P, Sampaio S, Filippis A. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obs Gynecol.* 2016;47:6–7.
18. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika virus. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;374:1552–63. doi:10.1056/NEJMra1602113
19. Messina JP, Kraemer MUG, Brady OJ, Pigott DM, Shearer FM, Weiss DJ, et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. *Elife.* 2016;5(APRIL2016):1–19.
20. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife.* 2015;4(JUNE2015):1–18.
21. Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia de virus Zika (ZIKV) en las Américas : Recomendaciones provisionales para la detección y diagnóstico por laboratorio. 29 de junio de 2015. 2015;1–4.
<http://www.cinu.mx/minisitio/zika/12022016/VigilanciaVirusZika.pdf>
22. Rabe I, Staples J, Villanueva J, Hummel K, Johnson J, Rose L, et al. Interim guidance for interpretation of zika virus antibody test results.

- MMWR Morb Mortal Wkly. 2016;65(21):543–6.
23. Nahmias AJ, Walls KW, Stewart, JA, Herrmann KL, Flynt WJ. The ToRCH complex-perinatal infections associated with toxoplasma and rubeolla, cytomegalovirus and herpes simplex viruses. *Pediatr Res.* 1971;5(8):405–6.
 24. Alexandra VC, Therese R, Hans H, Annette B, Mathilde HI. Ultrasound indications for maternal STORCH testing in pregnancy. *Swiss Med Wkly.* 2017;147(45–46):1–7.
 25. Nissen J, Jokelainen P, Stensvold CR, Trevisan C, Fuchs J, Burgdorf KS, et al. The disease burden of congenital toxoplasmosis in Denmark, 2014. *PLoS One.* 2017;12(5):1–12.
 26. Smit GSA, Padalko E, Van Acker J, Hens N, Dorny P, Speybroeck N, et al. Public Health Impact of Congenital Toxoplasmosis and Cytomegalovirus Infection in Belgium, 2013: A Systematic Review and Data Synthesis. *Clin Infect Dis.* 2017;65(4):661–8.
 27. Brasil M da S-S de A à S. Atenção ao Pré-Natal de baixo risco. Vol. 32, *Cadernos de Atenção Básica.* 2012.
 28. Yamamoto R, Ishii K, Shimada M, Hayashi S, Hidaka N, Nakayama M, et al. Significance of maternal screening for toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus and herpes simplex virus infection in cases of fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39(3):653–7.
 29. Saldan A, Forner G, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abate D. Testing for Cytomegalovirus in Pregnancy. *J Clin Microbiol.* 2016;55(3):693–702.
 30. Enders M, Daiminger A, Exler S, Ertan K, Enders G, Bald R. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 115 cases: a 5 years'

- single center experience. *Prenat Diagn.* 2017;37(4):389–98.
31. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* 2001;21(5):362–77.
 32. Gunkel J, Van Der Knoop BJ, Nijman J, De Vries LS, Manten GTR, Nikkels PGJ, et al. Congenital Cytomegalovirus Infection in the Absence of Maternal Cytomegalovirus-IgM Antibodies. *Fetal Diagn Ther.* 2017;42(2):144–9.
 33. Tanimura K, Tairaku S, Ebina Y, Morioka I, Nagamata S, Deguchi K, et al. Prediction of congenital cytomegalovirus infection in high-risk pregnant women. *Clin Infect Dis.* 2017;64(2):159–65.
 34. Naing ZW, Scott GM, Shand A, Hamilton ST, Van Zuylen WJ, Basha J, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy: A review of prevalence, clinical features, diagnosis and prevention. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 2016;56(1):9–18.
 35. Bascietto F, Liberati M, Murgano D, Buca D, Iacovelli A, Flacco ME, et al. Outcome of fetuses with congenital parvovirus B19 infection: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;52(5):569–76.
 36. Agra I, Amorim Filho A, Lin L, Biancolin S, Francisco R, Brizot M. Parameters Associated with Adverse Fetal Outcomes in Parvovirus B19 Congenital Infection. *Rev Bras Ginecol e Obs / RBGO Gynecol Obstet.* 2017;39(11):596–601.
 37. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease,

- and epidemiology. *Parasitology*. 2012;139(11):1375–424.
38. Wallon M, Peyron F, Cornu C, Vinault S, Abrahamowicz M, Bonithon Kopp C, et al. Congenital toxoplasma infection: Monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. *Clin Infect Dis*. 2013;56(9):1223–31.
 39. De Oliveira Azevedo CT, Do Brasil PEAA, Guida L, Moreira MEL. Performance of Polymerase chain reaction analysis of the amniotic fluid of pregnant women for diagnosis of congenital toxoplasmosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(4):1–26.
 40. Wallon M, Peyron F. Congenital Toxoplasmosis: A Plea for a Neglected Disease. *Pathogens*. 2018;7(1):25.
 41. Dhombres F, Friszer S, Maurice P, Gonzales M, Kieffer F, Garel C, et al. Prognosis of Fetal Parenchymal Cerebral Lesions without Ventriculomegaly in Congenital Toxoplasmosis Infection. *Fetal Diagn Ther*. 2017;41(1):8–14.
 42. Tsimis ME, Sheffield JS. Update on syphilis and pregnancy. *Birth Defects Res*. 2017;109(5):347–52.
 43. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sífilis - Estratégias para Diagnóstico no Brasil. 2010. p. 1–100.
 44. Kidd SE, Grey JA, Torrone EA, Weinstock HS. Increased Methamphetamine, Injection Drug, and Heroin Use Among Women and Heterosexual Men with Primary and Secondary Syphilis — United States, 2013–2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep [Internet]*. 2019;68(6):144–8. http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6806a4.htm?s_cid=mm6806a4_w

45. Simms I, Tookey PA, Goh BT, Lyall H, Evans B, Townsend CL, et al. The incidence of congenital syphilis in the United Kingdom: February 2010 to January 2015. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2017;124(1):72–7.
46. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sífilis 2018. *Bol Epidemiológico.* 2018;49(45):1–43.
47. Rac M, Bryant S, McIntire D, Cattle J, Twickler D, Wendel Jr. GD, et al. Progression of ultrasound findings of fetal syphilis after maternal treatment. *Am J Obs Gynecol.* 2014;211(4):426.
48. James SH, Kimberlin DW, Whitley RJ. Antiviral Therapy for Herpesvirus Central Nervous System Infections: Neonatal Herpes Simplex Virus Infection, Herpes Simplex Encephalitis, and Congenital Cytomegalovirus Infection. *Antiviral Res.* 2009;83(3):207–13.
49. Boppana SB, Britt WJ, Fowler K, Hutto SC, James SH, Kimberlin DW, et al. Pathogenesis of Non-Zika Congenital Viral Infections. *J Infect Dis.* 2017;216(Suppl 10):S912–8.
50. Marquez L, Levy M, Munoz F, Palazzi D. A Report of Three Cases and Review of Intrauterine Herpes Simplex Virus Infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(2):153–7.
51. Baquero-Artigao F. Actualización en infecciones herpéticas congénitas y neonatales: Infección por citomegalovirus y herpes simple. *Rev Neurol.* 2017;64(Supl 3):S29–33.
52. Ghi M, Soliriadis A, Calda P, Da Silva Costa F, Raine-Fenning N, Alfrevic Z, et al. ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;48(3):256–68.
53. Cruz-Lemini M, Parra-Saavedra M, Borobio V, Bennasar M, Goncé A,

- Martínez JM, et al. How to perform an amniocentesis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44(6):727–31.
54. Simões M, Marques C, Gonçalves A, Pereira AP, Correia J, Castela J, et al. Amniocentesis in HIV Pregnant Women: 16 Years of Experience. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2013;2013:1–5.
55. Alfrevic Z, Navaratnam K, Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;(9).
56. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do Sistema nervoso central (SNC) - Versão 2 -10/03/2016. Ministério da Saúde [Internet]. 2015;1–60.
<http://combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/Microcefalia-Protocolo-de-vigilancia-e-resposta-10mar2016-18h.pdf>
57. Brasil, Saúde M da, Saúde S de A à. Protocolo de atenção à saúde e resposta à ocorrência de Microcefalia - Versão 3 -Março 2016. 2016. p. 1–42. http://combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/Protocolo_SAS_versao_3_atualizado.pdf
58. World Health Organization. Situation Report - Zika virus, microcephaly and Guillan-Barré syndrome - 29 september 2016 [Internet]. New Blackfriars. 2016. p. 1–6. <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/29-september-2016/en/>
59. Brasil. Ministério da Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Microcefalias- COES. Informe epidemiológico no 38 – Semana epidemiológica (SE) 31/2016 (31/07/2016 a 08/08/2016)

- Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil [Internet]. 2016. p. 1–4. http://combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/informe_microcefalia_epidemiologico38.pdf%0A%0A
60. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. *Bol Epidemiológico*. 2019;50:1–8.
61. Brasil P, Pereira Jr. J, Moreira M, Ribeiro Nogueira R, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2321–34.
62. Ventura C V., Maia M, Bravo-Filho V, Góis AL, Belfort R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet*. 2016;387(10015):228.
63. Ventura C V., Maia M, Dias N, Ventura LO, Belfort R. Zika: Neurological and ocular findings in infant without microcephaly. *Lancet*. 2016;387(10037):2502. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30776-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30776-0)
64. 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*. 2017;171(9):847–54.
65. Zin AA, Tsui I, Rossetto JD, Gaw SL, Neves LM, Zin OA, et al. Visual function in infants with antenatal Zika virus exposure. *Journal of AAPOS* [Internet]. 2018;452-456.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2018.07.352>
66. Tsui I, Moreira MEL, Rossetto JD, Vasconcelos Z, Gaw SL, Neves LM, et al. Eye Findings in Infants With Suspected or Confirmed Antenatal Zika

- Virus Exposure. *Pediatrics* [Internet]. 2018;142(4):e20181104.
<http://pediatrics.aappublications.org/lookup/doi/10.1542/peds.2018-1104>
67. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;374(20):1981–7.
<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMSr1604338>
68. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;374(10):951–8. Available from:
<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1600651>
69. Driggers R, Ho C, Korhonen E, Kuivanen S, Jaaskelainen A, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med*. 2016;374(22):2142–51.
70. van der Eijk A, van Genderen P, Verdijk R, Reusken C, Mogling R, van Kempen J, et al. Miscarried associated with zika virus infection. *N Engl J Med*. 2016;375:1002–4.
71. Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, Davi HPF, Iglezias SDA, Kanamura CT, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*. 2016;388(10047):898–904.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30883-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30883-2)
72. Jurado KA, Simoni MK, Tang Z, Uraki R, Hwang J, Householder S, et al. Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. *JCI Insight* [Internet]. 2016;1(13):1–6.
<https://insight.jci.org/articles/view/88461>
73. Hazin A, Poretti A, Cruz D, Tenorio M, van der Linden A, Pena L, et al.

- Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. *N Engl J Med*. 2016;374:2193–5.
74. De Oliveira Melo AS, Aguiar RS, Amorim MMR, Arruda MB, De Oliveira Melo F, Ribeiro STC, et al. Congenital Zika virus infection: Beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol*. 2016;73(12):1407–16.
75. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2016;18(5):587–90.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
76. Cugola F, Fernandes I, Russo F, Freitas B, Dias J, Guimarães K, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016;534:267–71.
77. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* [Internet]. 2016;352(April):816–9.
<http://science.sciencemag.org/content/early/2016/04/11/science.aaf6116>.
78. Mysorekar I, Diamond M. Modeling Zika Virus Infection in Pregnancy. *N Engl J Med*. 2016;375:481–4.
79. Halai UA, Nielsen-Saines K, Moreira ML, De Sequeira PC, Pereira JP, De Araujo Zin A, et al. Maternal Zika virus disease severity, virus load, prior dengue antibodies, and their relationship to birth outcomes. *Clin Infect Dis*. 2017;65(6):877–83.
80. Rodriguez-Barraquer I, Costa F, Nascimento EJM, Nery Junior N, Castanha PMS, Sacramento, Gielson Almeida Cruz J, et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue

- endemic region. *Science* (80-). 2019;363(6427):607–10.
81. Oduyebo T, Igbinsola I, Petersen EE, Polen KND, Pillai SK, Ailes EC, et al. Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Pregnant Women with Possible Zika Virus Exposure — United States, July 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(29):739–44.
<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6529e1.htm>
82. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(28):716–7.
<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6528e2.htm>
83. Calvet G, Aguiar R, Melo A, Sampaio S, 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.* 2016;16(6):653–60.
84. Salomon LJ, Alfirovic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, et al. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(1):116–26.
85. Bhide A, Acharya G, Bilardo C, Brezinka C, Cafici D, Hernandez-Andrade E, et al. ISUOG guias práticas: uso do ultrassom Doppler em obstetrícia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41:233–9.
86. Committee CS. ISUOG practice guidelines: Performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(1):102–13.
87. Snijders R, Nicolaidis K. Fetal biometry at 14-40 weeks gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1994;4:34–48.

88. Verburg BO, Steegers EAP, De Ridder M, Snijders RJM, Smith E, Hofman A, et al. New charts for ultrasound dating of pregnancy and assessment of fetal growth: Longitudinal data from a population-based cohort study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31(4):388–96.
89. Yudkin P.L, Aboualfa J.A, Eyre J.A, Redman C.W.G, Wilkinson A.R. New birthweight and head circumference centiles for gestational ages 24 to 42 weeks. *Early Hum Dev.* 1987;15:45–52.
90. Magann EF, Sanderson M, Martin JN, Chauhan S. The amniotic fluid index, single deepest pocket, and two-diameter pocket in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(6):1581–8.
91. Parra-Cordero M, Lees C, Missfelder-Lobos H, Seed P, Harris C. Fetal arterial and venous Doppler pulsatility index and time averaged velocity ranges. *Prenat Diagn.* 2007;27:1251–7.
92. Mari G, Adrignolo A, Abuhamad A, Pirhomen J, Jones D, Ludomirsky A, et al. Diagnosis of fetal anemia with Doppler ultrasound in pregnancy complicated by maternal blood group immunization. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1995;5:400–5.