



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA**

**Incidência de desfechos clínicos e alterações no
desenvolvimento em crianças nascidas durante o surto de
ZIKV: estudo de coorte em uma comunidade urbana do Brasil.**

Juan Pablo Aguilar Ticona

**SALVADOR
2019**

Juan Pablo Aguilar Ticona

Incidência de desfechos clínicos e alterações no desenvolvimento em crianças nascidas durante o surto de ZIKV: estudo de coorte em uma comunidade urbana do Brasil.

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva do Instituto de Saúde Coletiva.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Federico Costa

SALVADOR

2019

FICHA CARTOGRÁFICA

UFBA/SIBI/Biblioteca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira

Aguilar, Juan Pablo

Incidência de desfechos clínicos e alterações no desenvolvimento em crianças nascidas durante o surto de ZIKV: estudo de coorte em uma comunidade urbana do Brasil / Juan Pablo Aguilar. -- Salvador, 2019.

66 f.

Orientador: Prof^o Dr^o Federido Costa.

Dissertação (mestrado Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva) - Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia,

1. xZika. 2. Neurodesenvolvimento. I. Costa, Federico. II. Aguilar, Juan Pablo. II. Título.

COMISSÃO EXAMINADORA

Darci Neves dos Santos (Professora Adjunta – ISC/UFBA)

Doutorado em Epidemiologia Psiquiátrica pela- University of London, Inglaterra

Jamary Oliveira Filho (Professor Associado – Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA)

Doutorado em Neurologia pela Universidade de São Paulo. Brasil

Federico Costa (Professor Adjunta – ISC/UFBA)

Doutor em Biotecnologia e Medicina Investigativa pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

A minha mãe e a meu pai que me
deram tudo nesta vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Juan Ariel Max Aguilar Espinoza e Lucy Ticona Ali e aos meus irmãos Roy e Piero, pelo todo o apoio apesar da enorme distancia.

Aos meus mentores Prof. Dr. Federico Costa e Prof. Dr. Albert Ko pela atenção, paciência, estímulo e confiança mostrada durante meu trajeto pelo mestrado;

À Diana Zeballos, pela sua ajuda apoio e sacrificio constante no meu crescimento profissional;

Aos participantes de este estudo, mães e crianças que se doaram gratuitamente para a produção de conhecimento científico;

Ao pessoal do NEB, LaBM e do projeto de Leptospirosis da FIOcruz, pelo apoio técnico no analises e na coleta da informação.

Aos meus professores do ISC por todos os conhecimentos oferecido para minha formação.

Aos meus amigos e colegas, que foram a ajuda para diminuir a saudade de ficar fora da minha terra.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bayley III	Escalas de desenvolvimento do bebê e da criança pequena 3er edição
BOB	“ <i>NS1 blockade-of-binding</i> ” Bloqueio da união á NS1
CHIV	Vírus da Chikungunya
CMV	Citomegalovirus
DENV	Vírus da Dengue
DP ou SD	Desvio Padrão ou “ <i>Standar Desviation</i> ”
HINE	<i>Hammersmith infant neurological examination</i>
MC	Microcefalia
NS1	“ <i>Nonstructural protein 1</i> ” Proteína não estrutura
EOA ou OEA	“ <i>Otoacoustic emissions test</i> “ ou Exame de otoemissão acústica
SCZ	Síndrome congênita da Zika
WNV	“ <i>West Nile Virus</i> ” Vírus da febre do Nilo
ZIKV	Vírus da Zika

SUMARIO

1. RESUMO	11
2. ABSTACT	12
3. INTRODUÇÃO	13
4. EMBASAMENTO TEÓRICO	15
4.1. Vírus da Zika	15
Classificação e caraterísticas do vírus.....	15
Ciclo e transmissão do ZIKV	15
4.2. História da propagação da doença no mundo.....	17
4.3. Sintomas clínicos	18
a) Formas leves	18
b) Sequelas neurológicas	18
c) Síndrome de Guilhan Barre.....	19
d) Síndrome congênita do Virus Zika (SCZ)	20
4.4. ZIKA e desenvolvimento	24
a) Neurodesenvolvimento	25
4.5. Desafios do diagnóstico laboratorial da infecção pelo ZIKV	26
5. OBJETIVOS DO ESTUDO	29
5.2. Objetivo principal	29
5.3. Objetivos secundários	29
6. ARTIGO	30
7. CONCLUSÕES	58
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
BIBLIOGRAFIA.....	61

SUMARIO DE FIGURAS Y TABELAS

Tabelas

Table 1: Baseline demographic and clinical characteristics of mothers in the Pregnancy Cohort — Salvador, Brazil, January 2015 to December 2016	48
Table 2: Neurological examination, ophthalmological, auditory and neurodevelopmental evaluation outcomes.	51
Supplemental table 1: Anthropometric evaluation outcomes in children with and without evidence of ZIKV infection during pregnancy in their mothers.	54
Supplemental table 2: Neurodevelopmental of 16 children without optimal neurodevelopmental screening result.	55
Supplemental Table 3 Cognitive development and auditory behavior of 13 children from ZIKV exposure women during the pregnancy according symptoms during the pregnancy.	56

Figuras

Figure 1: Flowchart of children born to mothers, included in the Pau da Lima cohort, and pregnant during the epidemic of Zika virus in Salvador, Brazil, January 2015 to December 2016.	47
Figure 2: Timeline of follow-up standardized by conception day and ZIKV serological status from mothers.	50
Figure 3: Anthropometric and neurodevelopment outcomes in children with and without evidence of ZIKV infection during pregnancy in their mothers.	53
Supplemental figure 1. Bayley III score of 16 children without optimal neurodevelopmental screening result.	54

1. RESUMO

Embora o nordeste do Brasil tenha sido o epicentro da epidemia do Zika em 2015, ainda é limitada informação prospectiva na região sobre a transmissão do vírus Zika em mulheres grávidas e os desfechos clínicos nas crianças. Desde janeiro de 2013, temos realizado um estudo prospectivo de base populacional sobre leptospiroses em residentes de uma comunidade em Salvador, Brasil. Nesta população foram identificadas mulheres que estiveram grávidas entre janeiro 2015 e junho 2016 e foram analisadas as amostras coletadas bianualmente para identificar eventos de soroconversão para o anticorpo monoclonal ZIKV35 usando o *Blockade of Binding* (BoB) assay. Foram avaliados os desfechos clínicos e as alterações no desenvolvimento das suas crianças nascidas durante o período de estudo, a través de entrevistas às mães, medidas antropométricas, exames neurológicos (*Hammersmith Infant Neurological Exam*, HINE), e avaliação neurodesenvolvimento aplicando as escalas de Bayley III, avaliações audiometrias e oftalmológicas. Entre as 655 participantes em idade reprodutiva dentro da coorte, 66 (10%) teve ao menos uma gravidez durante o período de estudo. Completamos o seguimento de 46 (70%) das 66 mulheres, das quais 13 (28%) foram consideradas expostas (com soroconversão durante a gravidez) e 33 (72%) não expostas (sem soroconversão ou antes ou depois da gravidez). As 46 crianças avaliadas não tiveram evidencia de microcefalia ou defeitos congênitos ao nascimento, no entanto, as 13 crianças das mães que soro converteram durante a gravidez tiveram mais risco para ter scores de desenvolvimento cognitivo baixo menor a 1 DS (RR 5,07; 95% CI 1.10 – 43.92) quando comparados com as crianças de mães que não soroconverteram durante a gravidez (4 de 13 [31%] vs. 2 de 33 [6%], respectivamente). Da mesma forma, crianças de mães que soroconverteram durante a gravidez, tiveram maior risco (RR 6.82: 1.54 – 30.17) para alterações na avaliação auditiva comportamental quando comparados com as crianças de mães que não soroconverteram durante a gravidez (5 de 13 [39%] vs. 2 de 31 [7%], respectivamente). Estes achados sugerem que, crianças expostas no útero ao vírus do Zika tiveram um atraso significativo no neurodesenvolvimento, ainda que com ausência de evidencia clínica para sequelas neurológicas ao nascimento.

2. ABSTRACT

Northeast Brazil was the epicenter of the Zika epidemic in 2015, yet little if any prospective information exists on Zika virus (ZIKV) transmission among pregnant women from the region and clinical outcomes of their infants. We have been conducting a community-based prospective study of leptospirosis among urban slum residents since January 2013 in Salvador, Brazil. From this population, we identified women who were pregnant from January 2015 to June 2016 and identified incident Zika seroconversion events among participants by analyzing biannually collected samples for the ZIKV35 monoclonal antibody using the Blockade of Binding (BoB) assay. We evaluated adverse outcomes during pregnancy, birth and infancy by interviewing mothers and performing anthropometric measurements as well as neurologic (Hammersmith Infant Neurological Exam, HINE), audiometric and ophthalmological evaluations and examinations with Bayley Scales of Infant Development III. Among a cohort of 655 participants, 66 (10%) had at least one pregnancy during the study period. We completed follow-up for 46 (70%) of the 66 women, of whom Zika seroconversion occurred prior to, during and after pregnancy in 25 (54%), 13 (28%), and 1 (2%), respectively. The 46 infants did not have evidence of microcephaly or congenital defects at birth. However, the 13 infants of mothers who seroconverted during pregnancy had increased risk of having a low cognitive score $< 1SD$ (RR 2.96; 95% CI 1.32 – 6.63) than the 33 infants of mothers who did not seroconvert during pregnancy (4 of 13 [31%] vs. 2 of 33 [6%], respectively). Similarly, infants of mothers who seroconverted during pregnancy had increased risk (RR 6.82: 1.54 – 30.17) of having altered behavioral audiometry findings than infants of mothers who did not seroconvert during pregnancy (5 of 13 [39%] vs. 2 of 31 [7%], respectively). These findings suggest that a significant proportion of infants exposed in utero to ZIKV develop developmental deficiencies despite the absence of clinically evident neurological sequelae.

3. INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus que foi responsável por uma série de epidemias na Micronésia, no Pacífico Sul e nas Américas (1-3). Os primeiros relatos deste vírus na literatura científica aparecem durante a década de 1940 na África, quando este patógeno foi primeiramente isolado em macacos *Rhesus* e mais tarde, em 1954, em humanos na Nigéria (4, 5). A transmissão é principalmente vetorial, através de artrópodes hematófagos, incluindo o *Aedes aegypti*, importante na transmissão urbana, e considerado o mais eficiente vetor da transmissão do ZIKV e de doenças como a Dengue, Febre amarela e Chikungunya (1). O vírus ingressa no mosquito quando este se alimenta de um reservatório infectado (geralmente primatas), e se reproduz no mosquito vetor, permanecendo nele durante toda a vida. A transmissão do vírus para um novo reservatório é dada quando o mosquito infectado se alimenta novamente (1, 6). Outras formas de transmissão são a via sexual, transfusão sanguínea e, ainda, estão sendo avaliadas a transmissão através da leite e urina (4, 7).

O quadro clínico associado à infecção por ZIKV foi descrito inicialmente como leve e autolimitado (1). Após surtos no Pacífico Sul e nas Américas, a infecção pelo ZIKV foi associada com desfechos mais graves (4). Distúrbios neurológicos, incluindo a síndrome de Guillain-Barré (GBS), encefalites e mielites têm sido descritos em adultos (8), enquanto um amplo espectro de alterações neurológicas, incluindo microcefalia, tem sido observado em fetos e neonatos (9). Somente no Brasil, o número de casos notificados de microcefalia aumentou de 5,0 casos por 100 mil nascidos vivos entre 2000 e 2014 para 54,6 casos por cada 100 mil nascidos vivos em 2015 (10). A magnitude deste problema fez com que Organização Mundial da Saúde (WHO) e Organização Pan-americana da Saúde (PAHO) declarassem essa epidemia de microcefalia associada a ZIKV como uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional (PHEIC) (11-13).

Existem provas suficientes que estabelecem a causalidade entre transmissão intrauterina do ZIKV e desfechos como microcefalia e outras anomalias neurológicas (14, 15). O conjunto dessas alterações é conhecido como síndrome congênita do Zika vírus (SCZ). Esta síndrome é resultado das anomalias estruturais e deficiências funcionais secundárias a danos ao sistema nervoso central e periférico ocasionadas pelo vírus (12, 14, 15). Estas alterações podem provocar a diminuição do perímetro cefálico e anormalidades como: lesões oftalmológicas (principalmente dano do nervo óptico e da retina, cicatrização

macular e mancha macular de pigmento da retina), contraturas congênitas relacionadas a artrogripose e pé torto, hipertonia precoce marcada e sintomas de afeção extrapiramidal (15). Outras alterações relacionadas à transmissão congênita do ZIKV, observadas com menor frequência, são a perda auditiva, convulsões e disfagia (15). É provável que os casos observados até agora sejam a manifestação das formas mais graves da doença (4, 16) e que as formas leves, com sequelas menos evidentes, e que afetam outros órgãos ou funções, ainda não tenham sido identificadas e caracterizadas (16).

Estudos de base populacional, que descrevam o espectro e frequência das manifestações clínicas e de desenvolvimento, são necessários para poder caracterizar a verdadeira carga do SCZ. Durante a epidemia de ZIKV, houve poucos estudos em andamento que permitiram acompanhar prospectivamente mulheres expostas e avaliar o efeito da transmissão congênita do vírus em desfechos clínicos e de desenvolvimentos em crianças nascidas destas mães. Um destes raros estudos de coorte em área urbana aconteceu em Salvador, no bairro de Pau da Lima onde os moradores desta comunidade são parte de um estudo de Coorte prospectiva intitulada “Determinantes sociais e eco-ambientais da leptospirose urbana” desenvolvido pelo Instituto de pesquisas Gonçalo Moniz- Fiocruz-BA. Este estudo acompanha mais de 2000 moradores desde o ano de 2003 permitindo ter um registro da passagem da epidemia nesta comunidade e suas consequências. Embora não tivessem sido identificados casos de microcefalia na coorte durante a epidemia, este projeto apresenta uma oportunidade valiosa para determinar a incidência das manifestações clínicas leves e das alterações no desenvolvimento em crianças que nasceram durante o surto de ZIKV nesta comunidade.

4. EMBASAMENTO TEÓRICO

4.1. Vírus da Zika

Classificação e características do vírus

O vírus da Zika (ZIKV) é um arbovírus. O termo arbovírus é um acrônimo de “*arthropod-borne virus*” que, em português, faz referência aos vírus que são transmitidos por artrópodes (1, 3). O ZIKV tem uma cadeia simples positiva de RNA, pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. Análises genômicas mostraram uma grande variedade de subclasses, entretanto as variedades Asiática e a Africana são reconhecidas como as de maior importância (1).

Ciclo e transmissão do ZIKV

No ciclo dos arbovírus, pode-se identificar dois atores principais, o hospedeiro/reservatório e o vetor. Frequentemente, um arbovírus depende de um hospedeiro/reservatório não-humano para poder se desenvolver (3). No entanto, vírus como o vírus da Dengue (DENV), o vírus da Chikungunya (CHIV), ou mesmo, o ZIKV, se adaptaram aos humanos e tornaram-nos um hospedeiro final (2, 3). O resultado disto é um ciclo de transmissão mosquito-humano-mosquito, sem a necessidade de um hospedeiro/reservatório não-humano. Este ciclo frequentemente ocorre nos entornos urbanos e suburbanos (2, 3). Entretanto, existem outros possíveis reservatórios para o ZIKV, e pesquisas encontraram que, além dos primatas, há resposta imunológica em mamíferos grandes, como zebras, elefantes e, também, em pequenos como os roedores (1). Recentemente no Brasil, foi relatada a circulação do ZIKV em primatas não humanos em áreas urbanas podendo ser a origem de novas epidemias (17).

Mosquitos da família *Culicidae* e do gênero *Aedes* (3) são os principais vetores do ZIKV. Neste grupo, *Ae. aegypti* e em uma menor proporção *Ae. albopictus* são importantes na transmissão do ZIKV em entornos suburbanos e urbanos (2, 3), e são, também, responsáveis pela transmissão do DENV e CHIV (6). O ciclo de transmissão do ZIKV se inicia quando o vetor se alimenta do sangue de um reservatório/hospedeiro infectado

com o vírus. No mosquito, o vírus se desenvolve e se reproduz ao longo da vida do vetor e é transmitido ao novo reservatório/hospedeiro quando o vetor volta a se alimentar (2).

Artigos recentes sinalizam a importância das diferentes vias de transmissão do ZIKV. A evidência de que existe transmissão vertical do vírus da ZIKV agora é extensa. A primeira delas, um estudo de surto da Polinésia Francesa, durante os anos de 2013 e 2014 (18), identificou 18 casos de malformações graves do sistema nervoso central, incluindo microcefalia possivelmente associado ao ZIKV (19, 20). Mas a transmissão intrauterina só foi confirmada durante o surto no Brasil (4, 16), quando o RNA do vírus foi encontrado no líquido amniótico de mulheres com sintomas de infecção pelo ZIKV e nas amostras de cérebros pertencentes a fetos produtos de abortos. Estes achados confirmaram que o ZIKV pode passar a barreira placentária (21, 22). Este tipo de transmissão não acontece em todas as gravidezes de forma igual bem como nem todos os fetos expostos apresentam sintomas clínicos de SCZ (4). Mais importante, ainda não se tem certeza sobre a real magnitude das taxas de transmissão.

Existem outras formas de transmissão do ZIKV algumas já estabelecidas e outras ainda estão sendo pesquisadas. Dois inquéritos sorológicos na polinésia francesa assinalaram o potencial risco de uma transmissão em doadores de sangue; neles, identificou-se que 2,8% dos doadores eram assintomáticos e positivos para ZIKV (7, 23, 24). No Brasil, relatos de casos apontaram a provável transmissão do vírus por sangue de doadores infectados (4, 25, 26). A transmissão sexual é uma das mais alarmantes pela capacidade do vírus de se replicar no sêmen até 62 dias após a infecção (7, 27), foi discreta inicialmente em viajantes que retornaram a seus países e transmitiram o vírus a seus parceiros sexuais (28-31).

A amamentação é outra forma de transmissão de interesse para a saúde pública. O ZIKV foi isolado no leite materno, mas a informação sobre a eficiência desta via de transmissão ainda não é suficiente (32). No momento, só se tem relatos de casos da transmissão a neonatos na Polinésia Francesa e em Nova Caledônia (18, 33). O vírus também está presente na urina e na saliva das pessoas infectadas, mas não existe evidência suficiente de que sejam vias de transmissão eficientes (34). No momento, alguns modelos em roedores, através de inoculação intranasal, mostraram um possível potencial de infecção,

(4, 7, 35). A presença do vírus na urina foi uma ajuda para o diagnóstico tardio da infecção (7, 36). Comparado com os testes sorológicos, o ZIKV pode ser detectado mais tardiamente na urina (7, 37). Existe apenas um relato de caso de transmissão pelo contato com suor e lágrimas de um paciente com ZIKV presumindo-se que foi o contato com fluidos (lágrimas ou suor), frente a ausência de outra via possível de transmissão, sendo este porém caso único (38).

4.2. História da propagação da doença no mundo

O ZIKV foi identificado primeiramente em macacos *Rhesus* em 1947 na floresta que tinha o nome de Zika na Uganda e em mosquitos *Aedes africanus* em 1948 na mesma floresta (4, 5). Posteriormente, o primeiro relato de um humano infectado pelo ZIKV foi realizado na Nigéria em 1954 (4). A partir desse momento, se acredita que o vírus circulou em silêncio na África e Ásia, durante mais de 50 anos, e posteriormente emergiu nos surtos nas ilhas de Yap em 2007 e na Polinésia Francesa em 2013 (4).

Estudos sugerem que o ZIKV chegou ao Brasil entre 2013 e 2014. Diversas hipóteses apontam para os eventos esportivos no final de 2014 (12), onde participaram público e desportistas provenientes de áreas endêmicas (39, 40). Porém, um estudo apoiado na filogenética indica que este evento poderia ser anterior no 2013 e que possivelmente coincidiria com a Copa das Confederações (41). No início do 2015, o sistema epidemiológico de vigilância em Salvador foi o primeiro a alertar sobre um surto de febre exantemática relacionada ao ZIKV (42). No final de 2015, começou a ser identificado um incremento nos casos de microcefalia e outros transtornos neurológicos que, posteriormente, foram associados à infecção pelo ZIKV (2, 42, 43).

No Brasil, a região nordeste foi a principal afetada, sinalizada pela elevada circulação do vírus e altas taxas de SCZ. Pesquisadores baianos estimaram que a soroprevalência após o surto em 2015 era de 63.3 % na cidade de Salvador (44). Em fevereiro de 2015, o Ministério da Saúde de Brasil declarou estado de emergência sanitária nacional baseado nos 268 casos de microcefalia registrados no estado de Pernambuco (44). Posteriormente, a Organização Mundial de Saúde realizaria uma medida similar, declarando o surto de ZIKV como um evento de saúde pública de interesse internacional

de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (45). Posteriormente, determinou-se que o ZIKV estava se espalhando por grande parte da América do Sul, América Central e parte dos Estados Unidos, atingindo aproximadamente 4 milhões de pessoas (46, 47). Em 2016, o ZIKV havia sido documentado em 66 países sendo que em 49 deles pela primeira vez (47).

4.3. Sintomas clínicos

a) Formas leves

Os sintomas do ZIKV aparecem após um período de incubação de três a doze dias após infecção (1, 48, 49). A maior parte das infecções transcorreram de forma assintomática, e alguns estudos apontam que 80-95% das infecções não apresentam manifestações clínicas ^{47,48}. Embora, o espectro da sintomatologia do ZIKV seja variado, os sintomas em adultos costumam ser moderados, autolimitados e pouco específicos, devido às semelhanças com os sintomas apresentados na infecção por outros arbovírus (48). O relato do surto das Ilhas Yap, durante o ano 2007, identificou que o rash cutâneo (exantema maculopapular que se estende desde a cabeça até as extremidades) foi o sintoma mais relatado, com uma frequência de 90% (49). Outros sintomas como febre, artralgia, artrites e conjuntivites também foram frequentes, acima de 50% (49). Numa coorte de pacientes adultos em Rio de Janeiro, foram avaliados os primeiros 4 dias da infecção dos casos confirmados por laboratório; destes, 97% dos participantes apresentaram rash cutâneo, comparados com 79% dos casos não confirmados (50). Outras alterações frequentes nessa coorte foram prurido, prostração, cefaleia, artralgia e mialgia, com uma percentagem acima do 60% (50). Nessa coorte, a febre não foi um sintoma frequente, mas foi relatada como baixa e presente durante o primeiro dia (50). Outros sintomas que apareceram com menor frequência na literatura foram edema de extremidades, dor retro-ocular, hiperemia conjuntival, mialgia e problemas digestivos (1, 48).

b) Sequelas neurológicas

Os flavivirus são vírus com habilidades neuroinvasivas e neurovirulentas (51). Modelos

in vitro e modelos animais, com roedores, geraram evidencia do efeito neurotropico do ZIKV. O ZIKV tem como alvo células neuronais progenitoras, astrocitos e neurônios que se encontram em qualquer fase de desenvolvimento (52). Estes modelos também assinalam que ZIKV tem preferência pelas células progenitoras neuronais no desenvolvimento cerebral precoce (53).

Durante os surtos na Polinésia Francesa e na América, o ZIKV foi associado com manifestações neurológicas graves que incluem a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (8, 54, 55). Casos de encefalites e mielites foram associados com o ZIKV quando foi determinada a presença deste vírus no liquido cefalorraquídeo. Mas a baixa frequência destas alterações (encefalites e mielites) dificulta a confirmação da sua relação com o ZIKV (8).

c) **Síndrome de Guillain Barre**

A SGB é uma doença caracterizada pela paralisia flácida, que se inicia nos membros inferiores e progride pelo resto do corpo com uma letalidade elevada quando não são dados os cuidados necessários. Ela é consequência de uma resposta autoimune que ainda não é clara.

A primeira evidencia da relação do ZIKV e o SGB foi no surto da Polinésia Francesa (4, 56). Num estudo caso controle, onde foram identificadas 42 pessoas com SGB, determinou-se que todos os casos foram infectados pelo ZIKV sendo que 98% deles apresentaram infecção recente (56). Um estudo na Polinésia Francesa identificou que os 42 casos SGB descritos durante o surto de 2013 – 2014, eram mais do que seria esperado dado que nos quatro anos previos ao surto a média anual foi de 5 casos (56, 57). Posteriores surtos no Pacífico e na América também mostraram um incremento na incidência dos casos de SGB, de 2 vezes em El Salvador (184 casos reportados), e 9,8 vezes na Venezuela (684 casos reportados), quando comparados com o número esperado de casos (57). Nestes estudos, mulheres foram mais frequentemente afetadas, compondo até 75% dos casos reportados (57).

d) Síndrome congênita do Virus Zika (SCZ)

A síndrome congênita do Virus Zika (SCZ) caracteriza-se por ser um conjunto amplo de alterações descritas em crianças infectadas pelo vírus através de via materno-fetal (15). As características clínicas da SCZ são consequências de danos neurológicos diretos e perda grave de massa cerebral. Dentro deste espectro, a microcefalia é a mais óbvia e estudada. Outras pesquisas também relacionam a transmissão congênita com outras alterações dentro do espectro do SCZ. Estas observaram manifestações para além do sistema nervoso central, incluindo deficiência auditiva, manifestações oculares, como cicatrização macular, mancha macular de pigmento e a atrofia coriorretiniana, bem como contraturas congênicas e hipertonia marcada com sintomas de afecção extrapiramidal que são distintas de outras condições congênicas (15, 43, 58).

d.1. Microcefalia

A microcefalia é o resultado do colapso da abóbada craniana pelas alterações no cérebro, relacionados a falta ou retardo do desenvolvimento dos neurônios e como consequência redução da matéria gris (15, 59). A microcefalia é definida como a redução do diâmetro occipitofrontal abaixo de 2 desvios padrões (DP) da média populacional e quando o valor está embaixo de 3 DP a microcefalia é considerada grave (15, 58). Aproximadamente dois de três casos de microcefalia são formas graves, com desproporção craniofacial, e em menor grau de depressão biparietal, occipital proeminente e excesso de pele a nuca (15, 60).

As primeiras pesquisas sobre a microcefalia foram relatos epidemiológicos e de casos clínicos que apontavam para um aumento no número de casos, assim como das suas características (15). O Brasil foi o país mais afetado pelo ZIKV, até junho de 2016 um total de 8,165 suspeitas de casos de microcefalia foram reportados, dos quais 1,638 foram confirmados, a maior parte atingiu a região norte e nordeste do país (61). Dado que a microcefalia é um evento raro, demonstrar a relação com o vírus da ZIKA foi um desafio para os pesquisadores. Uma metanálise de 8 pesquisas, com dados de Brasil, Colômbia, Puerto Rico, USA e a Guiana Francesa determinou a prevalência de microcefalia durante o surto em cada país de 2.3% (IC 95% = 1.0–5.3%) entre 2,941 gravidezes (62). Um

estudo de caso controle, realizado em 8 hospitais no Recife, identificou 32 crianças com microcefalia e determinou que o resultado desta alteração foi à infecção pelo ZIKV das mães durante a gravidez (61). Nesse mesmo estudo, entre 27 imagens disponíveis, as calcificações, a ventriculomegalia e lisencefalia foram as alterações mais frequentes (61).

Resultados similares, são descritos no seguimento da Coorte no Rio de Janeiro (63) e o seguimento dos pacientes nos territórios franceses na América (64). A coorte de Rio de Janeiro foi criada para realizar o seguimento de desfechos do vírus da Dengue (63). Neste estudo, 53% das mães foram expostas ao ZIKV. Entre as crianças seguidas, 117 nascidas vivas expostas ao ZIKV vs 57 nascidas vivas não-expostas, 42% tiveram alguma alteração clínica ou achado anormal nos exames de imagem incluindo 4 crianças com microcefalia. O segundo estudo de coorte, realizado nos territórios franceses na América, acompanhou 555 fetos e crianças, identificando 39 (7,0%) crianças com alterações neurológicas ou oftalmológicas. Microcefalia foi diagnosticada em 32 (5,8%) crianças, sendo que estes eventos eram mais frequentes quando a exposição aconteceu no primeiro trimestre de gestação. Os resultados de imagem também mostraram alterações como calcificações, ventriculomegalia e lisencefalia. Como conclusão, estes estudos demonstraram que o ZIKV está associado com microcefalia e outras alterações neurológicas incluídas na definição do SCZ.

d.2. Anormalidades oftalmológicas

A patogenia das lesões oculares não é clara. Acredita-se que estas lesões tem relação com o processo inflamatório e dano celular, mas o padrão de lesões é diferente ao apresentado em outras infecções congênicas (15). Dentro das lesões oculares descritas, as mais frequentes foram atrofia coriorretiniana, mancha macular de pigmento na macula e atrofia ou anomalias do nervo óptico (65-67). Outras alterações registradas com menor frequência são a microftalmia, coloboma, cataratas, calcificações intraoculares. Um estudo transversal realizado em 40 crianças identificou que alterações oftalmológicas foram associadas a menor perímetro cefálico (67).

d.3. Contraturas musculares e alterações osteo-articulares

Outras alterações que conformam o espectro clínico do SCZ são as contraturas congênitas de uma ou várias articulações. De forma semelhante as alterações anteriormente citadas, foram relatadas contraturas em fetos e lactantes com infecção congênita pelo ZIKV presumida ou confirmada por técnicas laboratoriais. A etiologia das contraturas musculares congênitas relacionadas ao ZIKV pode estar relacionada ao dano neurológico que atinge o trato corticoespinal, neurônios motores ou as interações entre o neurônio e o músculo (15, 68). Os resultados destas alterações são anormalidades motoras fetais, levando à diminuição dos movimentos e contraturas fetais (15, 68). Ainda está sendo explorada a origem e o mecanismo específico para estas contraturas resultantes da infecção por ZIKV (15). A infecção intrauterina por outros vírus como a rubéola, varicela e coxsackie tem sido associada à lactantes com artrogripose (69).

As contraturas na infecção pelo ZIKV variam dependendo do tipo de dano neurológico e da gravidade do mesmo (15). Os relatos de casos de crianças com microcefalia e suspeita de infecção congênita por ZIKV reportam que o pé torto isolado ocorreu entre 3,8% a 14% dos casos, e artrogripose entre 5,7% a 11%. Numa série de casos que incluiu 104 crianças, 7 (6,7%) com infecção congênita por ZIKV tiveram artrogripose; sendo que seis desses lactentes tinham um perímetro cefálico de pelo menos -2 DP abaixo da média. Outras alterações que apareceram foram a luxação congênita bilateral do quadril, provavelmente relacionada com a artrogripose, também luxação ou luxação parcial dos joelhos (uni ou bilateral) (14, 68) De sete lactantes com artrogripose, a ressonância magnética da coluna vertebral em quatro foi consistente com afinamento da medula e redução das raízes ventrais (14). Os achados eletromiográficos destes sete lactantes sugeriram envolvimento crônico de neurônios motores periféricos, bem como de neurônios motores centrais(14).

d.4. Anormalidades relacionadas com a audição

A perda auditiva é uma característica presente em outras doenças congênitas, dentre as quais estão o citomegalovírus (CMV), rubéola, toxoplasmose, herpes simples e sífilis. O diagnóstico delas precisa de uma avaliação integral e de equipamento tecnológico (70).

Uma série de casos de recém-nascidos no Brasil pesquisou a função auditiva mediante provas de otoemissão acústica em 23 neonatos com microcefalia relacionada ao ZIKV; encontrou-se que 9 % tinha perda auditiva neurosensorial, este foi o primeiro relato que descreveu esta relação (15, 70, 71). Posteriormente, outra série de casos fez o seguimento de um grupo de 70 crianças com microcefalia e evidência de infecção congênita por ZIKV, reportando menor proporção de casos, 6% das crianças tiveram perda auditiva, existindo diferença entre a gravidade dos casos e lateralidade (15, 70).

É desconhecida a prevalência da perda auditiva progressiva associada à infecção congênita pelo ZIKV. É preciso fazer as provas e o seguimento dos neonatos nascidos de mulheres que foram expostas ao ZIKV durante a gravidez, incluindo as crianças sem nenhum defeito aparente ao nascer (70). A perda auditiva deve ser considerada parte do SCZ e a exposição ao ZIKV deve ser considerada como risco para a perda auditiva (70).

d.5. Outras alterações associadas ao ZIKV

O espectro da lesão cerebral induzida pelo ZIKV tem ainda muitas lacunas de conhecimento. É importante notar que nem todos os bebês expostos ao ZIKV no útero têm anormalidades óbvias no nascimento. Acredita-se que muitas dessas crianças têm impedimentos menos óbvios que podem se tornam evidentes apenas com o tempo e podem atrasar o desenvolvimento normal. Esta hipótese está respaldada pelo fato de que pesquisadores em estudos recentes descobriram que a replicação de ZIKV nos cérebros das crianças continua após o nascimento (72). Reflexos primitivos exagerados, posturas anormais, pneumonia e outros problemas respiratórios, disfagia, refluxo e outros problemas gastrointestinais, epilepsia e hidrocefalia são características que estão sendo relatadas pelos médicos brasileiros, e tem possibilidade de fazer parte do quadro de SCZ (15).

Microcefalia após nascimento: Em Pernambuco observou-se uma diminuição do perímetro cefálico em treze lactantes com evidencia laboratorial de infecção congênita pelo vírus Zika e com perímetro cefálico normal no momento do nascimento. Estas crianças tiveram um acompanhamento multidisciplinar focado nas alterações do SCZ onde foi constatada a possibilidade do desenvolvimento pós-natal de microcefalia,

apresentando ventriculomegalia e volumen cerebral diminuído, malformações corticais e calcificações subcorticais. Esta foi o primer relato de casos sobre crianças com evidencia laboratorial de infecção congénita pelo ZIKV e com crescimento do perimetro cefálico inferior ao esperado e microcefalia desenvolvida depois do nascimento (73).

4.4. ZIKA e desenvolvimento

Não existem muitas informações sobre SCZ e desenvolvimento. Assim, nesta secção utilizamos os poucos estudos existentes e outras etiologias para discutir o possível prognóstico das crianças com SCZ.

Desenvolvimento em crianças com microcefalia: Um estudo de coorte retrospectiva, onde foram avaliadas 680 crianças com microcefalia, de diversas e raras etiologias (excluindo SCZ) encontrou que a redução do volume do cérebro está relacionada com problemas intelectuais. 65% dessas crianças apresentaram retardo no neurodesenvolvimento, como alterações cognitivas que apareceram em 34% a 57% dependendo do tipo de microcefalia (74).

Desenvolvimento em crianças com Epilepsia: Outra alteração com frequência elevada entre crianças com SCZ foi a epilepsia. Um estudo recente em Salvador, Brasil, identifico que crianças com a SCZ tinham 48% tiveram episódio convulsivos confirmados, e que em sua maioria precisaram múltipla medicação antiepiléptica (75). Epilepsia tem mostrado relação com baixas habilidades cognitivas, existindo uma relação inversamente proporcional entre os dois (74, 76).

Desenvolvimento em crianças sem microcefalia: Os problemas relacionados a crianças sem microcefalia, mas que foram expostas ao ZIKV, ainda não foram descritas. O seguimento delas é importante porque existe a possibilidade, como no caso do CMV, que as alterações relacionadas ao neurodesenvolvimento possam aparecer depois. Não existem dados disponíveis sobre crescimento, desenvolvimento cognitivo, desfechos oftalmológicos, auditivos e outros em crianças expostas ao ZKV no útero e que nasceram aparentemente normais.

a) Neurodesenvolvimento

Foi recentemente descoberto em modelos animais que a exposição congênita ao ZIKV induz um espectro de lesões silenciosas no cérebro fetal que passam despercebidas no período pré-natal, mas resultariam em desfechos piores do desenvolvimento neurológico (77). O que sugere que deve ser realizado o monitoramento a longo prazo dos possíveis desfechos neurocognitivos.

Um vírus que pode ser útil para se comparar ao ZIKV é o citomegalovírus (CMV). Assim como o ZIKV, o CMV pode ser transmitido congenitamente, é neurotrópico e causa um espectro amplo de sequelas nas crianças infetadas (78). A transmissão congênita do CMV está classicamente associada com perda auditiva, déficit cognitivos e no desenvolvimento da linguagem e alterações visuais (78, 79). De cada 10 crianças com infecção congênita, 1 desenvolve sintomas óbvios, dos quais entre 10 a 15 % desenvolveram algum tipo de alteração que só poderá ser detectada a longo prazo (78). Os estudos indicam que a perda auditiva e o déficit cognitivo são as alterações mais prevalentes em crianças sem alterações óbvias ao nascimento, condição que é menos frequente (80).

Nos Estados Unidos, durante o surto da febre do vírus do Nilo (WNV), um arbovirus também neurotrópico (81, 82), realizou-se o seguimento de 28 mulheres grávidas infectadas e das crianças produto dessas gravidezes. Nos seus resultados, apenas duas crianças tiveram desfechos negativos, relacionados com escalas cognitivas, de linguagem, sócio-emocionais e adaptativas. No entanto, se determinou que o risco de desenvolver desfechos negativos neonatais, como resultado da exposição ao WNV na gravidez, parece ser baixo e que provavelmente seja devido ao tamanho pequeno de sua amostra (81).

Três estudos publicados em 2018 e 2019 fizeram seguimento de crianças com transmissão congênita do ZIKV para avaliar o neurodesenvolvimento. Em Recife, crianças de dois anos com microcefalia severa (>3 DS) apresentaram um retardo no desenvolvimento cognitivo, de linguagem e motor de aproximadamente 20 meses, o domínio menos afetado foi o sócio emocional (83). Em um estudo que incluiu a informação disponível de 1450 crianças nos Estados Unidos e territórios associados

encontraram que nessa população 9% tinham neurodesenvolvimento alterado, 6% tinham microcefalia e 1% tinham ambos transtornos (84). O mais recente estudo de coorte que teve o objetivo de avaliar o uso de imagem para prever possíveis problemas no neurodesenvolvimento, encontraram que de 94 crianças avaliadas 11 tinham desenvolvimento abaixo de 2 DP e duas delas não tinham microcefalia e tinham resultados de imagem normal, mas seus resultados não foram estatisticamente significativos (85).

Esta discussão do marco teórico revela importantes lacunas no conhecimento sobre o espectro e frequência de desfechos clínicos e desenvolvimento em crianças expostas ao ZIKV durante a gravidez, mas sem microcefalia. Estudos que monitorem desenvolvimento cognitivo, através de testes neuropsicológicos e métodos padronizados, em crianças expostas independente da circunferência da cabeça ou sintomas associados são necessários para corrigir esta lacuna e possivelmente direcionar ações de saúde (86).

4.5. Desafios do diagnóstico laboratorial da infecção pelo ZIKV

A epidemia do ZIKV em Brasil e suas sequelas foram inesperadas. Durante aquele período poucas ferramentas diagnósticas de laboratório estiveram disponíveis, o que limitou o desenvolvimento das pesquisas.

O ZIKV pode ser detectado diretamente no soro ou no plasma durante um período breve na fase aguda da doença. A técnica de RT-PCR permite detectar o vírus até pouco mais de 5 semanas após do início dos sintomas mediante a identificação de RNA (4). Por outro lado, a infecção pelo ZIKV pode também ser identificada indiretamente mediante o uso de anticorpos IgM presentes entre 4 dias até 12 semanas após do início dos sintomas (4, 87). Quando as técnicas acima descritas não permitem obter resultados definitivos o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) é recomendável (87).

Entretanto, aspectos importantes no uso desses métodos diagnósticos devem ser considerados. A sorologia é difícil de interpretar em áreas endêmicas ou em pessoas com história previa de infecção por outros flavivírus devido à reação cruzada (4, 88). A avaliação através de PCR é comumente realizada em indivíduos durante os primeiros dias de sintomatologia associada a ZIKV. Porém, só uma fração (~70-80%) das pessoas

infectadas com ZIKV desenvolvem sintomas (47). Isto limita a identificação precoce da infecção, que é extremamente importante na população de mulheres grávidas. Estas características limitaram estudos prospectivos, que assim só conseguiram identificar mulheres grávidas infectadas pelo vírus com sintomatologia para poder avaliar posteriormente o desenvolvimento das crianças expostas intrauterinamente (85, 89). Alternativamente, outros estudos utilizaram qualquer resultado laboratorial disponível para poder determinar a exposição ao ZIKV, o que pode ter introduzido viés na determinação da exposição (84).

Tecnologias inovadoras têm aparecido como alternativa aos desafios do diagnóstico. Uma série de testes ELISA tem sido lançados no mercado com desempenho variável, como o ZIKV-NS2B (90) ou Zika MAC-ELISA (91). Um deles, denominado ELISA de bloqueio de ligação NS1 (BOB), emprega uma proteína não estrutural NS1 própria do ZIKV e a criação de anticorpos monoclonais humanos específicos para esta proteína (92). O teste é um ELISA competitivo devido a que tenta medir a presença de anticorpos em indivíduos imunes que são capazes de bloquear a ligação de um anticorpo monoclonal IgG marcado ao vírus zika revestido NS1 e o resultado e o percentagem de inibição da reação (92).

As provas para avaliar a sensibilidade e a especificidade do BOB NS1 foram desenvolvidas com amostras clínicas de viajantes e de participantes que vivem em áreas endêmicas ao ZIKV e outros flavivírus dentro deles DENV. Em 158 participantes analisados foi determinada uma sensibilidade após de 10 dias do início dos sintomas de 91,8% e esta sensibilidade incrementava com o tempo sendo que, após de ≥ 20 dias do início dos sintomas, a sensibilidade aumentou para 95,0% e quando este aumentava para ≥ 50 ou ≥ 100 dias após o início dos sintomas a sensibilidade foi de 94,3% e 95,0%, respectivamente (92). A especificidade foi avaliada em pacientes com exposição previa ao DENV de 171 pacientes e se identifico que > 10 dias após o início dos sintomas a especificidade foi de 88,9%. Mas a especificidade aumento para 91,9% quando foram analisados pacientes com outro tipo de flavivírus com febre amarela e o vírus da febre do Nilo (92),

Este novo teste está desenhado baseado numa prova de ELISA o que pode facilitar sua implementação pela simplicidade da técnica. Poderia ser considerada de baixo custo devido a que estimasse que a média do valor por poço em reagentes e materiais é de 0,25 dólares americanos (92). E frente ao desafio de nossa pesquisa, que involucra intervalos semestrais de coleta e a seleção de uma área endêmica de DENV, parece ser uma resposta à necessidade de uma prova sorológica que possa diferenciar o ZIKV de outros flavivirus e que pode se manter com resultados reagentes durante amplos intervalos de tempo fato que também é muito útil em estudos de soroprevalência.

5. OBJETIVOS DO ESTUDO

5.2. Objetivo principal

Determinar a incidência e o risco de manifestações clínicas e alterações relacionadas ao desenvolvimento em crianças de 6-18 meses de idade que nasceram durante o surto de ZIKV em uma comunidade urbana em Salvador Brasil.

5.3. Objetivos secundários

- Medir a incidência da infecção pelo ZIKV nas mulheres grávidas durante o surto de ZIKV na comunidade de Pau da Lima.
- Comparar as medidas antropométricas em crianças (no nascimento e após um ano de vida) nascidas de mulheres expostas e não expostas a ZIKV.
- Caracterizar os desfechos clínicos neurológicos e do neurodesenvolvimento em crianças após um ano de vida e que nasceram durante o surto.
- Descrever as manifestações clínicas oftalmológicas e fonoaudiológicas das crianças após um ano de vida e que nasceram durante o surto do ZIKV.

6. ARTIGO

Title: Risk of developmental, neurological and anthropometric growth abnormalities in children born to ZIKV infected mothers during pregnancy in a cohort of urban slum residents

Juan P. Aguilar¹, Nivison Junior^{1,2}, Joseph Lim³, Claudia Gambrah³, Gielson Sacramento², Bruno Freitas⁴, Joseane Bouzon⁴, Jamarly Oliveira-Filho⁵, Haritha Adhikarla³, Magelda Montoya⁶, Athena Chin⁶, Elsie A. Wunder Jr.³, Mitermayer G. Reis², Eva Harris⁶, Albert I. Ko^{2,3} Federico Costa^{1,2,3}

¹ Instituto da Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

² Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz/MS, Salvador, Bahia, Brazil.

³ Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, Connecticut, USA.

⁴ Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA - Brazil.

⁵ Hospital Geral Roberto Santos (HGRS), Salvador, Bahia, Brazil.

⁶ Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, California, USA.

Corresponding author: Federico Costa, PhD. Universidade Federal da Bahia, R. Basílio da Gama, 316 - Canela, Salvador, 40110-040, Bahia, Brazil. email: federico.costa@ufba.br

Word Count:

Abstract Word Count:

SUMMARY

Northeast Brazil was the epicenter of the Zika epidemic in 2015, yet little if any prospective information exists on Zika virus (ZIKV) transmission among pregnant women from the region and clinical outcomes of their infants. We have been conducting a community-based prospective study of leptospirosis among urban slum residents since January 2013 in Salvador, Brazil. From this population, we identified women who were pregnant from January 2015 to June 2016 and identified incident Zika seroconversion events among participants by analyzing biannually collected samples for the ZIKV35 monoclonal antibody using the Blockade of Binding (BoB) assay. We evaluated adverse outcomes during pregnancy, birth and infancy by interviewing mothers and performing anthropometric measurements as well as neurologic (Hammersmith Infant Neurological Exam, HINE), audiometric and ophthalmological evaluations and examinations with Bayley Scales of Infant Development III. Among a cohort of 655 participants, 66 (10%) had at least one pregnancy during the study period. We completed follow-up for 46 (70%) of the 66 women, of whom Zika seroconversion occurred prior to, during and after pregnancy in 25 (54%), 13 (28%), and 1 (2%), respectively. The 46 infants did not have evidence of microcephaly or congenital defects at birth. However, the 13 infants of mothers who seroconverted during pregnancy had increased risk of having low/borderline cognitive development scores (RR 5.07 ; 95% CI 1.05 – 24.44) than the 33 infants of mothers who did not seroconvert during pregnancy (4 of 13 [31%] vs. 2 of 33 [6%], respectively). Similarly, infants of mothers who seroconverted during pregnancy had increased risk (RR 6.82: 1.54 – 30.17) of having altered behavioral audiometry findings than infants of mothers who did not seroconvert during pregnancy (5 of 13 [39%] vs. 2 of 31 [7%], respectively) [missing data for 2 individuals]). These findings

suggest that a significant proportion of infants exposed in utero to ZIKV develop developmental deficiencies despite the absence of clinically evident neurological sequelae.

INTRODUCTION

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the *Flaviviridae* family ¹. Most ZIKV infections are either asymptomatic or cause a mild illness characterized by mild fever, rash, and arthralgia ². However, ZIKV infection is also associated with neurological abnormalities in adults, such as Guillain-Barré syndrome (GBS), encephalitis and myelitis ^{3,4}. Furthermore, intrauterine infection can lead to teratogenic effects in infants that have been grouped under the term Congenital Zika Syndrome (CZS) ⁵. This includes severe microcephaly (MC), alterations in brain structure, ocular abnormalities (particularly in the posterior segment), congenital contractures, marked hypertonia, and symptoms of extrapyramidal involvement ^{1,6}. Other possible manifestations are currently being investigated, such as epilepsy, dysphagia, hearing problems and neurodevelopment disturbances ⁶⁻¹¹.

While severe outcomes of CZS have been extensively described, little prospective information exists regarding the effects of congenital ZIKV infection on the long-term development of children, particularly those who did not present with any gross abnormalities at birth ^{12,13}. Animal models show that congenital exposure to ZIKV induces a spectrum of silent lesions in the fetal brain ¹³. As other neurotropic viruses have shown, ZIKV may cause subtle alterations that go undetected until later in life. ¹⁴⁻¹⁶. A study found that out 1,495 children born from laboratory confirmed ZIKV infected mothers, 9% had some alteration in neurodevelopment associated with congenital ZIKV infection and only 1% of them also had at least one Zika-associated birth defect identified ¹⁰. A cohort from Rio de Janeiro evaluated the use of neuroimaging to predict neurodevelopmental alteration, among 94 infants, 26% had a severe neurodevelopmental delay, from them 11% infants had abnormal imaging findings ¹⁷. Those studies have focused on children born from mothers with symptomatic

ZIKV infection during pregnancy and did not include mothers with asymptomatic congenital ZIKV infection. Characterizing the spectrum and incidence of neurodevelopmental abnormalities associated with both, symptomatic and asymptomatic, congenital ZIKV infection could lead to a better understanding of the burden of CZS, earlier interventions and improved clinical outcomes. In this study, we prospectively characterized the long term neurological development in infants born from woman pregnant during the Zika epidemic and that participate of a community base cohort in a slum community of Salvador, Brazil.

METHODS

This study was performed in Salvador, one of the epicenters of the Zika epidemic ¹⁸. Our study area was the slum community of Pau da Lima, where 73% (95% CI 70%-76%) of individuals were infected by ZIKV during the 2015 outbreak ¹⁹. We identified women that were pregnant during the outbreak and followed their children to evaluate neurodevelopmental outcomes after one year of birth.

This work built upon a long-term prospective cohort study of slum residents started in 2003, focusing on urban-slum-associated health problems ^{20 21}. The census performed in 2013 identified a high population density of 3,689 households and 14,122 individuals residing in 0.17 km². This slum community has social conditions, low socioeconomic status (median household per capita income of US\$ 1.30 per day), illegal settlements (85% of the studied population have not legal title to their domiciles), and substandard sanitation ²¹, that leave its residents vulnerable to contracting diseases and make it similar to other urban slum settlements in Brazil as well as other tropical regions around the world.

Using the census of 2013 as baseline, we randomly selected 3,716 participants \geq five-years-old. Of them, 2,421 (65.1%) fulfilled the inclusion criteria of the study by providing informed consent and sleeping > 3 nights per week in a home within the study area. We followed 2,016 (83.3%) participants in serologic surveys performed twice annually during the dry season from August to September and rainy season from February to March in 2015 and 2016. Among the 2,016, 1,130 were women, 781 (38.7%) with age between 10 and 49 years old in 2016. Women that reported being pregnant during the recruiting period (January 1st, 2015 to May 31st, 2016) and their children were selected for further analysis in this study (Figure 1).

Intrauterine ZIKV exposure

We used an NS1 (BOB) ELISA to evaluate exposure to ZIKV in pregnant woman included in this study. This assay has reported a sensitivity and specificity of 95.0% and 95.9%, respectively ²². We classified a positive ZIKV samples by using cut-off point $\geq 50\%$ inhibition of BOB ²². We defined intrauterine ZIKV exposure when a seroconversion between consecutive serosurveys was identified during the pregnancy period. Non-exposure was defined as absence of seroconversion or seroconversion before or after the pregnancy period. The pregnancy period was estimated by using date of birth and gestational age

Outcomes

We collected information from mother and infants using interviews, chart review, and clinical evaluations. Mothers were interviewed using a standardized questionnaire to obtain sociodemographic characteristics and medical history, including history of childbirth and the relevant perinatal period. We collected the infant information at birth and after one year of age. For birth information, we reviewed the prenatal monitoring program card and Child Health Record during inpatient care to obtain information on gestational age and anthropometric measurements of the child

at birth. We performed a comprehensive assessment after one year of age, collecting growth parameters and evaluating development, focusing on neurodevelopmental, auditory and ophthalmological outcomes. Collection of this information was performed blinded to respect of serological status of mothers and infants. Data collection is described in further detail below.

Growth parameters

The growth measures recorded were weight, length, and head circumference at two time points: 1) at birth (collected from the Child Health Record) and 2) at the time of the study visit. These were analyzed using reference values (Z-score) from INTERGROWTH-21²³ and WHO²⁴.

Neurodevelopment

We evaluated neurodevelopment by using the Hammersmith Infant Neurological Examination (HINE)²⁵ and Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 3rd ed. (Bayley III)²⁶. HINE is a standardized evaluation for children between 2-24 months of age and useful for identifying severity of neurological alterations and general prognosis. It includes 78 items that evaluate cranial nerve functions, posture, quality and quantity of movements, tone, and nerve reflexes, with a score from 0 to 3. The scores are summed, with any sum score above 74 considered adequate neurological development for children older than 18 months of age and above 73 for children between 12 and 18 months of age.

The Bayley III scales is a neurodevelopmental tool validated in Brazil for children between 16 days and 42 months of age. Its include five domains: Cognitive, Language, Motor, Socio-emotional and Adaptive Behavior, Children can be classified as severe neurodevelopment delay (composite score ≤ 70 [$<2SD$]), mild delay (≤ 85 [$<1SD$]) or normal (>85)^{17,26}.

There is also a screening version of the Bayley III tool that focuses on the Cognitive, Language, and Motor domains, utilizing the same techniques and activities. The final outcome is adjusted for the

child's age and categorized into 3 categories: risk, emergent, and competent. In the present study, children who presented some risk or emergent scale during screening were assessed with the full version of Bayley III scales. The scales with competent result in the triage were compared with the scales with a result of average or higher than the average.

Audiometric and ophthalmologic evaluations

We performed auditory evaluation with the Simonek hearing kit, used for screening in newborns or infants up to 48 months of age. It includes eight toys and musical objects with different frequency levels from 38.2 to 95.1 dB NA. The kit also evaluates reflexes, attention, location, orientation in front of different auditory stimuli, and Otoacoustic Emissions (OAE), used for the detection of auditory changes of cochlear origin.

The ophthalmologic evaluation included an appropriately focused physical exam and indirect ophthalmoscopy focusing on the retina. Indirect ophthalmoscopy is a useful technique for evaluation of characteristic alterations of the CZS ²⁷.

Statistical analysis

Data analysis was performed using the statistical package SPSS v21. Categorical data were described using frequency and percentages. Quantitative data were characterized using median, quartiles, and interquartile range. Participants were grouped by seroconversion status during pregnancy. Developmental and clinical changes between these two groups were compared using the Mann-Whitney U test for continuous variables and Fisher's exact test for categorical variables. Association between ZIKV exposures during the pregnancy and clinical and neurodevelopmental impairment were verified by obtaining the Relative Risk and 95% of confidence interval.

Ethical aspects

This study was approved by the ethics committee of the Hospital Geral Roberto Santos - Bahia under the number 1.866.918. All participants and caregivers provide signed consent for interviews, blood collection, and clinical evaluations.

RESULTS

From January 2015 to May 2016 a total of 66 pregnant women were identified within the cohort. Of these, 15 were not included because residence change to a household outside the study site and 3 were excluded due to participation refusal. Among the 48 women who consented to participate, 1 woman reported two pregnancies, one ended in stillbirth due to extreme prematurity at 26 weeks and the other ended in a live birth; the other 47 women each had one pregnancy. In summary, there were 49 reported pregnancies, including 46 live births, 2 abortions and 1 stillbirth (Figure 1).

Demographic, socioeconomic, and history of pregnancy and health are described in Table 1. Briefly, among the 46 women with live births, the median age was 25.0 years old, 63.0% self-identified as black ethnicity and 67.4% completed at least elementary school. Approximately, one third reported this being their first pregnancy and 15% had previously had an abortion. Previous medical history included hypertension, arthrosis, and previous sexually transmitted infection that had been treated (Table 1).

During pregnancy, the majority of women (93.5%) reported having prenatal care, but only 58.7% had greater than 6 prenatal care visits. Nutritional supplement used included ferrous sulfate (82%), folic acid (69.6), and other vitamins. Symptoms related to ZIKV infection were fever (21.7%), headache (13.0%), rash (8.7%), and muscle and joint pain (2.2%). Serological BOB results indicated that 84.8%

of the women had ZIKV infection at some point of the study period, 28.2% seroconverted during pregnancy, 54.3% before pregnancy, and 2.2% after pregnancy (Table 1) (Figure 2).

We did not identify severe alterations during anthropometry and neurological evaluations (Figure 3) (Table S1). 16 children (34.8%) were classified as at risk or emergent result in the evaluation of Bayley screening which led to follow-up evaluation with the complete Bayley III. Follow-up evaluation of these children with the full Bayley III scale, showed abnormal scores above 85 (<1 SD) of 6 children in the cognitive domain (13%), 8 in language (17%), and 2 in motor (4%). Analysis of these children showed that having a mother with ZIKV seroconversion during pregnancy increased risk of abnormal Bayley-III score above 85 in cognitive domain by 5.1 (1.1 – 24.4) times compared to children born to mothers who did not seroconvert during pregnancy. There was no statistically significant increased risk with respect to language, motor development (Table 2.), socio-emotional and adaptive domains (Table S2).

Ophthalmological evaluations were completed in 34 children. Abnormal findings included one (2.9%) with unilateral cataract, one (2.9%) with ptosis, and one (2.9%) with synechiae. 21 children were evaluated using acoustic emission, but none presented with any abnormalities. In the auditory behavioral evaluation, 7 (15.9%) showed behavioral problems related to orientation, localization, and attention in response to auditory stimulus. Auditory behavioral assessment also showed that children born to women with ZIKV seroconversion during pregnancy have a risk 6.0 (95% CI 1.3 - 26.9) of presenting with abnormal auditory behavior than those born to women without seroconversion (Table 2). We evaluated anthropometry and neurological characteristics of children born from mothers with evidence of symptomatic and asymptomatic infection during pregnancy and did not identify any differences (Table S1).

DISCUSSION

There is limited data assessing long term neurodevelopmental outcomes of children exposed to ZIKV in utero. This population based study did not identify severe CZS manifestations such as microcephaly. However our findings suggest that symptomatic and asymptomatic ZIKV infection during pregnancy is associated with frequent and mild neurodevelopmental abnormalities in children of approximately two years of age. Children of mothers exposed to ZIKV during pregnancy had five times greater risk of cognitive delay than children of non-exposed mothers, as well as a six times greater risk of abnormal auditory behavior.

Furthermore, we found that 31% of the woman exposed to ZIKV infection during pregnancy had children with neurodevelopmental alterations in comparison to the 19% of unexposed woman. Our findings are similar to those suggested by other studies on this topic. A previous study in the U.S. territories followed 1,450 children exposed to ZIKV and found that 9% had neurodevelopmental abnormalities possibly associated with CZS¹⁰, including microcephaly. Another study in Rio de Janeiro Brazil, evaluated 94 non-microcephalic infants with 12-18 months of age exposed to ZIKV in utero and identified 26% neurodevelopmental delay.

Low cognitive score was the most frequent abnormality in our study, 31% of exposed children had a mild delay score compared with 6% on unexposed children. None of the children in this study had severe delay. The Rio de Janeiro cohort found that 11% of children without microcephaly had mild/severe cognitive delay, with more than half of them having severe delay¹⁷. Our cognitive evaluation findings showed that the proportion of low neurodevelopmental was not only higher when we compared with unexposed children, but also higher than those reported in Rio cohort.

Language and motor development evaluations identified 8% of mild delay between exposed children but had not differences with the non-exposed children used as reference group. The Rio de Janeiro cohort, found higher proportion of language (27%) and motor (19%) delays ¹⁷. Also, a recent cohort study on the motor development of children exposed in utero to the ZIKV found that children without microcephaly had moved less optimally when compared to controls during the first 3 to 5 months of life, and the neurodevelopment of these children after 12 months show that 18% had some problem in the neurodevelopment that included cognition, language, motor, neurologic or behavioral deficits ²⁸.

It is possible that other types of changes may begin to appear in children exposed to ZIKV in utero. Congenital microcephaly is only a severe expression of CZS but there are more alterations such delay in neurodevelopment. Other neurotropic virus-related diseases have also been shown to be associated with long-term sequelae. West Nile Virus (WNV), for instance, has long been associated with encephalitis, meningitis ²⁹, retinopathy ³⁰ or possible neurodevelopmental disorders ³¹, while cytomegalovirus (CMV), rubella, toxoplasmosis and herpes infections has been associated with cognitive deficits, language development, and visual changes ^{7,15,16}. Also, these infections are related with hearing loss detected even after birth and neonatal period and sometimes the hearing loss it is progressive and fluctuating ^{7,32}. Although our study did not find hearing loss we reported behavior auditory problems in 38% of children infected in utero, this were related to orientation, localization and attention of auditory stimuli. Care should be taken with the development of children exposed to ZIKV during pregnancy, with long-term monitoring of neurologic alterations.

We acknowledge that our study has limitations. First, the sample size in this population study is small, limiting the study's statistical power. Second, there was difficulty in completing ophthalmological

and auditory evaluations, despite multiple attempts, thus biasing the results and possibly affecting the rate of defects that could have been identified. However participants were systematically characterized, through blinded assessment of neurodevelopment outcomes. Cross-reactivity between ZIKV and DENV is of concern in serological studies, specially, considering that >90% of the population (≥ 20 years old) in this community had antibodies against DENV before the Zika epidemic¹⁹. However, 96% of samples collected prior to the epidemic were negative to ZIKV suggesting lack of cross-reaction between viruses. The high ZIKV attack rate in this study (>80%), similar to previous results from the same area¹⁹, and the permanence of high antibody levels after seroconversion, across subsequent time points, suggest that the majority of seroconversions over this period can be attributed to ZIKV infection. Additionally, while molecular confirmation is ideal in the clinical setting, it cannot be used to characterize the ZIKV exposure in populations, since the large proportion of infections are asymptomatic. Thus, relying on detected virologically confirmed infections to identify ZIKV infections during pregnancy could lead to under-estimation of infection in pregnant women and the incidence of sequelae in their children. Our study represented an opportunity to understand the passage of ZIKV in a slum community with more than 2000 residents.

In summary, we documented a high incidence of mild neurodevelopmental alterations in an urban slum of Salvador, Brazil, during the 2015 epidemic. More long term population-based studies are needed to understand the true magnitude of ZIKV infection and its clinical sequelae. Those findings may be generalizable to other countries in the Americas, Asia, Oceania and Africa where high ZIKV transmission was reported^{33,34}. Neurodevelopmental changes have greater chance of being remedied with earlier referral to intervention. Healthcare providers should be alert to these potential clinical manifestations that are only now being described.

Acknowledgement

The authors would like to thank the support of the members of the Pau da Lima community in Salvador, Brazil. We would also like to thank team members from Collective Health institute Oswaldo Cruz Foundation, Yale University and University of California, Berkeley. The study was supported by grants from the National Institutes of Health (NIAID R01 AI052473R25, U01AI088752 FIC R01 TW009504, R25 TW009338, R01 TW009504, F31 AI114245, R01 AI121207), Wellcome Trust (102330/Z/13/Z), and Coordination for the improvement of higher education (CAPES) from Brazil.

Author Bios

Dr. Juan Aguilar is a recent Collective Health Institute of Federal University of Baha (ISC – UFBA) master Graduate, where he completed her dissertation work on the ZIKV virus project at ISC and FIOcruz in the Federico Costa PhD research group. He is currently a PhD student at the Collective Health Institute of Federal University of Bahia (ISC – UFBA) focusing on neurodevelopmental and clinical follow up of infant born during the ZIKV outbreak.

References

1. Reid S, Rimmer K, Thakur K. Zika Virus and Neurologic Disease. *Neurol Clin* 2018;36:767-87.
2. Boeuf P, Drummer HE, Richards JS, Scoullar MJL, Beeson JG. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact. *BMC Medicine* 2016;14:112.
3. Munoz LS, Barreras P, Pardo CA. Zika Virus-Associated Neurological Disease in the Adult: Guillain-Barre Syndrome, Encephalitis, and Myelitis. *Semin Reprod Med* 2016;34:273-9.
4. dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, et al. Zika Virus and the Guillain-Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *New England Journal of Medicine* 2016;375:1598-601.
5. Panchaud A, Stojanov M, Ammerdorffer A, Vouga M, Baud D. Emerging Role of Zika Virus in Adverse Fetal and Neonatal Outcomes. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:659-94.
6. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, et al. Congenital Zika Syndrome: Characterizing the Pattern of Anomalies for Pediatric Healthcare Providers. *JAMA pediatrics* 2017;171:288-95.
7. Leal MC, Muniz LF, Ferreira TS, et al. Hearing Loss in Infants with Microcephaly and Evidence of Congenital Zika Virus Infection - Brazil, November 2015-May 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:917-9.
8. van der Linden H, Jr., Carvalho MD, van der Linden V, et al. Epilepsy Profile in Infants with Congenital Zika Virus Infection. *N Engl J Med* 2018;379:891-2.
9. Leal MC, van der Linden V, Bezerra TP, et al. Characteristics of Dysphagia in Infants with Microcephaly Caused by Congenital Zika Virus Infection, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis* 2017;23.
10. Rice ME, Galang RR, Roth NM, et al. Vital Signs: Zika-Associated Birth Defects and Neurodevelopmental Abnormalities Possibly Associated with Congenital Zika Virus Infection - U.S. Territories and Freely Associated States, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018;67:858-67.
11. Oliveira-Filho J, Felzemburgh R, Costa F, et al. Seizures as a Complication of Congenital Zika Syndrome in Early Infancy. *Am J Trop Med Hyg* 2018;98:1860-2.
12. Adams Waldorf KM, Olson EM, Nelson BR, Little M-TE, Rajagopal L. The Aftermath of Zika: Need for Long-Term Monitoring of Exposed Children. *Trends in Microbiology* 2018;26:729-32.
13. Alvarado MG, Schwartz DA. Zika Virus Infection in Pregnancy, Microcephaly, and Maternal and Fetal Health: What We Think, What We Know, and What We Think We Know. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141:26-32.
14. Waldorf KMA, Nelson BR, Stencel-Baerenwald JE, et al. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. *Nat Med* 2018.
15. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “Silent” Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews* 2013;26:86-102.

16. Williamson W, Desmond MM, LaFevers N, Taber LH, Catlin FI, Weaver TG. Symptomatic congenital cytomegalovirus: Disorders of language, learning, and hearing. *American Journal of Diseases of Children* 1982;136:902-5.
17. Lopes Moreira ME, Nielsen-Saines K, Brasil P, et al. Neurodevelopment in Infants Exposed to Zika Virus In Utero. *New England Journal of Medicine* 2018;379:2377-9.
18. Netto EM, Moreira-Soto A, Pedrosa C, et al. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. *MBio* 2017;8.
19. Rodriguez-Barraquer I. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science*. In press.
20. Hagan JE, Moraga P, Costa F, et al. Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016;10:e0004275.
21. Felzemburgh RD, Ribeiro GS, Costa F, et al. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the *Leptospira* agent. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e2927.
22. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:8384-9.
23. 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;384:857-68.
24. de Onis M, Garza C, Victora CG, Onyango AW, Frongillo EA, Martines J. The WHO Multicentre Growth Reference Study: planning, study design, and methodology. *Food Nutr Bull* 2004;25:S15-26.
25. Haataja L, Mercuri E, Regev R, et al. Optimality score for the neurologic examination of the infant at 12 and 18 months of age. *J Pediatr* 1999;135:153-61.
26. Bayley N. *Bayley Scales of Infant and Toddler Development*. San Antonio, TX: Harcourt Assessment; 2006.
27. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol* 2016.
28. Einspieler C, Utsch F, Brasil P, et al. Association of infants exposed to prenatal zika virus infection with their clinical, neurologic, and developmental status evaluated via the general movement assessment tool. *JAMA Network Open* 2019;2:e187235.
29. Weatherhead JE, Miller VE, Garcia MN, et al. Long-term neurological outcomes in West Nile virus-infected patients: an observational study. *Am J Trop Med Hyg* 2015;92:1006-12.
30. Hasbun R, Garcia MN, Kellaway J, et al. West Nile Virus Retinopathy and Associations with Long Term Neurological and Neurocognitive Sequelae. *PLoS One* 2016;11:e0148898.

31. Pridjian G, Sirois PA, McRae S, et al. Prospective Study of Pregnancy and Newborn Outcomes in Mothers with West Nile Illness during Pregnancy. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2016;106:716-23.
32. Cohen BE, Durstenfeld A, Roehm PC. Viral causes of hearing loss: a review for hearing health professionals. *Trends Hear* 2014;18.
33. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *New England Journal of Medicine* 2016;374:1552-63.
34. Gorshkov K, Shiryaev SA, Fertel S, et al. Zika Virus: Origins, Pathological Action, and Treatment Strategies. *Front Microbiol* 2018;9:3252.

Figure 1: Flowchart of children born to mothers, included in the Pau da Lima cohort, and pregnant during the epidemic of Zika virus in Salvador, Brazil, January 2015 to December 2016.

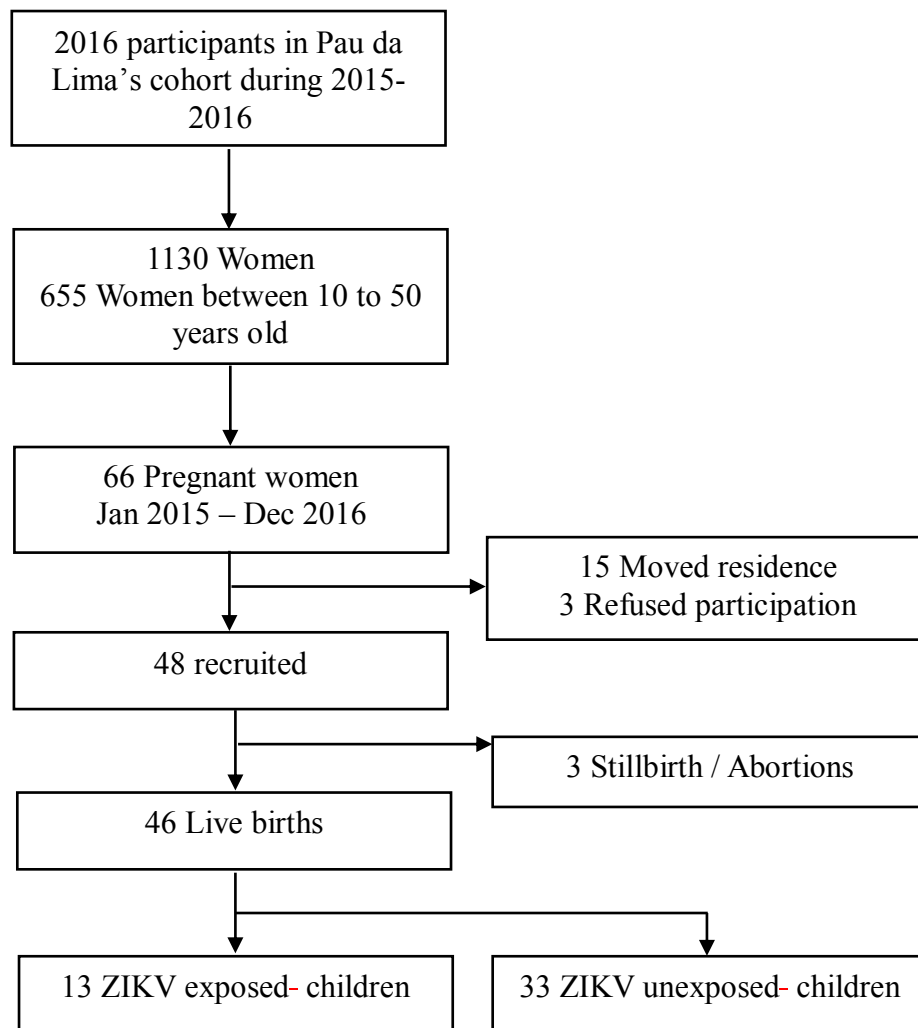


Table 1: Baseline demographic and clinical characteristics of mothers in the Pregnancy Cohort — Salvador, Brazil, January 2015 to December 2016

Characteristics	ZIKV exposed* (N=13)	ZIKV unexposed [†] (N=33)	p-value
Median mother age, years (IQR)	25 (21 - 31)	25 (20 - 30)	
Black ethnicity	7 (53.8%)	22 (66.7%)	0.63
None to middle school	5 (38.5%)	10 (30.3%)	0.84
Previous pregnancies			
0	3 (23.1%)	10 (30.3%)	0.79
1 – 3	6 (46.2%)	16 (48.5%)	0.87
≥ 4	4 (30.8%)	7 (21.2%)	
Medical history			
Arterial hypertension	0 (0.0%)	3 (9.1%)	0.72
Arthrosis	0 (0.0%)	1 (3.0%)	0.99
Sexually transmitted infection history	1 (7.7%)	1 (3.0%)	0.99
Health problems during the pregnancy			
Urinary infection	5 (38.5%)	9 (27.3%)	0.68
Vaginal fungus infection	2 (15.4%)	4 (12.1%)	0.99
TORCH infections	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NA
HIV infection	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NA
Symptoms during the pregnancy			
Fever	4 (30.8%)	6 (18.2%)	0.57
Rash	1 (7.7%)	3 (9.1%)	0.99
Conjunctival injection	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1
Myalgia and arthralgia	1 (7.7%)	0 (0.0%)	0.99
Headache	3 (23.1%)	3 (9.1%)	0.42

Median of prenatal care, (IQR)	4 (2 – 8)	6 (4 – 8)	0.28
Median of prenatal ultrasonography , (IQR)	3(2 – 4)	3(2 – 4)	0.82
Prenatal ultrasonography with malformations	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NA
Nutritional supplement use			
Ferrous sulphate	10 (76.9%)	28 (84.8%)	0.8
Folic acid	8 (61.5%)	24 (72.7%)	0.48
Others vitamins	2 (15.4%)	6 (18.2%)	0.99
Caesarean delivery	9 (69.2%)	24 (72.7%)	0.99
Birth characteristics			
Gestational age at birth, weeks (IQR)	40 (39-40)	40 (39-40)	0.82
Preterm birth	1 (7.7%)	0 (0.0%)	0.26
Full term	11 (84.6%)	33 (100.0%)	
Postterm birth	1 (7.7%)	0 (0.0%)	0.26
Mothers ZIKV BOB NS1 result			
Positive	13 (100.0%)	26 (78.8%)	NA
During pregnancy	13 (100.0%)	0 (0.0%)	NA
Before pregnancy	0 (0.0%)	25 (75.8%)	NA
After pregnancy	0 (0.0%)	1 (3.0%)	NA
Negative	0 (0.0%)	7 (21.2%)	NA

* There were considerate ZIKV exposed mothers with seroconversion to ZIKV during pregnancy ¶ and unexposed: mothers who had not been infected during pregnancy (without seroconversion or seroconversion before or after pregnancy)

TORCH, Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus (CMV), Herpes infections and Others.

NA, not applicable

NS1 BOB, Non-structural protein 1 Blocked of binding

Figure 2: Timeline of follow-up standardized by conception day and ZIKV serological status from mothers. The continuous blue line represents estimated conception, calculated as the difference between date of birth and the gestational age at birth. The dashed blue line represents day of birth and the grey area between them represent the pregnancy period. Black and red dots are BOB negative and positive samples, respectively. A) Mothers with evidence of provable ZIKV infection during the pregnancy period, B) Mothers with evidence of ZIKV infection before the pregnancy period, C) Mothers with evidence of ZIKV infection after the pregnancy period and D) Mothers without evidence of ZIKV infection during the follow-up

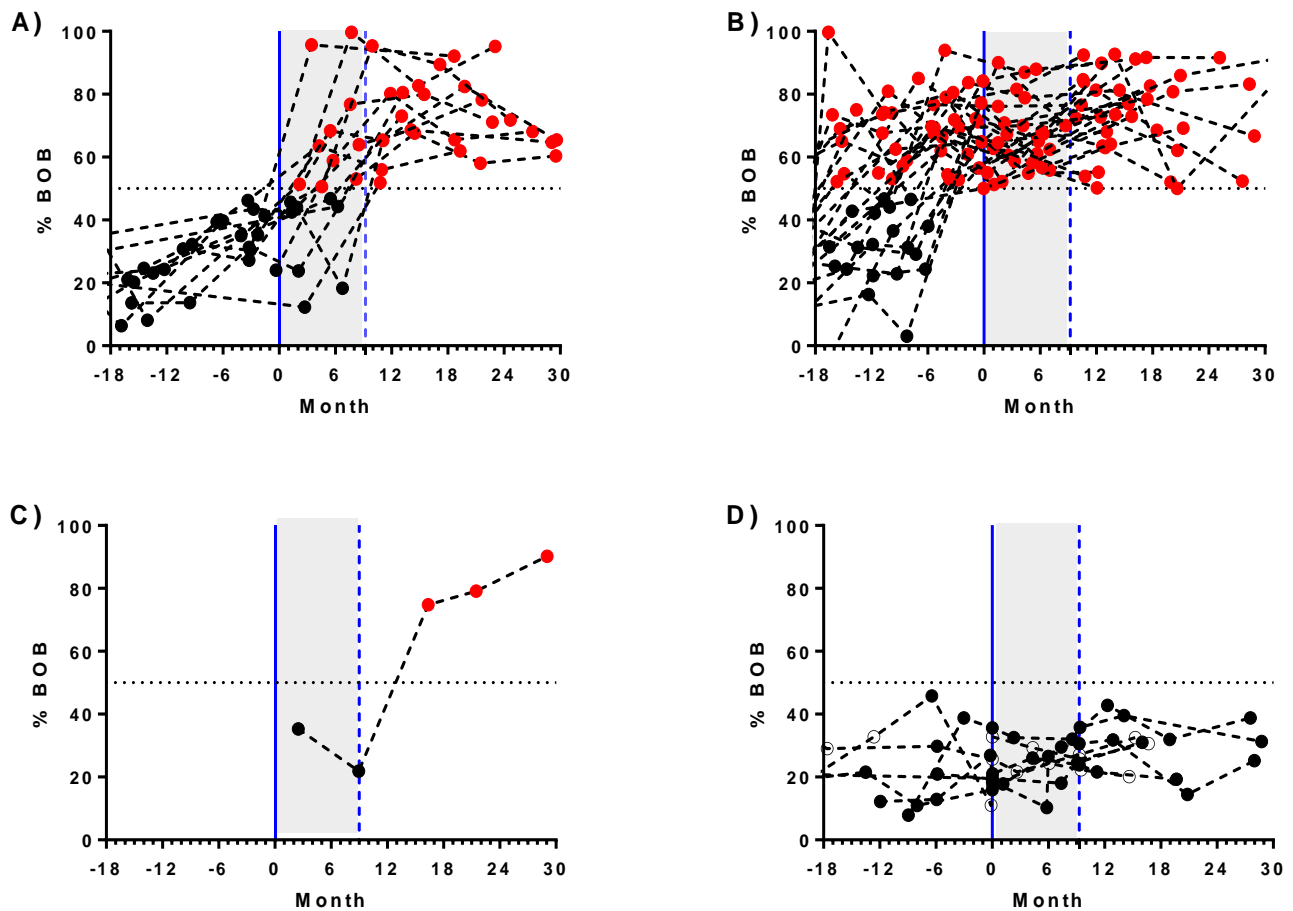


Table 2: Neurological examination, ophthalmological, auditory and neurodevelopmental evaluation outcomes.

Outcomes	No.	ZIKV exposed (N=13)	No.	ZIKV unexposed (N=33)	RR (IC 95%) or P- value
Neurological examination					
Median HINE total score (IQR)	13	75 (74-77)	33	76.0 (74-78)	0.77*
Total score >74	13	13 (100%)	33	13 ((100%)	NA
Ophthalmologic alteration					
Cataract	9	1 (11.1%)	25	2 (8.0%)	1.38 (0.14 – 13.53)
Ptosis	9	1 (11.1%)	25	0 (0.0%)	
Synechia	9	0 (0.0%)	25	1 (4.0%)	
Auditory evaluation					
Abnormal auditory behavior test	13	5 (38.5%)	31	2 (6.5%)	5.96 (1.32 - 26.89)
Abnormal OAE	6	0 (0.0%)	15	0 (0.0%)	NA
Neurodevelopmental function					
Bayley-III screening evaluation					
Risk	13	1 (7.7%)	33	1 (3.0%)	2.56 (0.18 – 36.62)
Emergent	13	4 (30.8%)	33	10 (30.3%)	1.07 (0.41 – 2.76)
Competent	13	8 (61.5%)	33	22 (66.7%)	1
Bayley-III complete evaluation <-1SD					
Cognitive score <-1SD	13	4 (30.8%)	33	2 (6.1%)	5.07 (1.05 – 24.44)
Language score <-1SD	13	1 (7.7%)	33	4 (12.1%)	0.63 (0.07 – 5.16)
Motor score <-1SD	13	1 (7.7%)	33	1 (3.0%)	2.54 (0.17 – 37.63)

Infants classified as Risk and Emergent in Bayley screening were reevaluated using a complete protocol of Bayley. Infants classified as Competent in Bayley screening were considerate as having >-1SD in the scores Cognitive, Language and Motor of the complete Bayley protocol.

* Mann Whitney test p value

Bayley-III, Bayley Scales of Infant and Toddler Development, Third edition.

HINE, Hammersmith infant neurological examination

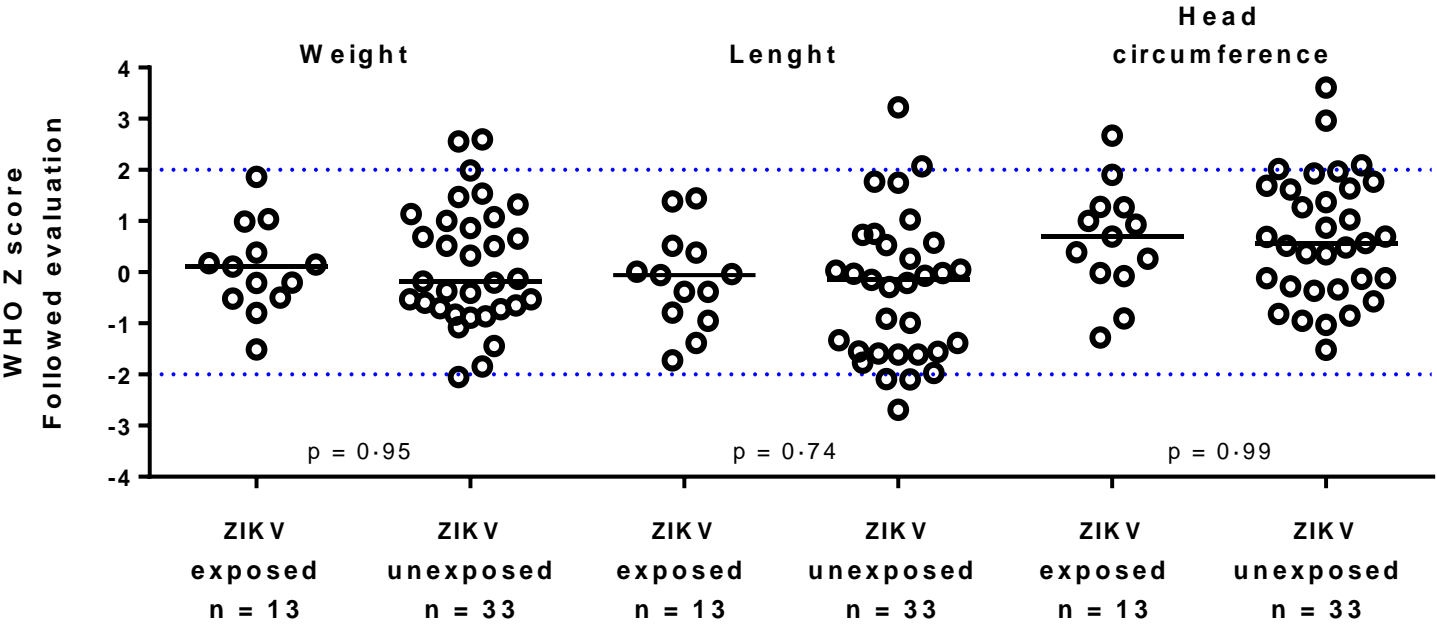
OEA, otoacoustic emissions test

NA, not applicable

SD, standard deviation

IQR, Interquartile ratio

Figure 3: Anthropometric and neurodevelopment outcomes in children with and without evidence of ZIKV infection during pregnancy in their mothers. A) Anthropometric measures at birth using Intergrowth parameters and B) Anthropometric measures during the follow up using WHO parameters



There were considerate ZIKV exposed, children born to mothers with seroconversion to ZIKV during pregnancy and ZIKV unexposed, children born to mothers who had not been infected during pregnancy (without seroconversion or seroconversion before or after pregnancy)

Supplemental table 1: Anthropometric evaluation outcomes in children with and without evidence of ZIKV infection during pregnancy in their mothers.

Characteristics	Exposed (N=13)	Unexposed (N=33)	P value
Birth evaluation			
Median score Z¹ (IQR)			
Weight	-0.7 (-1.8 - 0.2)	0.6 (-0.4 - 1.0)	0.12
Length	-0.3 (-0.9 - 0.2)	-0.1 (-1.2 - 0.8)	0.48
Head circumference	0.2 (0.1 - 0.6)	0.7 (-0.2 - 1.2)	0.35
Follow-up evaluation			
Median Children age, months (IQR)	18 (14-22)	11 (8 – 20)	0.19
Median score Z² (IQR)			
Weight	0.1 (-0.5 - 0.4)	-0.2 (-0.7 - 1.0)	0.95
Length	-0.1 (-0.8 - 0.4)	-0.2 (-1.6 - 0.6)	0.74
Head circumference	0.7 (-0.02 - 1.3)	0.6 (-0.3 - 1.6)	0.99

¹Intergrowth parameters ²³

²Who parameters ²⁴

IQR: Interquartile ratio

Supplemental table 2: Neurodevelopmental of 16 children without optimal neurodevelopmental screening result.

Bayley scales	Exposed (N=5)	Unexposed (N=11)	p value
Median percentile scale score (IQR)			
Cognitive	9.0 (9 – 9)	37 (25 – 63)	0.019
Language	18.0 (18 – 27)	27 (13 – 42)	0.913
Motor	58.0 (27 – 75)	50 (42 – 68)	0.743
Social – Emotional scale	25.0 (16 – 63)	9 (5 – 63)	0.221
Adaptive behavior	42.0 (30 – 47)	39 (4 – 55)	0.743

IQR: Interquartile ratio

Supplemental Table 3 Cognitive development and auditory behavior of 13 children from ZIKV exposure women during the pregnancy according symptoms during the pregnancy.

	Symptomatic¹ n = 4	Asymptomatic n = 9	p value
Median HINE total score (IQR)	74(74 – 75)	76(75 – 78)	0.11
Birth evaluation			
Median score Z² (IQR)			
Weight	-0.86 (1.08 – 0.71)	-0.3 (-0.9 – 0.1)	0.71
Length	-1.33 (0.6 – 0.7)	-1.5 (-1.8 – 0.1)	0.71
Head circumference	-0.04 (1.0 – 0.6)	0.2 (0.1 – 0.4)	0.60
Follow-up evaluation			
Median score Z³ (IQR)			
Weight	-1.0 (0.1 – 0.3)	0.2 (-0.2 – 1.0)	0.26
Length	-0.4 (0.2 – 0.8)	-0.1 (-0.9 – 0.5)	0.82
Head circumference	-0.3 (0.8 – 0.4)	1.0 (0.0 – 1.3)	0.41
Neurodevelopmental function			
Cognitive domain < 1SD	1 (25.0)	3 (33.3)	0.99
Language domain < 1SD	1 (25.0)	(0.0)	0.61
Motor domain < 1SD	1 (25.0)	(0.0)	0.61
Auditory behavior test abnormal	1 (25.0)	4 (44.4)	0.97

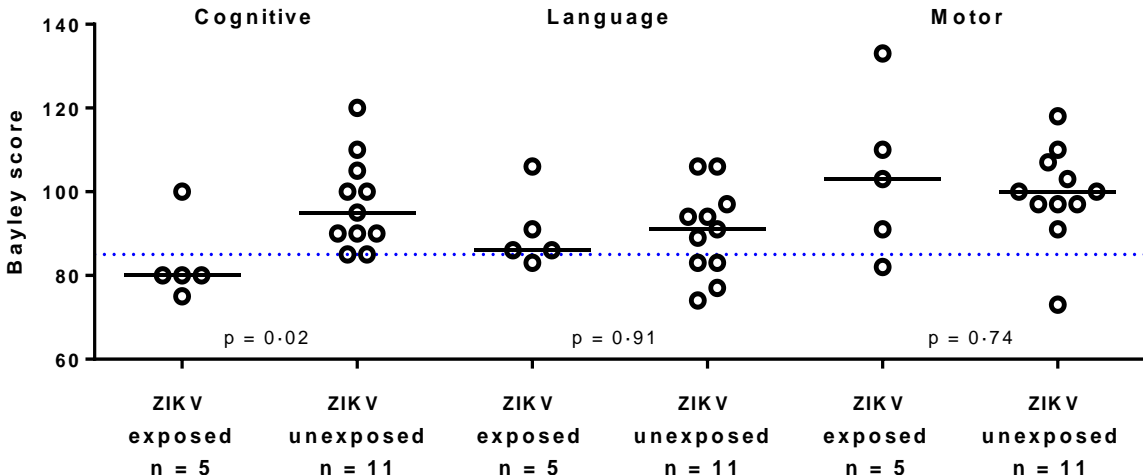
¹**Symptomatic** = fever, rash, myalgia or arthralgia.

²Intergrowth parameters ²³

³Who parameters ²⁴

IQR, Interquartile ratio.

Supplemental figure 1. Bayley III score of 16 children without optimal neurodevelopmental screening result.



7. CONCLUSÕES

O propósito do presente estudo foi determinar as alterações no longo prazo e sua magnitude nas crianças expostas intrauterinamente ao ZIKV. Determinou-se que existe maior incidência de alterações cognitivas e alterações comportamentais relacionadas a atenção, localização e orientação na avaliação auditiva nas crianças que nasceram de mães expostas ao ZIKV durante a gravidez. Embora outras avaliações não mostraram associações significativas, as maiores proporções de desfechos negativos relacionados ao desenvolvimento de linguagem e da motricidade foram nas crianças de mães expostas ao ZIKV durante a gravidez. Adicionalmente foi realizada a avaliação do comportamento sócio-emocional e o comportamento adaptativo, nas 16 crianças que não passaram a triagem do neurodesenvolvimento, não entanto, os resultados não apresentaram diferenças significativas entre as crianças expostas e não expostas ao ZIKV durante a gravidez.

As alterações oftalmológicas foram variadas, mas nenhuma relacionada com o segmento posterior do olho, típica localização lesões pela infecção congênita do ZIKV. Não obstante, ptoses e a catarata congênita, alterações descritas no presente estudo, já foram relatadas na literatura científica em crianças com SCZ, mas estas são poucos frequentes. Por último, na avaliação clínica, não se encontrou alterações nem diferença entre os grupos expostos e não expostos na avaliação antropométrica, no exame neurológico e de otoemissão acústica.

Durante o surto da Zika no Brasil houve uma alta soroprevalência na cidade de Salvador. No presente estudo e durante entre 2014 a 2016, das 46 mulheres grávidas e com filhos vivos, 39 (84,8%) foram expostas ao ZIKV, delas 13 (28,2%) apresentaram soroconversão durante a gravidez. A incidência da infecção pelo ZIKV foi alta e similar na população de outras áreas endêmicas.

Quando foram comparadas as características sociodemográficas, os antecedentes médicos, obstétricos e as características do parto não houve diferença entre as mulheres que soroconverteram durante a gravidez e as que não, considerando a idade gestacional, gestações prévias, ser primigesta ou apresentar abortos prévios. Da mesma forma estes antecedentes não mostraram relação com as alterações apresentadas nas crianças.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossa coorte está entre os poucos estudos que conseguiram realizar o seguimento das crianças expostas ao ZIKV intrauterinamente. Adicionalmente, este estudo é provavelmente o único a acompanhar crianças nascidas de mulheres expostas a infecção sintomática e assintomática por ZIKV. Enquanto limitados pelo tamanho amostral, estes achados são relevantes no contexto do inesperado surto do ZIKV e suas sequelas nas crianças expostas a infecção intrauterina. A microcefalia associada ao SCZ chamou a atenção internacionalmente pela gravidade dos sintomas REF. Entretanto, estudos caracterizando o espectro completo da infecção congênita do ZIKV tem sugerido que o impacto das manifestações leves associadas a SCZ poderiam ter um impacto na saúde, para a população, igual ou maior que o da microcefalia.

Estudos de coorte de base populacional como o nosso são úteis para avaliar o espectro da infecção congênita do ZIKV. Nosso trabalho aproveitou um estudo prospectivo em andamento sobre infecção por *Leptospira* em Pau da Lima. Este estudo de coorte estava em andamento desde 2003, muito antes da epidemia de ZIKV, incluindo 2000 participantes que participaram de inquéritos sorológicos semestrais. Este desenho nós permitiu identificar episódios de provável soroconversão por ZIKV durante a gravidez. Neste trabalho avaliamos os desfechos de neurodesenvolvimento nas crianças de mães expostas ao Zika vírus.

Os desfechos negativos apresentados neste trabalho, cognitivos e comportamentais, são consistentes com resultados de estudos com modelos *in vitro*, em modelo animal, e em estudos epidemiológicos recentes em mulheres com infecção sintomática por ZIKV durante a gravidez. Características mais brandas do neurodesenvolvimento são difíceis de diagnosticar durante os primeiros dias de vida, mas com o seguimento a longo prazo podem ser mais perceptíveis. Sem embargo, enquanto mais precoce seja o diagnóstico mais oportuna pode ser a intervenção para limitar ou minimizar sequelas relacionadas à infecção congênita do ZIKV.

Uma fortaleza de nosso trabalho foram as avaliações cegas com o emprego de instrumentos recomendados para a avaliação do neurodesenvolvimento como é o Bayley III, que permitiu mostrar diferenças leves e moderadas entre os grupos expostos e não expostos. Também o emprego do BoB NS1 uma técnica de diagnóstico laboratorial nova para determinar a exposição ao ZIKV e que é útil para avaliações a longo prazo, em estudos de soroprevalência e que diminui os erros por reação cruzada com o vírus de Dengue e outros arbovirus.

Por último, é necessário que o sistema de saúde esteja adaptado e o pessoal de saúde capacitado para realizar avaliações com maior cuidado nas crianças que nasceram durante o surto de ZIKV. Estas avaliações devem ter uma maior ênfase na avaliação neurológica e do neurodesenvolvimento devido a que o ZIKV é um vírus com neurotropismo, e com a possibilidade de replicação ainda após o nascimento. Na medida que sejam detectadas e diagnosticadas as alterações podem ser geradas estratégias para reabilitação e estimulação precoce, atividades necessárias para diminuir os efeitos das alterações na infância que é o período importante para o neurodesenvolvimento.

BIBLIOGRAFIA

Uncategorized References

1. Iloos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* 2014;44(7):302-7.
2. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *New England Journal of Medicine.* 2016;374(16):1552-63.
3. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):487-524.
4. Hens, Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet.* 2017;390(10107):2099-109.
5. Wikan N, Smith DR. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(7):e119-26.
6. Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine.* 2016;17(6):671-9.
7. Grischott F, Puhan M, Hatz C, Schlagenhaut P. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel Med Infect Dis.* 2016;14(4):313-30.
8. Munoz LS, Barreras P, Pardo CA. Zika Virus-Associated Neurological Disease in the Adult: Guillain-Barre Syndrome, Encephalitis, and Myelitis. *Semin Reprod Med.* 2016;34(5):273-9.
9. Panchaud A, Stojanov M, Ammerdorffer A, Vouga M, Baud D. Emerging Role of Zika Virus in Adverse Fetal and Neonatal Outcomes. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):659-94.
10. Marinho F, Araújo VEMd, Porto DL, Ferreira HL, Coelho MRS, Lecca RCR, et al. Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), 2000-2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2016;25:701-12.
11. Diniz D. Zika virus and women. *Cadernos de saude publica.* 2016;32(5):e00046316.
12. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res.* 2016;130:69-80.
13. Frost-Pineda K, Appleton S, Fisher M, Fox K, Gaworski CL. Does dual use jeopardize the potential role of smokeless tobacco in harm reduction? *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco.* 2010;12(11):1055-67.
14. van der Linden V, Filho ELR, Lins OG, van der Linden A, Aragão MdFVV, Brainer-Lima AM, et al. Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. *The BMJ.* 2016;354:i3899.
15. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura CV, da Fonseca EB, et al. Congenital Zika Syndrome: Characterizing the Pattern of Anomalies for Pediatric Healthcare Providers. *JAMA pediatrics.* 2017;171(3):288-95.
16. 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 in Obstetrics & Gynecology.* 2016;47(1):6-7.
17. Terzian ACB, Zini N, Sacchetto L, Rocha RF, Parra MCP, Del Sarto JL, et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Sci Rep.* 2018;8(1):16034.
18. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(13).
19. Kolker E, Stewart E, Ozdemir V. Opportunities and challenges for the life sciences community. *Omics : a journal of integrative biology.* 2012;16(3):138-47.
20. Rodrigues LC. Microcephaly and Zika virus infection. *The Lancet.* 2016;387(10033):2070-2.

21. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):653-60.
22. van der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, Reusken CB, Mögling R, van Kampen JJA, et al. Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(10):1002-4.
23. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill*. 2014;19(14).
24. Aubry M, Richard V, Green J, Broult J, Musso D. Inactivation of Zika virus in plasma with amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion*. 2016;56(1):33-40.
25. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*. 2016;56(7):1684-8.
26. Motta IJF, Spencer BR, Cordeiro da Silva SG, Arruda MB, Dobbin JA, Gonzaga YBM, et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(11):1101-3.
27. Barry A, Pasco H, Babak A, Sarah L, Daniel C, Emma JA, et al. Detection of Zika Virus in Semen. *Emerging Infectious Disease journal*. 2016;22(5):940.
28. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lorameau V-M. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(2):359-61.
29. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(5):880-2.
30. Armstrong P, Hennessey M, Adams M, Cherry C, Chiu S, Harrist A, et al. Travel-Associated Zika Virus Disease Cases Among U.S. Residents--United States, January 2015-February 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(11):286-9.
31. Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(8):215-6.
32. Colt S, Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, Finkelstein JL, Rayco-Solon P, Weise Prinzo ZC, et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(4):e0005528.
33. Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet*. 2016;387(10023):1051.
34. 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 Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(6):e0004816.
35. Dick GW. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46(5):521-34.
36. Roze B, Najioullah F, Ferge JL, Apetse K, Brouste Y, Cesaire R, et al. Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barre syndrome on Martinique, January 2016. *Euro Surveill*. 2016;21(9):30154.
37. Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-Larson L, Stanek D, Blackmore C, et al. Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease - Florida, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(18):475-8.

38. Swaminathan S, Schlaberg R, Lewis J, Hanson KE, Couturier MR. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. *The New England journal of medicine*. 2016;375(19):1907-9.
39. Zanoluca C, de Melo VCA, Mosimann ALP, dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569-72.
40. Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet*. 2015;386(9990):243-4.
41. Faria NR, Azevedo R, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. 2016;352(6283):345-9.
42. Cardoso CW, Paploski IA, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MM, Campos GS, et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(12):2274-6.
43. Costa F, Sarno M, Khouri R, de Paula Freitas B, Siqueira I, Ribeiro GS, et al. Emergence of Congenital Zika Syndrome: Viewpoint From the Front Lines. *Annals of internal medicine*. 2016;164(10):689-91.
44. Netto EM, Moreira-Soto A, Pedroso C, Hoser C, Funk S, Kucharski AJ, et al. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. *MBio*. 2017;8(6).
45. Bueno FTC. Vigilância e resposta em saúde no plano regional: um estudo preliminar do caso da febre do Zika vírus. *Ciencia & saude coletiva*. 2017;22:2305-14.
46. Gyawali N, Bradbury RS, Taylor-Robinson AW. The global spread of Zika virus: is public and media concern justified in regions currently unaffected? *Infectious Diseases of Poverty*. 2016;5:37.
47. Boeuf P, Drummer HE, Richards JS, Scoullar MJL, Beeson JG. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact. *BMC Medicine*. 2016;14:112.
48. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(7):1185-92.
49. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;360(24):2536-43.
50. Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(4):e0004636.
51. Awadh A, Chughtai AA, Dyda A, Sheikh M, Heslop DJ, MacIntyre CR. Does Zika Virus Cause Microcephaly - Applying the Bradford Hill Viewpoints. *PLoS Curr*. 2017;9.
52. Waldorf KMA, Nelson BR, Stencel-Baerenwald JE, Studholme C, Kapur RP, Armistead B, et al. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. *Nat Med*. 2018.
53. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell host & microbe*. 2016;19(5):720-30.
54. do Rosario MS, de Jesus PA, Vasilakis N, Farias DS, Novaes MA, Rodrigues SG, et al. Guillain-Barre Syndrome After Zika Virus Infection in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(5):1157-60.
55. Acevedo N, Waggoner J, Rodriguez M, Rivera L, Landivar J, Pinsky B, et al. Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus in Cerebrospinal Fluid from Adults with Neurological Manifestations, Guayaquil, Ecuador. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:42.

56. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10027):1531-9.
57. dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, de Oliveira WK, et al. Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(16):1598-601.
58. Wheeler AC. Development of Infants With Congenital Zika Syndrome: What Do We Know and What Can We Expect? *Pediatrics*. 2018;141(Suppl 2):S154-S60.
59. Dain Gandelman Horovitz D, da Silva Pone MV, Moura Pone S, Dias Saad Salles TR, Bastos Boechat MC. Cranial bone collapse in microcephalic infants prenatally exposed to Zika virus infection. *Neurology*. 2016;87(1):118-9.
60. Moura da Silva AA, Ganz JS, Sousa PD, Doriqui MJ, Ribeiro MR, Branco MD, et al. Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(11):1953-6.
61. de Araujo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(12):1356-63.
62. Coelho AVC, Crovella S. Microcephaly Prevalence in Infants Born to Zika Virus-Infected Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(8):1714.
63. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(24):2321-34.
64. Hoen B, Schaub B, Funk AL, Ardillon V, Boullard M, Cabié A, et al. Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(11):985-94.
65. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, Sacramento GA, Ko AI, Maia M, et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol*. 2016.
66. Microcephaly Epidemic Research G. Microcephaly in Infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(6):1090-3.
67. Ventura CV, Maia M, Travassos SB, Martins TT, Patriota F, Nunes ME, et al. Risk Factors Associated With the Ophthalmoscopic Findings Identified in Infants With Presumed Zika Virus Congenital Infection. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134(8):912-8.
68. Kowalczyk B, Feluś J. Arthrogyrosis: an update on clinical aspects, etiology, and treatment strategies. *Archives of Medical Science : AMS*. 2016;12(1):10-24.
69. Leal MC, Muniz LF, Caldas Neto SD, van der Linden V, Ramos RC. Sensorineural hearing loss in a case of congenital Zika virus. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2016.
70. Leal MC, Muniz LF, Ferreira TS, Santos CM, Almeida LC, Van Der Linden V, et al. Hearing Loss in Infants with Microcephaly and Evidence of Congenital Zika Virus Infection - Brazil, November 2015-May 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(34):917-9.
71. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(3):59-62.
72. Julu B, Demi BR, Roosecelis BM, Sarah R-S, Yokabed E, Lindsey BCE, et al. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerging Infectious Disease journal*. 2017;23(3):405.

73. van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, Barkovich AJ, Junior HV, Filho EL, 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):1343-8.
74. von der Hagen M, Pivarcsi M, Liebe J, von Bernuth H, Didonato N, Hennermann JB, et al. Diagnostic approach to microcephaly in childhood: a two-center study and review of the literature. *Dev Med Child Neurol.* 2014;56(8):732-41.
75. Oliveira-Filho J, Felzemburgh R, Costa F, Nery N, Mattos A, Henriques DF, et al. Seizures as a Complication of Congenital Zika Syndrome in Early Infancy. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(6):1860-2.
76. Abdel-Salam GM, Halasz AA, Czeizel AE. Association of epilepsy with different groups of microcephaly. *Dev Med Child Neurol.* 2000;42(11):760-7.
77. Adams Waldorf KM, Nelson BR, Stencel-Baerenwald JE, Studholme C, Kapur RP, Armistead B, et al. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. *Nat Med.* 2018;24(3):368-74.
78. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The "Silent" Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews.* 2013;26(1):86-102.
79. Williamson W, Desmond MM, LaFevers N, Taber LH, Catlin FI, Weaver TG. Symptomatic congenital cytomegalovirus: Disorders of language, learning, and hearing. *American Journal of Diseases of Children.* 1982;136(10):902-5.
80. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(5):355-63.
81. Pridjian G, Sirois PA, McRae S, Hinckley AF, Rasmussen SA, Kissinger P, et al. Prospective Study of Pregnancy and Newborn Outcomes in Mothers with West Nile Illness during Pregnancy. Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology. 2016;106(8):716-23.
82. O'Leary DR, Kuhn S, Kniss KL, Hinckley AF, Rasmussen SA, Pape WJ, et al. Birth outcomes following West Nile Virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004. *Pediatrics.* 2006;117(3):e537-45.
83. Alves LV, Paredes CE, Silva GC, Mello JG, Alves JG. Neurodevelopment of 24 children born in Brazil with congenital Zika syndrome in 2015: a case series study. *BMJ Open.* 2018;8(7):e021304.
84. Rice ME, Galang RR, Roth NM, Ellington SR, Moore CA, Valencia-Prado M, et al. Vital Signs: Zika-Associated Birth Defects and Neurodevelopmental Abnormalities Possibly Associated with Congenital Zika Virus Infection - U.S. Territories and Freely Associated States, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018;67(31):858-67.
85. Lopes Moreira ME, Nielsen-Saines K, Brasil P, Kerin T, Damasceno L, Pone M, et al. Neurodevelopment in Infants Exposed to Zika Virus In Utero. *New England Journal of Medicine.* 2018;379(24):2377-9.
86. Saad T, PennaeCosta AA, de Goes FV, de Freitas M, de Almeida JV, de Santa Ignez LJ, et al. Neurological manifestations of congenital Zika virus infection. *Childs Nerv Syst.* 2018;34(1):73-8.
87. Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, Hummel KB, Johnson JA, Rose L, et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(21):543-6.
88. Landry ML, St George K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(1):60-7.
89. Einspieler C, Utsch F, Brasil P, et al. Association of infants exposed to prenatal zika virus infection with their clinical, neurologic, and developmental status evaluated via the general movement assessment tool. *JAMA Network Open.* 2019;2(1):e187235.

90. Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan LV, et al. Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *mBio*. 2018;9(2):e00095-18.
91. Granger D, Hilgart H, Misner L, Christensen J, Bistodeau S, Palm J, et al. Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2127-36.
92. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(31):8384-9.