



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

**DESCRIÇÃO DA SOROLOGIA IgM PARA ZIKA VÍRUS
EM PACIENTES COM EXPOSIÇÃO VERTICAL**

Nathalia Raposo Thompson

**RIO DE JANEIRO
ABRIL DE 2019**



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

**DESCRIÇÃO DA SOROLOGIA IgM PARA ZIKA VÍRUS
EM PACIENTES COM EXPOSIÇÃO VERTICAL**

Nathalia Raposo Thompson

Dissertação apresentada à Pós
Graduação em Saúde da Criança e
da Mulher, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre.

Orientador: Prof.º Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos
Coorientador: Prof.º Dr. Marcos Vinicius da Silva Pone

**RIO DE JANEIRO
ABRIL DE 2019**

CIP - Catalogação na Publicação

Thompson, Nathalia.

DESCRIÇÃO DA SOROLOGIA IgM PARA ZIKA VÍRUS EM PACIENTES
COM EXPOSIÇÃO VERTICAL / Nathalia Thompson. - Rio de Janeiro, 2019.
121 f.

Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde da Criança e da Mulher) -
Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2019.

Orientador: Zilton Farias Meira de Vasconcelos.

Co-orientador: Marcos Vinicius da Silva Pone.

Bibliografia: f. 53-68

1. zika vírus. 2. sorologia MAC-ELISA . 3. síndrome zika congênita . I.
Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, pelo tempo, paciência e atenção depreendida durante a confecção do trabalho. Aos amigos do mestrado e da DIPe que fizeram com que o caminho fosse mais alegre e divertido. Aos mestres Marcos e Sheila que plantaram a semente do estudo continuado em seus alunos, incentivando a todos que passaram pela DIPe a sempre buscar o aperfeiçoamento.

Agradeço aos meus pais pelo apoio e amor incondicional, por sempre caminharem ao meu lado e por serem meus maiores exemplos. Aos meus avós, fonte inesgotável de afeto, pelos ensinamentos de vida e por se fazerem presentes em cada momento importante da minha vida. Ao meu irmão e minha cunhada, que mesmo longe participaram de perto dessa jornada e que são uma inspiração para o aprimoramento acadêmico.

Ao meu marido, companheiro de vida, presente em todos os momentos, agradeço pela paciência, por passarmos juntos pelos bons e nem tão bons momentos e sempre com muito amor. À nossa filha Mariana, que desde sementinha já é muito amada e desejada e uma motivação para que eu siga em frente.

LISTA DE ABREVIATURAS

BERA - Brainstem Evoked Response Audiometry (Potencial Evocado Auditivo do Tronco Cerebral)

CDC – Center for Disease Control and Prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)

CIUR – Crescimento Intrauterino restrito

CMV – Citomegalovírus

DP – Desvio Padrão

DIPe – Unidade de Doenças Infecciosas em Pediatria

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimático)

FDA – Food and Drugs Administration (Administração de Comidas e Remédios)

IFF - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

IFN 1– Interferon 1

Ifnair – Receptor de Interferon

IG – Idade gestacional

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LACIFF – Laboratório de Alta Complexidade

LDH – Lactato desidrogenase

MAC-ELISA – IgM Antibody Capture- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imune enzimático para Captura de Anticorpos IgM)

MS - Ministério da Saúde

NAT – Nucleic Acid Test (Teste de Ácido Nucleico)

NSZC – Não Síndrome Zika Congênita

OMS – Organização Mundial da Saúde

PC – Perímetro cefálico

RT-qPCR – Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa seguida da Transcrição Reversa)

PRNT – Plaque Reduction Neutralizing Test (Teste de Neutralização por Redução de Placas)

RN - Recém nascido

SZC- Síndrome Zika Congênita

USG – Ultrassonografia

USTF – Ultrassom transfontanela

VHS – Velocidade de Hemossedimentação

ZIKV – Zika Vírus

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Esquema do Zika Vírus.....	21
Figura 2 – Esquema MAC-ELISA.....	31
Figura 3 – Organograma de Seleção da Amostra	42
Tabela 1 – Descrição da Amostra	44
Figura 4 – Resultado das Amostras Seriadas	46

RESUMO

Objetivos: descrever os resultados da dosagem de IgM em pacientes com confirmação diagnóstica de infecção congênita pelo zika vírus, avaliando a relação com período no qual a infecção materna ocorreu, a janela diagnóstica e as alterações clínicas nos casos estudados. **Metodologia:** foram avaliados, de acordo com o momento de coleta e com a presença de alterações clínicas, os resultados das sorologias IgM realizadas pelo método MAC-ELISA licenciado pelo CDC, em 52 pacientes infectados pelo Zika vírus, acompanhados no Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente. Todos os casos estudados tiveram infecção congênita confirmada por RT-qPCR ao nascimento. Os resultados foram avaliados de acordo com a presença de alterações clínicas, utilizando o programa estatístico SPSS. **Resultados:** dos 52 pacientes avaliados 29 (55,8%) apresentaram IgM positiva e 23 (44,2%) negativa. Amostras colhidas nos primeiros 29 dias de vida apresentaram maior positividade em relação aos demais grupos, sendo 15 (71,4%) amostras positivas no grupo IgM<30 dias, 6 (42,9%) no grupo IgM 30-120 dias e 8 (47,1%) no grupo IgM >120 dias. Verificamos que as crianças infectadas no primeiro trimestre gestacional foram as que mais apresentaram IgM positivo na primeira coleta, correspondendo a 75,9% dos resultados positivos, seguidos de 10,3% no segundo trimestre e 13,8% no terceiro trimestre gestacional ($p= 0,002$). Observamos correlação entre a presença de alterações neurológicas e manifestações clínicas de síndrome zika congênita com resultados positivos de sorologia IgM no grupo que teve a amostra colhida nos primeiros 29 dias de vida. **Conclusões:** Mesmo sendo encontrada correlação com questões clínicas, o teste de IgM se demonstrou de baixa sensibilidade para o diagnóstico de infecção congênita pelo Zika vírus. Os melhores resultados de sensibilidade foram encontrados em pacientes que foram analisados nos primeiros 29 dias de vida e quando a infecção materna ocorreu no primeiro trimestre gestacional. Observamos mais resultados positivos em pacientes com SZC do que nos pacientes NSZC. O ensaio sorológico, embora não possa ser usado como método de exclusão diagnóstica, deve ser realizado diante dos casos suspeitos, principalmente em pacientes sintomáticos, na menor janela de tempo possível para aumentar a chance do diagnóstico de infecção congênita pelo vírus Zika. Mais estudos, com amostras pareadas, são necessários para comprovação de reinfeção, reativação e de persistência de IgM prolongada.

Palavras-chave: zika vírus, sorologia MAC-ELISA, síndrome zika congênita

ABSTRACT

Research goals: to describe the results of the serological tests of patients diagnosed with congenital infection by Zika virus (ZIKV), evaluating the period in which the maternal infection occurred, the time at which the sample was collected and eventual clinical changes. **Methodology:** The results of the Zika MAC-ELISA test (licensed by the Centers for Disease Control and Prevention – CDC) of 52 childrens followed at the Fernandes Figueira Institute were used in this study. All patients had congenital infection confirmed by positive RT-qPCR at birth. The data were linked to the the clinical data, the time of maternal infection, the diagnostic window and the child's age at the time of sample collection. **Results:** Out of 52 patients carrying the Zika virus, 29 (55.8%) presented positive IgM and 23 (43.3%) negative, showing little sensitivity of the method for the diagnosis of congenital infection by Zika virus. The positive result ratio was also subject to the patient's life time. Samples collected in patient's first 29 days of life showed greater ratio of positive results than the samples of the other groups; 15 (71.4%) positive samples in the IgM group <30 days, 6 (42.9%) in the IgM group 31-120 days and 8 (47.1%) in the IgM group > 120 days. It was verified that the infected children in the first trimester were the ones that presented the most positive IgM in the first collection, corresponding to 75.9% of the positive results, followed by 10.3% in the second trimester and 13.8% in the third trimester ($p = 0.002$). We found correlation between serological IgM positive results and the presence of neurologic findings and CZS. **Conclusions:** we obtained better results in patients whose samples had been collected during the first 30 days of life, especially when maternal infection occurred in the first trimester of pregnancy. We found more positive results in patients with SZC than in NSZC patients. The serological test, although it can not be used as a method of diagnostic exclusion, should be performed in the presence of suspected cases, especially in symptomatic patients. More studies, with paired samples, are needed in order to prove reinfection, reactivation, and prolonged IgM persistence.

Keywords: zika vírus, MAC-ELISA sorology, congenital zika syndrome

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1. Histórico	18
3.2. Vírus Zika	20
3.3. Síndrome Zika Congênita	23
3.4. Diagnóstico	26
3.4.1. <i>Diagnóstico Clínico</i>	26
3.4.2. <i>Diagnóstico Laboratorial</i>	28
3.4.2.1. Alterações Inespecíficas.....	28
3.4.2.2. Alterações Específicas.....	29
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo Geral	33
4.2. Objetivos Específicos	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1. Desenho do Estudo	34
5.2. Cenário	34
5.3. Período	35
5.4. População	35
5.4.1. <i>Critérios de Inclusão</i>	36
5.4.2. <i>Critérios de Exclusão</i>	36
5.5. Coleta de Dados	36
5.5.1. <i>Dados do Paciente</i>	37

5.5.2. <i>Dados Maternos</i>	38
5.6. Coleta e Processamento dos Exames Laboratoriais	39
5.7. Classificação	40
5.8. Análise Estatística	40
6. QUESTÕES ÉTICAS	40
7. RESULTADOS	41
8. DISCUSSÃO	47
9. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	69
Apêndice 1 - Ficha de Coleta de Dados	69
Apêndice 2 - ficha de seguimento ambulatorial	84
ANEXOS	87
Anexo 1 - Documento do CDC modificado pela Autorização de Uso de Emergência para inclusão de materiais usados por laboratórios fora dos Estado Unidos	87
Anexo 2 - Aprovação do CEP	107
Anexo 3 - TCLE nascidos no IFF	110
Anexo 4 - TCLE nascidos externos ao IFF	116

1. INTRODUÇÃO

Em novembro de 2015 um aumento significativo no número de casos de microcefalia foi detectado no Brasil, predominantemente na região nordeste¹. Logo após os primeiros casos foi levantada a hipótese de associação entre esse aumento na ocorrência de microcefalia congênita e a epidemia de zika que ocorreu em março deste mesmo ano¹. O Ministério da Saúde (MS) então decretou situação de emergência² e elaborou protocolo para o manejo dos casos.

A infecção adquirida através da picada do mosquito *Aedes Aegypti*, por via sexual ou transfusão sanguínea em geral cursa com sintomas autolimitados e brandos como febre, *rash* maculopapular, mialgia e artralgia, raramente apresentando complicações, como a síndrome de Guillain-Barré^{3,4}. Em um cenário de epidemia o diagnóstico pode ser feito apenas baseado nas manifestações clínicas⁵. De forma oposta à infecção adquirida, a infecção congênita pelo zika vírus é associada a lesões neurológicas graves e irreversíveis⁶. Nesses casos, o diagnóstico etiológico deve ser confiável, sensível, específico e de fácil acesso.

O exame preconizado para confirmação laboratorial é a reação em cadeia de polimerase via transcrição reversa do RNA viral (do inglês- *real time – quantitative polymerase chain reaction – RT-qPCR*), realizado em laboratórios de referência do Sistema Único de Saúde (SUS)⁷. Embora sensível e com alta especificidade, o RT-qPCR apresenta limitação temporal visto que a coleta da amostra de sangue deve ser feita idealmente nos primeiros sete dias após o início dos sintomas e a de urina em até três semanas^{8,9}. Alguns estudos descrevem períodos prolongados de viremia, porém, ocorrem apenas em grupos limitados de pacientes, sem especificação genotípica ou fenotípica

descrita^{10,11}. Embora inicialmente essa viremia persistente tenha sido associada a pior prognóstico fetal, alguns estudos demonstraram que nem a carga viral, nem sua detecção prolongada estão associadas a piores desfechos¹¹⁻¹³.

Outro fator limitante ao diagnóstico da infecção congênita é a alta prevalência de infecção adquirida assintomática com prevalência entre 29 a 82% de casos descritos por alguns autores¹⁴⁻¹⁷. Assim, crianças que não apresentam sintomas ao nascimento, cujas mães tiveram a infecção assintomática na gestação, não serão submetidas a investigação clínica, radiológica e laboratorial, pela ausência de suspeita do quadro. No entanto, pacientes sem microcefalia podem ter alterações oftalmológicas e alterações no desenvolvimento neuropsicomotor, como descrito na literatura^{18,19}.

Resultados negativos de IgM não afastam a possibilidade de infecção, pois esses anticorpos não são permanentes e podem já terem sido eliminados no momento da investigação. Por outro lado, valores elevados de Imunoglobulina G não diferenciam infecção congênita de exposição vertical, quando, apesar de exposto ao vírus, o feto não é infectado. Isso porque, diferentemente da IgM que é uma imunoglobulina pentamérica e não atravessa a placenta, a IgG se estrutura em um monômero e é transferida por transporte ativo da circulação materna para a fetal²⁰. Logo, a detecção de IgG no plasma do recém-nascido demonstra que houve exposição, porém não confirma a infecção no caso das outras infecções congênicas²¹. Na investigação de outras infecções congênicas, a persistência ou elevação dos títulos de IgG em coletas seriadas confirma a infecção fetal, porém ainda não há evidências que suportem essa metodologia no caso da infecção congênita pelo vírus Zika²¹. Além disso, caso haja essa persistência de IgG para Zika após o nascimento, ainda devemos analisar cautelosamente esse resultado, pois pode ser

falso positivo quando colhido em um contexto epidemiológico de co-circulação de outras arboviroses.

Em um estudo, realizado em Pernambuco, a detecção de IgM mostrou-se bastante eficaz com 97% de amostras positivas no LCR e 90% no sangue de pacientes com microcefalia²². Resultados positivos de IgM para zika em amostras de LCR ou sangue de recém-nascido confirmam a infecção congênita, uma vez que essa imunoglobulina não atravessa a barreira placentária²². Em relação à reação cruzada com a dengue, nos casos de infecção congênita, o diagnóstico diferencial é pela própria clínica. No caso da dengue, a infecção congênita em geral é assintomática, podendo ser grave nos casos em que a infecção ocorre próximo ao término da gestação, sem que o feto receba anticorpos maternos²³. Para aumentar a especificidade dos testes sorológicos, ensaios sorológicos utilizando epítomos mais específicos são desenvolvidos. Um dos ensaios, realizado por Balmaseda e colaboradores que, testou anticorpos contra o sítio S2 da proteína não estrutural 1 (NS-1), alcançou especificidade entre 80.4% a 95.9% para Zika em amostras de pacientes infectados no Brasil, na Nicarágua e viajantes e residentes europeus. O teste foi ainda mais sensível em pacientes com amostras colhidas após 10 dias, porém não foram testadas amostras colhidas após longos períodos de infecção. Assim, além de disponível apenas em laboratórios de pesquisa, não há descrição do uso da técnica para o diagnóstico de infecção congênita²⁴.

Um estudo realizado no Rio de Janeiro, por Zin e colaboradores, o qual acompanhou gestantes com RT-qPCR positivo para zika durante a gestação e investigou clinicamente as crianças expostas, identificou alterações clínicas ou radiológica em 42% dos recém nascidos (RN), mas microcefalia em apenas 3,4%²⁵. Observa-se então que investigação de infecção congênita pelo zika vírus, apenas em crianças com microcefalia,

pode resultar em subdiagnóstico dos casos assintomáticos ao nascimento. Essas crianças podem apresentar comprometimentos oculares e cognitivos, tendo o início do tratamento específico retardado pela ausência de diagnóstico.

Outro estudo que acompanhou 13 crianças com exposição pré-natal ao Zika vírus confirmada laboratorialmente, sem microcefalia ao nascimento, encontrou alterações de neuroimagem em todas e microcefalia em 11 delas quando avaliadas aos 5 meses de idade. Foram também descritos hipertonia, irritabilidade, disfagia, síndrome extrapiramidal e alterações oculares²⁶.

Em novembro de 2016, foi publicado por Moore uma revisão sistemática que descreveu o fenótipo da síndrome zika congênita, possibilitando o diagnóstico clínico. Dessa forma permite-se a otimização do diagnóstico clínico, o início do tratamento e da investigação de outras alterações clínicas não associadas a outras infecções congênicas, como exemplo bexiga neurogênica^{27,28}.

Durante a epidemia nas ilhas Yap métodos de pesquisa de anticorpos foram licenciados pelo CDC: o ensaio imune enzimático para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA – do inglês *IgM Antibody Capture- Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e o teste de neutralização por placas de redução (PRNT – do inglês *Plaque Reduction Neutralization test*)⁸. Ambos os métodos são disponíveis apenas em laboratórios de referência e pesquisa para flavivirose e ainda não foram rotineiramente utilizados na avaliação de coortes de pacientes em acompanhamento após a infecção congênita pelo Zika vírus. A aplicabilidade atual do MAC-ELISA é destinada ao diagnóstico de gestantes com quadro suspeito, porém com RT-qPCR negativo, devendo ser complementada pelo PRNT para minimizar a probabilidade de reação cruzada²⁹. Esse teste avalia a resposta humoral do paciente quando em contato com o vírus Zika e a

presença de anticorpos neutralizantes que impedem a infecção de culturas de células VERO e, conseqüentemente, inibem a formação de efeitos citopáticos seguidos de formação de placas nessas culturas³⁰.

O presente trabalho descreve os resultados da dosagem da imunoglobulina da classe IgM pelo método MAC-ELISA, em pacientes com o diagnóstico de infecção intrauterina, confirmados por RT-qPCR positivo no líquido, sangue ou urina, correlacionando ao período de infecção materna, a persistência da IgM e presença de alterações clínicas. Não foi feita confirmação pelo PRNT, pois todos os pacientes tinham confirmação por RT-qPCR, além de não dispormos da técnica no IFF.

2. JUSTIFICATIVA

A infecção pelo Zika vírus pode provocar graves danos neurológicos quando transmitida verticalmente³¹. Além disso, crianças assintomáticas ao nascimento, expostas ao vírus durante a gestação, podem apresentar alterações oftalmológicas, alterações tardias no desenvolvimento, bem como o desenvolvimento de hidrocefalia pós-natal^{18,19,26}, demonstrando a importância do acompanhamento clínico e do aperfeiçoamento dos exames laboratoriais.

Mesmo não havendo proposta curativa, foi observado que intervenções precoces como fisioterapia, estímulo visual e investigação urodinâmica, podem ter um impacto na qualidade de vida e no desenvolvimento das crianças infectadas^{18,19,28}. Desta forma, observa-se que o aprimoramento das técnicas disponíveis para o diagnóstico laboratorial pode ter um impacto significativo no manejo dos pacientes com infecção congênita, principalmente nos assintomáticos ao nascimento.

Embora ainda não se saiba todos os efeitos da infecção congênita pelo zika vírus a longo prazo, o conhecimento de manifestações tardias em outras infecções congênitas nos faz considerar a possibilidade de alterações pós natais nos pacientes assintomáticos ao nascimento nos seus primeiros anos de vida³². A distinção entre pacientes infectados intrauterino e pacientes apenas expostos permitiria direcionar recursos para o seguimento dos pacientes em risco.

Entretanto, os métodos laboratoriais disponíveis esbarram em limitações técnicas. De acordo com as recomendações do CDC, todos os pacientes com suspeita de infecção congênita devem ter amostras de urina e sangue submetidas à investigação laboratorial por RT-qPCR o mais próximo possível do nascimento. Resultados positivos confirmam o diagnóstico de síndrome zika congênita. Resultados negativos devem ser submetidos a pesquisa de IgM, sendo o diagnóstico considerado provável quando o resultado for positivo nos primeiros dias e improvável quando negativo. Resultados positivos, inconclusivos ou equivocados de IgM devem ser submetidos ao PRNT³³.

No Brasil, ao planejar a estratégia de manejo desses casos, em primeiro lugar deve-se considerar a endemia de outros arbovírus como o Dengue, Chikungunya e o vírus da febre amarela, assim como o uso de vacinas de febre amarela e dengue. A co-circulação desses vírus em nosso meio pode provocar interpretação equivocada dos resultados sorológicos, com testes falso-positivos³⁴.

Em segundo lugar, deve-se considerar também a alta incidência de casos de zika congênita decorrente da epidemia de 2015. Exames laboratoriais de alta tecnologia e custo, com demanda prolongada de tempo para execução e necessidade de mão de obra altamente capacitada, não são adequados ao uso nesse contexto.

O método MAC-ELISA, embora não seja amplamente utilizado para a

investigação da infecção congênita, é vantajoso em relação a outros métodos por ter um período maior de detecção e por poder processar várias amostras em um mesmo momento, oferecendo rapidez aos resultados³⁵. Diante das limitações já citadas e da falta de dados na literatura em relação ao uso do método em pacientes com infecção congênita, verificamos a necessidade de descrever os resultados do MAC-ELISA nesse grupo de pacientes, bem como o período no qual mantem-se detectável nesse grupo de pacientes.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Histórico

O vírus Zika foi descrito primeiramente por Dick, Kitchen e Haddow, no ano de 1947. O vírus foi detectado em um macaco Rhesus, durante pesquisas sobre a febre amarela, na Floresta de Zika, em Uganda. O único sintoma apresentado por esse animal foi febre. No ano seguinte o vírus foi encontrado também em mosquitos *Aedes africanus* durante pesquisas sobre a febre amarela^{36,37}. Não era conhecida a capacidade de infecção em seres humanos, mas um levantamento sorológico dos moradores de regiões próximas apontou a presença de anticorpos em 6,1% das amostras analisada³⁷. O primeiro caso reportado em humanos foi descrito por Mcnamara em 1954³⁸. Apenas outros 16 casos foram relatados no período de 1954 a 1981, distribuídos entre os continentes africano, asiático e europeu³⁸⁻⁴³.

A primeira epidemia é descrita no ano de 2007, na Micronésia. Inicialmente foi observada pelos médicos locais a presença de sintomas semelhantes aos da dengue, como febre, mialgia, artralgia e conjuntivite. Resultados das amostras de alguns desses

pacientes foram positivas para IgM contra o antígeno da dengue. Apenas após a execução de testes virológicos comprovou-se que a epidemia em questão fora pelo Zika vírus⁴⁴. Em 2013, uma nova epidemia, desta vez na Polinésia Francesa, revelava que a expansão do vírus para a Oceania havia se concretizado, com achado de vírus apresentando a mesma linhagem filogenética que encontrada na epidemia de 2007. Semelhantemente ao ocorrido nas ilhas Yap, após o relato de quatro casos índices, foram levantadas amostras de pacientes que tiveram quadro semelhante e exames laboratoriais negativos para dengue. Das dez amostras analisadas quatro foram positivas para dengue e duas inconclusivas⁴⁵.

Em 2015, vírus dessa mesma linhagem circulante na Oceania foram detectados em amostras de sangue de pacientes residentes na região nordeste do Brasil, sem relato de viagem ao exterior. Esses casos foram notificados, mas devido ao caráter benigno e autolimitado da doença, nenhuma medida específica foi tomada. O diagnóstico deveria ser feito basicamente pela clínica dos pacientes, sendo os testes laboratoriais restrito aos Institutos de Pesquisa^{46,47}.

Ao final deste ano, um aumento no número de crianças com microcefalia congênita, inicialmente na região nordeste, foi detectado. Havia muitas evidências entre a possível associação entre esses casos e a epidemia de zika que ocorrera meses antes⁴⁸. No entanto, apenas após a detecção, o isolamento do RNA(*ribonucleic acid*) viral e posterior sequenciamento em amostra de líquido amniótico de duas gestantes com fetos diagnosticados com microcefalia, além de lesões neurológicas no feto como calcificações, ventriculomegalia, atrofia cerebral e disgenesia de corpo caloso e vermis cerebelar é que houve essa associação^{1,49}.

Em Março de 2016, um estudo realizado na Eslovênia submeteu à autopsia um feto diagnosticado com microcefalia durante ultrassonografia (USG) realizada na 29^a

semana gestacional³¹. Além da microcefalia o feto também apresentava numerosas calcificações e moderada ventriculomegalia. A gestação foi interrompida com 32 semanas de idade gestacional (IG) por decisão materna. À microscopia eletrônica foi possível identificar a presença do vírus Zika, confirmando a associação de causa-efeito entre o vírus e os distúrbios do sistema nervoso central já descrito por outros autores^{31,50,51}. Em vidro, já havia sido comprovada essa associação por meio da demonstração da atuação viral em células humanas cerebrais em modelos de organoides cerebrais, levando ao comprometimento da neurogênese durante o desenvolvimento fetal⁵².

Essa confirmação foi apenas um pequeno passo na direção para entendermos a ação viral sobre a embriogênese e o papel do sistema imunológico materno/fetal na proteção/facilitação do acometimento fetal. O entendimento desses processos pode ser a chave para o desenvolvimento de vacinas e de medicamentos que possam diminuir a passagem transplacentária desse vírus⁵³⁻⁵⁵.

3.2 Vírus Zika

O vírus Zika pertence à família *Flaviviridae*, e ao gênero flavivírus, apresentando características semelhantes a outros membros desse grupo como o vírus da Febre Amarela, Dengue e Vírus do Oeste do Nilo. Foi descrito pela primeira vez em 1947, isolado em amostra de sangue de um macaco Rhesus, durante pesquisas sobre vetores de febre amarela. No entanto, o sequenciamento completo do seu genoma foi concluído apenas em 2007 por Kuno⁵⁶.

É um arbovírus (transmitido por artrópodes) globular, com RNA de fita simples

de polaridade positiva, envolto por nucleocapsídeo icosaédrico, o qual é circundado por uma membrana lipídica e envelopado⁵⁷.

Seu genoma codifica um único polipeptídico o qual é clivado por proteases em 10 proteínas, sendo três estruturais e sete não-estruturais. As proteínas estruturais formam o capsídeo, a membrana e o envelope, respectivamente denominados proteína C, proteína M e proteína E^{56,57} (Figura 1).

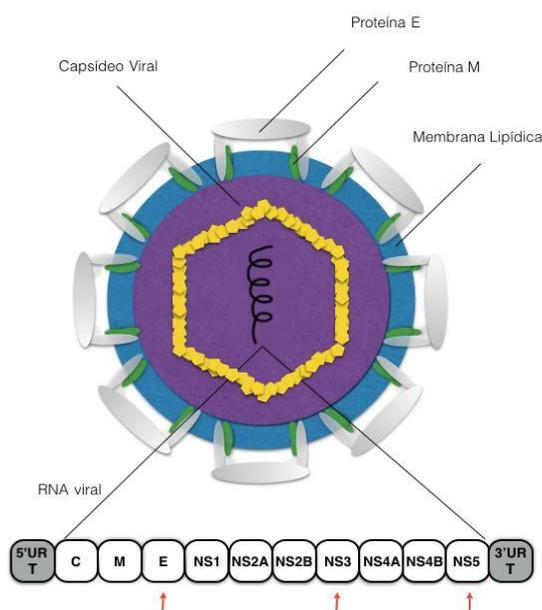


Figura 1 - Fonte: Esquema do Zika vírus adaptado (Vasconcelos, et al, 2018)

As outras sete proteínas resultantes da clivagem do polipeptídico formam as chamadas proteínas NS (*non structural*), nomeadas de NS1 a NS5. (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5), cada uma com sua função na replicação viral^{56,58}.

A infecção pelo vírus dispara dois principais mecanismos imunológicos: resposta imune antiviral e resposta pró-inflamatória. Através da picada do mosquito, o vírus infecta fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas imaturas⁵⁹. Além disso, no

caso das infecções congênitas, o vírus atravessa a barreira placentária através da infecção de macrófagos placentários e citotrofoblastos⁶⁰ e dispara a apoptose de células progenitoras neurais através do receptor Toll-like 3 (TLR3), levando a ativação de 41 genes relacionados ao desenvolvimento neuronal e, assim, promovendo apoptose e desregulação da proliferação de células gliais progenitoras⁶¹. Também é descrita a infecção de neurônios, levando a danos cerebrais em períodos mais tardios de infecção⁶².

O vírus é capaz de penetrar nas células humanas através da ligação da proteína do envelope viral com o receptor de superfície celular tirosina quinase Axl, mediada pela proteína viral do envelope⁵⁹. Essa endocitose promove a resposta imune do hospedeiro, ativando uma cascata pro-inflamatória. A resposta antiviral inicial é feita através de proteínas de superfície, ativação do complemento, pela imunidade inata e por proteínas plasmáticas de resposta inflamatória aguda, também funcionando como uma resposta pró-inflamatória⁵⁵. Estudos em vidro sugerem que o Axl pode atuar amplificando a resposta viral por inativar a regulação da via do receptor de Interferon I (Ifnar1)⁶³. O Interferon 1 (IFN1) é descrito como um potente antiviral em infecções por arbovirus. Ele atua se ligando aos receptores Ifnair 1 e Ifnair 2, os quais ativam proteínas (Jak 1 e Tyk2) e sinalizadores da transcrição (STAT1 e STAT2), os quais estão envolvidos na cascata de apoptose e morte celular⁶⁴. A degradação do STAT2 também é descrita através da proteína não estrutural NS-5⁶⁵.

Além da resposta inata antiviral, o vírus também induz uma resposta inflamatória, com o envolvimento de diversas moléculas do sistema imune, responsáveis pela maioria das manifestações clínicas da doença. Esses eventos pró-inflamatórios são responsáveis pela quimiotaxia de células T e outros leucócitos, o que, por sua vez aumenta a liberação de quimiocinas e citocinas locais até o momento da infecção⁵⁹. Dentre as

moléculas já descritas como envolvidas no processo inflamatório, resultante da infecção pelo Zika vírus, temos: Fatores solúveis de resposta inflamatória (Ccl12, Nfkbiz, Tnfrsf1b, Cxcl10, Ccl7, Ccl5, Ccl3 e Ccl2); moléculas associadas à resposta imune adaptativa (Serpina9, Icam1 e Relb); fatores associados à apresentação de antígenos (Tapbp1, Psmb8, Psmb9, Psme2 e Psme1), moléculas associadas à resposta imune mediada por células B (Inpp5d, Irf7 e Icosl); fatores regulatórios de células T (B2m e Tap2) e citocinas (Irf8, Irf1, Ptgs2, Elf1 e Tspo)⁵⁵.

Além da ativação da imunidade inata e adaptativa e da liberação de proteínas e mediadores e mediadores pró-inflamatórios, o vírus Zika também parece estar implicado na regulação da apoptose de células gliais. Esse mecanismo pode ser o responsável pela lesão neurológica fetal ^{53,55,62}.

3.3 Síndrome da Zika Congênita

Após a epidemia de zika ocorrida em 2015, verificou-se um aumento significativo no número de casos de microcefalia, inicialmente na região nordeste do Brasil⁶⁶. Os achados laboratoriais, clínicos e radiológicos apontavam para uma possível associação entre a epidemia de zika e o aumento na incidência de microcefalia^{1,6,31,49}, porém a relação causalidade foi confirmada apenas no início de 2016⁶⁷.

Além da microcefalia, que foi a primeira alteração a ser descrita, outras alterações clínicas passaram a ser relacionadas com a infecção vertical pelo zika vírus^{31,68,69}. Uma revisão da literatura realizada por Moore e colaboradores identificou um fenótipo distinto nesses pacientes, ao qual nominaram de síndrome zika congênita (SZC)²⁷.

Embora muitas das alterações clínicas relatadas sejam compartilhadas com outras infecções congênitas, como TORCHS (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes e Sífilis), o trabalho concluiu que cinco manifestações eram particulares à SZC, raramente observadas nas outras infecções congênitas²⁷. O reconhecimento desse fenótipo forneceu uma nova ferramenta para auxiliar o diagnóstico diferencial, principalmente quando faltam evidências laboratoriais.

As 5 características descritas no trabalho foram: microcefalia severa (menor que três desvios padrão) com colapso parcial da calota craniana, atrofia cerebral com calcificações subcorticais, lesões maculares cicatriciais e depósito pigmentar retiniano, contraturas congênitas em uma ou múltiplas articulações, hipertonia precoce e sintomas extrapiramidais^{27,70}. Os autores propuseram uma divisão entre componentes estruturais e funcionais, com algumas características comuns a esses dois grupos.

Entre os componentes estruturais os autores ressaltaram as alterações na morfologia craniana com microcefalia grave (menor que 2 desvios padrão), cavalgamento de suturas, proeminência occipital, prega nucal redundante e desproporção craniofacial^{27,71,72}. Ainda no grupo de lesões estruturais neurológicas foram descritas: calcificações subcorticais e em gânglios da base, aumento do espaço ventricular e extra axial, lisencefalia, defeitos de migração neuronal, ventriculomegalia, malformações do corpo caloso, e hipoplasia cerebelar^{1,6,11,26,73-76}. Também foram descritas lesões oftalmológicas estruturais como microftalmia, coloboma, catarata, calcificações intraoculares, e alterações de câmara posterior como atrofia coriorretiniana, alterações pigmentares retinianas, hipoplasia/atrofia de nervo óptico^{18,68,77}.

Foram descritas também contraturas congênitas (artrogripose, pé torto congênito, luxação de quadril e de joelho), com apresentação variada, ocorrendo em

diferentes articulações. A causa dessas alterações foi proposta como consequência dos fatores neurológicos os quais podem ser responsáveis por alterações motoras intraútero, causando redução do movimento fetal e contraturas⁶⁹.

As alterações descritas como funcionais estão diretamente relacionadas às sequelas neurológicas, incluindo atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, irritabilidade, hipertonia, espasticidade, alterações extrapiramidais, alterações auditivas e visuais, epilepsia e distúrbios de deglutição^{6,74,78}.

Posteriormente a essa revisão da literatura, um estudo que avaliou 22 crianças com avaliação urodinâmica encontrou bexiga neurogênica em 100% dos pacientes. Essa condição clínica pode propiciar infecções urinárias frequentes e lesões renais a longo prazo. O seu diagnóstico precoce pode evitar essas intercorrências e impactar diretamente na sobrevivência²⁸. No artigo de Moore e colaboradores essa manifestação não é citada, provavelmente pelo seu desconhecimento na ocasião da publicação. Outras alterações também descritas foram paralisia diafragmática e alterações eletroencefalográficas no sono em paciente sem epilepsia clínica^{79,80}.

3.4 Diagnóstico

3.4.1 Diagnóstico Clínico

As manifestações clínicas da infecção adquirida, quando presentes, são semelhantes às de outros arbovirus, em geral com uma apresentação mais branda. Os

principais sintomas são *rash* maculopapular, febre, prostração, mialgia e artralgia, edema articular, cefaleia, dor retroorbitária e conjuntivite não purulenta, sendo febre e rash os mais frequentes³. Também são descritos sintomas gastrointestinais como diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos e constipação⁸¹. A infecção adquirida também está associada a síndrome de Guillain-Barré⁸². A apresentação em crianças é similar a em adultos⁸¹.

No caso da síndrome Zika Congênita (SZC), um grupo de alterações clínicas descreve o fenótipo da síndrome. Os sintomas considerados característicos são microcefalia severa, com colapso craniano parcial, atrofia cortical com calcificações subcorticais, atrofia macular com alteração do depósito do pigmento da retina, contraturas congênicas, hipertonia e sintomas extrapiramidais²⁷. As principais diferenças pontuadas foram lesões hepatoesplênicas, cardíacas e pulmonares, relativamente comuns nas TORCHs e ausentes na SZC⁸³. A microcefalia, embora também seja descrita em outras infecções congênicas, principalmente pela toxoplasmose e CMV, em geral na SZC é mais acentuada²⁷.

Alterações oftalmológicas também são comuns, sendo os padrões mais frequentemente descritos nos exames oftalmológicos: atrofia macular coriorretiniana, alteração focal do pigmento macular, alterações do nervo óptico. O estudo de Zin e colaboradores, que acompanhou a evolução dos pacientes verticalmente expostos ao zika vírus, demonstrou que os exames oftalmoscópicos permaneciam inalterados ao longo do primeiro ano de vida e não identificou lesões ativas. O trabalho também descreveu alterações em pacientes sem outras manifestações clínicas de SZC¹⁸. Assim como em outros estudos, as crianças infectadas no primeiro trimestre de gestação foram as mais afetadas, porém, as infecções no segundo e terceiro trimestres também resultaram em

acometimento ocular^{18,84,85}.

Outras alterações também descritas são as alterações ortopédicas, sendo as mais frequentes, artrogripose, pé torto congênito e contraturas em flexão dos joelhos, hiperextensão com subluxação do joelho, campilodactilia, deformidades de quirodáctilos e ombros em hiperextensão, com contraturas e rotação interna⁶⁹.

A artrogripose congênita é uma síndrome caracterizada por contraturas articulares associada a fraqueza muscular, a qual pode acometer membros inferiores isoladamente ou pode apresentar-se em múltiplas articulações⁶⁹. Estudos histopatológicos em pacientes com SZC e artrogripose -natimortos ou com óbito nas primeiras 48 horas de vidas- revelaram alterações medulares com falha de migração neuronal no corno anterior da medula, sugerindo que essas alterações sejam causadas pela imobilidade decorrente da lesão neurológica⁸⁶. Pacientes com alterações neurológicas e contraturas congênicas apresentam risco aumentado para luxação dos quadris, devendo ser feito o acompanhamento radiológico para detecção precoce e correção quando necessária⁸⁷.

Assim como nas outras infecções congênicas, nota-se acometimento mais severo nos pacientes cujas mães foram infectadas no primeiro trimestre da gestação, porém, pacientes acometidos no último trimestre também podem ser sintomáticos⁴⁸.

Crianças expostas verticalmente, assintomáticas ao nascimento, também podem apresentar alterações tardias como hidrocefalia, microcefalia, alterações no desenvolvimento e alterações oftalmológicas^{18,19,26}.

Em Agosto de 2017, um fórum, que reuniu especialistas das diversas áreas envolvidas com o manejo da SZC, concluiu que todas as crianças com SZC ou assintomáticas cujas mães tiveram evidência laboratorial de infecção durante a gestação, deveriam ser submetidas a ultrassom transfontanela (USTF), avaliação oftalmológica e

auditiva com BERA²⁹.

Posteriormente a esse encontro, foram evidenciadas alterações urodinâmicas, cardiológicas e eletroencefalográficas no sono de pacientes com SZC^{28,88}. O que talvez possa motivar a inclusão da avaliação cardiológica com ecocardiograma e avaliação urodinâmica em um próximo encontro.

3.4.2. Diagnóstico Laboratorial

3.4.2.1. Alterações inespecíficas

Alterações laboratoriais raramente são relatadas nos casos reportados de infecção pelo zika vírus. Entretanto, alguns casos podem cursar com moderada leucopenia, neutropenia e trombocitopenia. Elevações discretas de marcadores inflamatórios como velocidade de hemossedimentação (VHS), ferritina, fibrinogênio e Proteína C Reativa, de enzimas hepáticas e de lactato desidrogenase (LDH) também já foram descritos em alguns pacientes⁸².

3.4.2.2. Alterações específicas

a- Métodos Laboratoriais para Detecção Viral

O método padrão ouro é o isolamento viral em amostras cultivadas em células como a C6/36 e VERO. Entretanto, a necessidade de um período longo de incubação da amostra, a alta complexidade do teste e a necessidade de amostras altamente preservadas, reduzem a sua aplicabilidade, restringindo-o a laboratórios de referência específicos³⁶.

Os testes de detecção do RNA viral atualmente são os de melhor performance para confirmação da infecção na fase aguda e podem ser realizados pelo método convencional da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) ou quantitativo (RT-qPCR). Ambos os métodos tem boa sensibilidade e especificidade, porém o método quantitativo além da detecção do RNA, também quantifica a carga viral^{44,89,90}. A sensibilidade está diretamente relacionada ao tipo de amostra escolhida, ao tempo transcorrido entre a infecção e a coleta, a quantidade de material coletado e seu armazenamento. Ou seja, quanto mais perto do início dos sintomas for a coleta e quanto mais bem preservada a amostra, menor a probabilidade de um resultado falso-negativo⁹¹.

Em relação ao tipo de amostra analisada, sabe-se que em amostras de sangue a detecção do RNA viral em geral é possível já no primeiro dia de doença até o 5º dia em média⁹¹. Entretanto, o trabalho de Paz-Bailey e colaboradores encontrou uma média de 14 dias de detecção do RNA viral no sangue. Uma paciente gestante mantendo RT-qPCR positivo no 80º dia após o início dos sintomas, o que foi estimado ocorrer em 2% dos paciente⁹². Amostras de urina, em média, apresentam RNA viral detectável após os primeiros dias de doença, em torno do 4º dia, porém, com uma duração maior, 3 semanas⁹¹. Além do sangue e urina, o RNA viral também pode ser detectado em amostras de líquido, *swabs* nasofaríngeo, líquido amniótico, saliva, leite materno, secreção endocervical, sêmen e tecidos fetais^{49,89,93-98}.

Entretanto para o diagnóstico de infecção congênita, recomenda-se apenas a coleta de rotina de sangue e urina, com a possibilidade de coleta de líquido quando realizado para outras finalidades²⁹. Mesmo com períodos mais longos de viremia e virúria descrito por alguns autores, a transmissão vertical no primeiro e segundo trimestres

gestacionais em geral não poderia ser detectada por RT-qPCR nos recém-nascidos devido ao período transcorrido entre a infecção e a oportunidade de coleta dessas amostras^{8,99}. Porém, Chimelli e colaboradores descrevem o caso de uma paciente com RT-qPCR positivo na urina após o nascimento, tendo sido comprovada a infecção materna no primeiro trimestre gestacional, inclusive, com detecção de malformações fetais ainda nesse período. Nessa mesma paciente, quando veio a óbito aos 5 meses de idade, ainda foi detectado RNA viral no SNC¹⁰.

Outro método capaz de identificar a infecção viral na fase aguda, descrita em infecções virais por dengue, é a detecção da proteína NS-1. Essa proteína não estrutural é secretada pelas células infectadas e pode ser encontrada em altas concentrações durante o período de replicação viral. No entanto, outros flavivírus, como o vírus da dengue, também secretam essa proteína, tendo homologia em torno de 80%, o que dificulta o diagnóstico diferencial. Em nosso meio, onde há alta prevalência de dengue esse aspecto torna o diagnóstico específico para infecção por zika, através da dosagem de NS-1, uma abordagem de uso limitado⁵⁸.

b - Métodos Laboratoriais para a Detecção de Anticorpos

Imunoglobulinas são glicoproteínas efetoras da imunidade humoral, presentes no



Figura 2: MAC-ELISA

plasma, líquido intersticial, mucosas, cavidades e na superfície de linfócitos B²⁰. A detecção desses anticorpos específicos para doenças infecciosas, na maioria das vezes, indica doença ou contato com o antígeno por meio de vacinas ou transferência passiva ou ativa de anticorpos maternos. Além de proteção, essas proteínas também são úteis ao diagnóstico de doenças infecciosas, principalmente após a fase aguda quando muitas vezes o agente infeccioso já não é mais detectável. Alguns métodos são utilizados com essa finalidade como as reações de aglutinação imunoensaios e radioimunoensaios²⁰. Os ensaios imunológicos pelo método ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA) mais comumente utilizados são os do “método sanduíche”. Nesse tipo de ensaio os anticorpos do hospedeiro, quando presentes, ligam-se a outros anticorpos. Essa ligação pode ser detectada por meios colorimétricos ou por fluorescência¹⁰⁰ (Figura 2).

Após a primeira epidemia de zika, ocorrida nas Ilhas Yap, o CDC desenvolveu e padronizou uma metodologia para detecção de anticorpos por captura de IgM (MAC-ELISA)⁴⁴. Segundo as orientações do CDC a detecção de RNA viral por RT-qPCR ao nascimento confirma a infecção congênita, entretanto, resultados negativos não são capazes de afastar esse diagnóstico. Para essas crianças, orienta-se complementar a investigação com a dosagem de IgM específica para Zika. Quando positivo, diante de um RT-qPCR negativo, a infecção é considerada provável. Quando ambos os resultados são negativos é improvável que tenha ocorrido transmissão vertical²⁹. Em relação à infecção adquirida, em média, o IgM é possível ser detectado a partir do 4º dia de infecção, mantendo-se por aproximadamente 12 semanas ou mais. Já o IgG pode ser verificado na circulação a partir do 10º dia de infecção, permanecendo detectável por vários anos^{8,101}. Não há dados específicos sobre o período de detecção para infecções congênicas, sendo sugerida apenas que a coleta ocorra o mais próximo possível do nascimento, reduzindo a

possibilidade de infecção adquirida pelo Zika ou outro arbovírus³³.

A distinção entre síndrome zika congênita e pós-natal é difícil em áreas onde há circulação viral. Por esse motivo os pacientes devem ser testados logo ao nascimento, evitando que resultados positivos por infecção adquirida sejam um fator de confundimento³³.

Resultados não negativos de IgM (positivo, equivocado, presumidamente positivo e possivelmente positivo) devem ser avaliados também pelo teste de neutralização por redução de placa (PRNT). Esse exame avalia a presença de anticorpos neutralizantes, ou seja, que impedem a infecção de células suscetíveis em mais de 90% em relação ao controle. Resultados não negativos de IgM com PRNT negativo sugerem IgM falso positivo ou crossa-reativo com outro flavivírus⁸.

PRNT não distingue os anticorpos dos pacientes dos anticorpos maternos quando colhidos próximo ao nascimento. Analogamente a outras infecções congênicas, espera-se que esses anticorpos maternos sejam depurados da circulação até 18 meses de idade. Porém nenhum estudo ainda foi realizado para infecção congênita pelo Zika vírus. Em outras infecções congênicas, interpreta-se que quando o resultado é negativo após o 18º mês de vida, houve exposição viral, porém sem infecção. Resultados positivos, em áreas onde o vírus circula, não podem ser diferenciados de exposição pré-natal associada a infecção pós natal adquirida³³.

Diante dos cenários expostos, verifica-se que o diagnóstico de infecção congênita em nosso meio é complexo, sendo a detecção de RT-qPCR positivo nos primeiros dias de vida o método mais confiável⁸. Na tentativa de aprimorar os métodos diagnósticos, vários laboratórios desenvolveram ensaios sorológicos (IgG e IgM) para zika e outras arboviroses. Porém, tanto o trabalho de Safronetz como o de Granger, os quais avaliaram

e compararam alguns desses ensaios, apontaram necessidade de aprimoramento dos exames para redução de reação cruzada^{102,103}. Nesse caminho, Balmaseda e colaboradores realizaram um ensaio sorológico, com anticorpos específicos contra o NS-1, bloqueando sítios de ligação cruzada com outros flavivírus, com especificidade de até 95,9%²⁴.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Descrever os resultados da sorologia IgM nos pacientes infectados verticalmente pelo Zika vírus, assintomáticas ou não, ao nascimento.

4.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a relação entre a positividade de IgM e aspectos clínicos observados no acompanhamento de pacientes com infecção congênita pelo Zika comprovada por RT-qPCR positivo.

b) Avaliar a persistência de anticorpos IgM na população estudada

c) Avaliar a relação entre detecção de anticorpos IgM e o período da infecção materna.

d) Avaliar o período de detecção de anticorpos IgM nos pacientes infectados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

O presente trabalho constitui-se em um estudo observacional, longitudinal descritivo. Nele foram descritos os resultados de sorologia IgM dos pacientes infectados verticalmente pelo Zika vírus acompanhados na coorte “Exposição vertical ao Zika vírus e suas consequências no neurodesenvolvimento da criança”, previamente em andamento no IFF. Os exames foram colhidos durante a epidemia de microcefalia e armazenados no biorrepositório referente ao projeto.

5.2 Cenário

O estudo foi realizado no Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), no Rio de Janeiro, referência do Ministério da Saúde para gestações de alto risco e doenças infecciosas pediátricas. As consultas ocorreram nos ambulatórios multidisciplinares e os exames de RT-qPCR e MAC-ELISA foram realizados no Laboratório de alta complexidade (LACIFF). Esse laboratório funciona nas dependências do IFF, voltado para o apoio diagnóstico e pesquisa.

5.3 Período

As amostras de sangue e outros materiais biológicos foram colhidas e armazenadas no período entre dezembro de 2015 e julho de 2018 por profissionais da infectologia, pediatria e neonatologia. Os exames de RT-qPCR foram processados ao longo desse período de acordo com a disponibilidade de material no LACIFF. Os exames de sorologia pelo método MAC-ELISA para o Zika foram realizados no mesmo período.

O acompanhamento das crianças ambulatoriamente foi feito desde dezembro de 2015, ainda em andamento, com consultas mensais nos primeiros seis meses, trimestrais entre 6 e 12 meses e semestrais após o primeiro ano de vida, podendo variar de acordo com as necessidades clínicas de cada paciente.

5.4 População

A população estudada foi composta por 290 crianças já acompanhadas na coorte “Exposição vertical ao Zika vírus e suas consequências no neurodesenvolvimento da criança” nascidas no IFF ou referenciadas de outras unidades de saúde. Entre os participantes do projeto estavam crianças com síndrome zika congênita e crianças assintomáticas cujas mães tiveram infecção por Zika durante a gestação, com confirmação laboratorial.

5.4.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com RT-qPCR positivo para zika ao nascimento.
- Pacientes com resultados disponíveis de sorologia IgM anti-zika pelo método MAC-ELISA.

5.4.2 Critérios de Exclusão

- Paciente com outras infecções congênitas como toxoplasmose, rubéola, herpes, citomegalovírus, sífilis e HIV diagnosticadas por RT-qPCR ou sorologia.
- Pacientes com confirmação ou suspeita de microcefalia por causas genéticas,

após avaliação pela equipe de genética do IFF.

- Pacientes cujas mães não apresentaram sintomas de zika, ou não tiveram confirmação laboratorial da doença.
- Pacientes sem dados disponíveis no prontuário.

5.5 Coleta de dados

Os dados são coletados sistematicamente durante as consultas periódicas desde o início da coorte. Para uniformizar e otimizar a coleta dos dados foi instituída uma ficha clínica de anamnese e uma ficha de segmento (apêndice 1 e apêndice 2). Os resultados dos exames laboratoriais foram disponibilizados em planilhas fornecidas pela equipe do laboratório e os resultados dos RT-qPCRs estavam disponíveis nos prontuários dos pacientes, assim como os demais exames e consultas.

5.5.1. Dados do paciente

-Sexo, idade gestacional, APGAR, perímetro cefálico e peso ao nascimento.

-Manifestações clínicas: microcefalia, alterações neurológicas (atraso do desenvolvimento, paralisia cerebral, epilepsia, síndrome extrapiramidal), contraturas articulares e artrogripose, lesões oftalmológicas (atrofia coriorretiniana, mobilização de pigmento retiniano, atrofia de nervo óptico entre outras). Essas variáveis foram avaliadas conjuntamente para classificar os pacientes em dois grupos distintos: síndrome zika congênita (SCZ) e não síndrome zika congênita (NSZC), segundo os critérios descritos por Moore(27).

-Exames radiológicos: ultrassonografia transfontanela (USTF), ultrassonografia de abdome (USG) ou tomografia computadorizada (TC) de crânio. Todos os pacientes

foram submetidos à USTF. Os sintomáticos ou com USTF alterados por sua vez tiveram a investigação de neurológica complementada com tomografia de crânio. Os exames foram realizados em sua maioria no IFF, excetuando-se os casos em que o paciente já havia realizado TC em outro serviço, reduzindo assim sua exposição à radiação. Os exames foram classificados em alterados ou não e os que apresentavam alterações compatíveis eram utilizados para o diagnóstico clínico de síndrome zika congênita.

-Exames Laboratoriais: sorologia IgM (sangue e LCR) e RT-qPCR para zika (urina, sangue e/ou LCR), sorologia e/ou RT-qPCR para citomegalovírus (CMV), sorologia para toxoplasmose, HIV, VDRL, herpes e rubéola. Hemograma, enzimas hepática, função renal e eletrólitos), citologia e teste do pezinho. Os exames laboratoriais para investigação de outras infecções congênitas foram colhidos para exclusão diagnóstica. Esses dados serão usados apenas para exclusão de pacientes co-infectados, sem pretensão de correlacioná-los com a infecção pelo zika.

-Teste do desenvolvimento de Bayley III. Aplicado em todos os pacientes assintomáticos nos períodos de 6, 9, 12, 18 e 24 meses. Como alguns pacientes não acompanharam mais no ambulatório durante todo o período acima, consideramos o último resultado disponível.

5.5.2. *Dados Maternos*

- Clínicos: presença de sintomas de zika durante a gestação e o período no qual ocorreu.

- Laboratorial: resultado das sorologias colhidas durante o pré natal (HIV, CMV, Toxoplasmose, rubéola, herpes e sífilis) e do RT-qPCR para zika pré e pós-natal.

5.6. Coleta armazenamento e processamento dos exames laboratoriais

Amostras de sangue de urina foram coletadas de todos os bebês ao nascimento, ou na primeira consulta no ambulatório de DIPE. Pacientes com microcefalia, cujas mães autorizaram a punção lombar, também tiveram amostras de líquido coletada. Todas as amostras foram enviadas ao LACIFF para a pesquisa de RT-qPCR viral e posteriormente armazenadas.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos de EDTA e tubos soro gel, com 2 ml em cada tubo, salvo condições clínicas que não permitiram a coleta dessa quantidade. O sangue era centrifugado e armazenado no biorrepositório do IFF a -20°C.

Durante as consultas subsequentes foi coletado sangue para RT-qPCR e sorologia seguindo o mesmo padrão da coleta realizada ao nascimento ou na primeira consulta.

A pesquisa de IgM, pelo método MAC-ELISA, foi feita nas amostras armazenadas seguindo as instruções do documento do CDC modificado pela Autorização de Uso de Emergência para inclusão de materiais usados por laboratórios fora dos Estado Unidos (anexo 1). Os exames eram realizados conforme disponibilidade do Kit, porém as coletas eram feitas nas consultas com a periodicidade de 1, 3, 6, 9, 12 e 18 meses.

Os exames foram processados no LACIFF, em diferentes períodos, todos com o mesmo *kit* MAC-ELISA licenciado pelo CDC. Após descongelamento as amostras foram testadas em duplicata, juntamente com os controles positivos, negativos e branco, seguindo a ordem do manual.

Para a realização do RT-qPCR o sangue foi colhido em tubo de EDTA e enviado ao LAC. Após centrifugação esse material foi mantido em -20°C até o momento no qual o

exame pudesse ser processado. O exame foi realizado com o kit QuantiTect Probe RT-RT-qPCR (Qiagen)[®] a partir do RNA extraído com TRIzol, seguindo as orientações do fabricante. Os *primers* utilizados foram selecionados de acordo com sequências genéticas descritas por outros autores⁴⁴.

5.7. Classificação

Os pacientes foram classificados em 3 grupos de acordo com o período da coleta da amostra de sangue: até 29 dias de vida (grupo IgM <30 dias), entre 30-120 dias (grupo IgM 30-120 dias) e após 120 dias (grupo IgM >120 dias).

Os pacientes também foram classificados entre síndrome zika congênita (SZC) e não síndrome de zika congênita” (NSZC) de acordo com os critérios clínicos e radiológicos levantados nos prontuários. O período gestacional da infecção materna foi classificado em trimestres. O primeiro trimestre foi definido até 14 semanas de gestação, o segundo trimestre entre 14 semanas e um dia até 28 semanas e o terceiro trimestre após 28 semanas.

5.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS (versão 21.0). Teste chi-quadrado foi utilizado para variáveis categóricas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. QUESTÕES ÉTICAS

O presente trabalho é um subprojeto da coorte “*Exposição vertical ao Zika vírus e suas consequências para o neurodesenvolvimento infantil*” (anexo 2) organizada no IFF/Fiocruz, previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos (CEP) desta instituição, em março de 2016, sob o número CAAE 526756616000005269 (Anexo 3).

Assim como o referido projeto, este estudo encontra-se em consonância com o estabelecido na resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde, de dezembro de 2012, assim como com outras legislações vigentes e pertinentes. O objeto deste trabalho está inserido especificamente no item “n” dos objetivos específicos do referido projeto: Avaliar sensibilidade e especificidade de anticorpos específicos ao ZIKV da classe IgM ou índice de avidéz dos anticorpos específicos ao ZIKV da classe IgG durante a infecção aguda e longitudinalmente aos 3, 6, 9 e 12 meses de vida e no item “o”: Validar testes sorológicos para o diagnóstico laboratorial de ZIKV, CHIKV.

Todos os pacientes já participavam do estudo principal e os que foram excluídos da análise não tiveram nenhum prejuízo ao seu atendimento, uma vez que as coletas não eram feitas apenas em pacientes selecionados. As amostras foram armazenadas na soroteca do estudo da coorte, não acarretando gastos adicionais aos pacientes.

Os dados foram coletados dos prontuários, os quais eram preenchidos durante as consultas, também não havendo necessidade de deslocamento do paciente, nem gastos adicionais. Como as coletas já faziam parte da rotina, também não foi realizada nenhuma punção com finalidade única de obter resultados para essa pesquisa.

A análise dos dados foi feita de forma sigilosa, sem comprometimento da identidade do paciente e sem divulgação informações e imagens. Todos os participantes tiveram o TCLE assinado por seu responsável legal no momento da entrada no estudo

principal e também receberam uma cópia do termo assinada pelos pesquisadores. O TCLE assinado pelos responsáveis encontra-se guardado com o responsável pelo projeto principal.

7. RESULTADOS

Foram avaliados 290 pacientes incluídos no banco de dados da pesquisa. Desses pacientes 61 tinham RT-qPCR positivo em algum material biológico colhido ao nascimento (sangue, urina ou líquido). Dos 61 pacientes com confirmação de infecção laboratorial na criança (RT-qPCR +) - independente da presença de sintomas - 6 não tinham resultado de IgM e 2 pacientes as mães não tiveram sintomas. Um não tinha dados no prontuário. Após a aplicação dos critérios de exclusão, 52 pacientes foram incluídos nesse estudo (Figura 3).

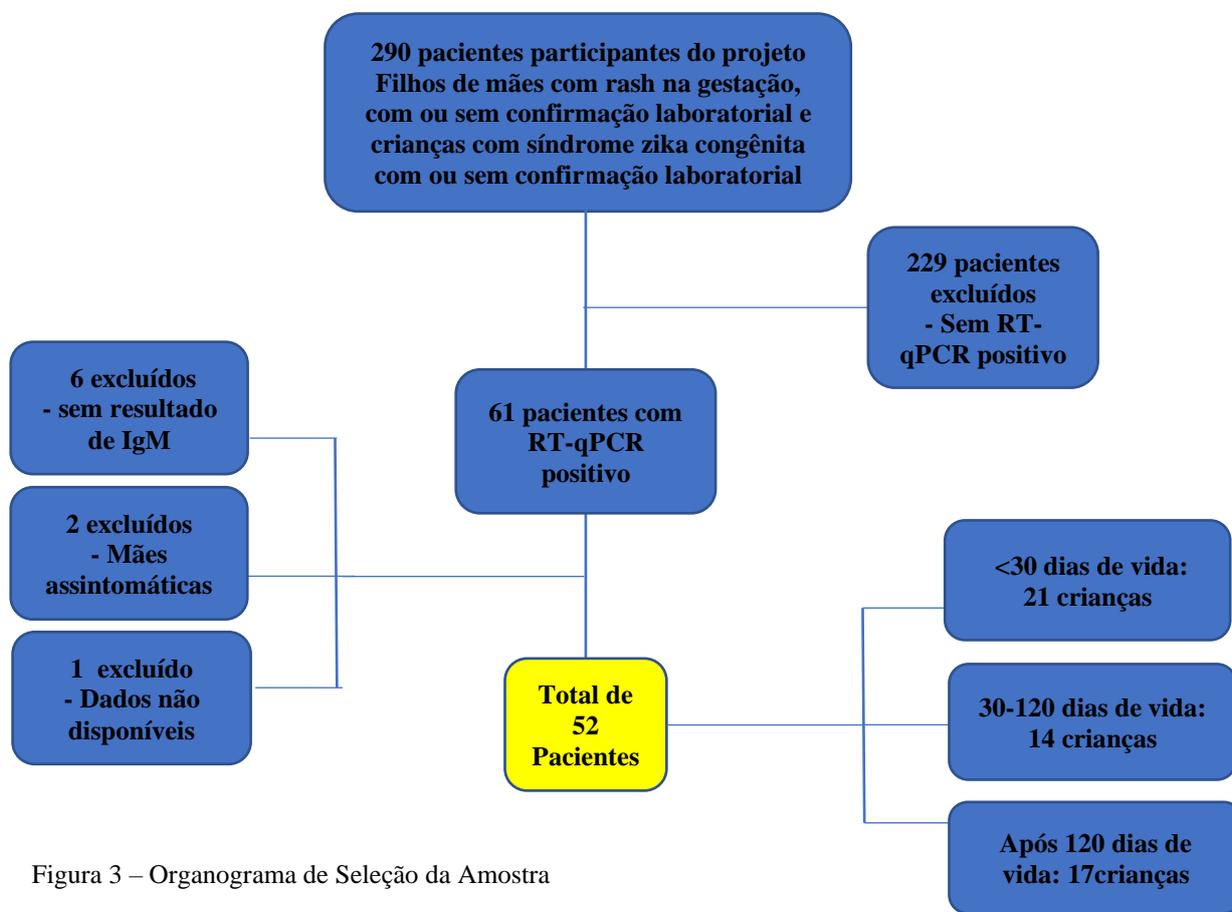


Figura 3 – Organograma de Seleção da Amostra

Dos 52 pacientes, 21 (40,4%) tiveram amostra de sangue colhida nos primeiros 29 dias de vida (IgM <30 dias), 14 (26,9%) entre 30 e 120 dias de vida (IgM 30-120 dias) e 17 (32,7%) após 120 dias de vida (IgM>120 dias).

O resultado da sorologia foi positivo em 15 (71,4%) dos 21 pacientes do grupo IgM <30 dias, 6 (42,9%) dos 14 pacientes do grupo IgM 30-120 dias e em 8 (47,0%) dos 17 pacientes do grupo IgM >120 dias. No total foram 29 resultados positivos (55,8%) entre os 52 pacientes com amostras colhidas.

Em relação às características da população estudada não foram encontradas diferenças significativas entre sexo, alterações clínicas como microcefalia, alterações oftalmológicas e teste de desenvolvimento de Bayley III e o resultado da sorologia IgM na primeira amostra colhida (Tabela 1). Foi observada diferença em relação ao período gestacional no qual ocorreu o rash e o resultado da sorologia IgM, sendo a maioria dos resultados positivos do MAC-ELISA para zika observados em pacientes cuja infecção materna ocorreu no primeiro trimestre no grupo IgM <30 dias (valor de $p = 0,002$). Nos grupos IgM 30-120 dias e IgM >120 dias também foi maior o percentual de pacientes com resultado positivo de IgM, porém não houve significância estatística.

Tabela 1: Descrição da amostra

		IgM <30 dias			IgM 30-120 dias			IgM >120 dias			
		Positivo	Negativo	pvalor	Positivo	Negativo	pvalor	Positivo	Negativo	pvalor	
Sexo	Fem	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0,633	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0,471	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,335	30 (57,7%)
	Masc	7 (70%)	3 (30%)		4 (50%)	4 (50%)		1 (25%)	3 (75%)		22 (42,3%)
	total	15	6		6	8		8	9		52
Infeção Materna	1º tri	12 (100%)	0	0,002	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,054	6 (66,7%)	3 (33,3%)	0,164	27 (51,9%)
	2º tri	1 (20%)	4 (80%)		0	5 (100%)		2 (33,3%)	4 (66,7%)		16 (30,8%)
	3º tri	2 (50%)	2 (50%)		2 (66,7%)	1 (33,3%)		0	2 (100%)		9 (17,3%)
	total	15	6		6	8		8	9		52
SZC	NSZC	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,032	5 (50%)	5 (50%)	0,406	4 (50%)	4 (50%)	0,601	31 (59,6%)
	SZC	8 (100%)	0		1 (25%)	3 (75%)		4 (44,4%)	5 (55,6%)		21 (40,4%)
	total	15	6		6	8		8	9		52
Microcefalia	Sim	4 (100%)	0	0,228	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,615	4 (50%)	4 (50%)	0,601	15 (28,9%)
	Não	11 (64,7%)	6 (35,3%)		5 (45,5%)	6 (54,5%)		4(44,4%)	5 (55,6%)		37 (71,1%)
	total	15	6		6	8		8	9		52
Alterações oftalmológicas	Sim	4 (100%)	0	0,228	0	0	N/A	4 (50%)	4 (50%)	0,601	15 (28,9%)
	Não	11 (64,7%)	6 (35,3%)		6 (42,9%)	8 (57,1%)		4 (44,4%)	5 (55,6%)		37 (71,1%)
	total	15	6		6	8		8	9		52
Alterações Neurológicas	sim	9 (100%)	0	0,017	2 (50%)	2 (50%)	0,594	4 (44,4%)	5 (55,6%)	0,601	30 (57,7%)
	não	6 (50%)	6 (50%)		4 (40%)	6 (40%)		4 (50%)	4 (50%)		22 (42,3%)
	total	15	6		6	8		8	9		52
Bayley 1	alterado	1 (100%)	0	0,6	1 (100%)	0	0,5	0	1 (100%)	0,571	3 (11,1%)
	normal	5 (55,6%)	4 (44,4%)		4 (44,4%)	5 (55,6%)		3 (50%)	3 (50%)		24 (88,9%)
	total	6	4		5	5		3	4		27
Bayley 2	alterado	3 (42,9%)	4 (57,1%)	0,167	3 (75%)	1 (25%)	0,167	0	1 (100%)	0,571	14 (53,9%)
	normal	3 (100%)	0		1 (20%)	4 (80%)		3 (50%)	3 (50%)		12 (46,1%)
	total	8	4		4	5		3	4		26

Quanto à classificação em SZC e NSC pudemos observar que 8 (100%) dos pacientes com SZC, cujas amostras foram colhidas nos primeiros 29 dias de vida, apresentaram IgM positiva para zika (valor de $p=0,032$). Após esse período de coleta não houve associação entre SZC e NSZC (valor de $p=0,406$ para IgM 30-120 e 0,601 para IgM >120).

Em relação às alterações neurológicas, observamos que 9 (100%) dos pacientes do grupo IgM <30 dias, tiveram sorologia IgM positiva para Zika (valor de $p=0,017$). Nos grupos com coleta mais tardia não pudemos observar esse dado.

Ao observarmos o teste de desenvolvimento Bayley III, o resultado demonstra um aumento no número de pacientes com alterações detectadas pelo segundo teste quando comparado ao primeiro. Porém não verificamos associação entre o resultado da sorologia IgM e o resultado do Bayley III nem no primeiro, nem no segundo teste realizados.

Dos 52 pacientes, 32 tinham mais de uma amostra colhida em tempos diferentes. Entre os pacientes com a primeira amostra positiva (total 17 pacientes), em 4 ainda foi possível detectar IgM positivo na coleta seguinte. O período entre a primeira amostra positiva e a segunda variou entre 23-357 dias, com média de 194,5 dias, mediana de 199 dias, desvio padrão (DP) de 180 dias. Todos os quatro casos são de mães com infecção no primeiro trimestre de gestação, sendo três pacientes diagnosticados com SZC e um NSZC. O maior período de detecção de IgM positiva foi de 551 dias.

Treze pacientes eram positivos na primeira coleta e negativos no segundo momento. O período entre a primeira e a segunda coletas variou entre 84-434 dias, com média de 204,8 dias, com mediana de 144 dias (DP=117,5 dias). Entre esses pacientes, 6 tiveram uma terceira amostra colhida e 2 uma quarta amostra. Dois pacientes voltaram a apresentar sorologia positiva após terem um resultado negativo. Não foi relatada a presença de sintomas de Zika nesses pacientes em nenhum momento do acompanhamento, nem repetido o RT-qPCR. Desses dois pacientes um era SZC e um NSC sendo a infecção materna no primeiro e no terceiro trimestre respectivamente.

Dos 15 pacientes que tiveram resultado negativo na primeira coleta, 4 tiveram resultado positivo para IgM na segunda coleta. O período entre a primeira e a segunda coleta variou entre 84 e 320 dias, com média de 157 dias, mediana de 112 dias (DP=110,8 dias). Desses 4 pacientes, 3 tiveram uma terceira amostra colhida, sendo todas negativas. O período de negatificação da IgM entre a segunda e a terceira amostra foi de 168 a 364

dias, com média de 238 dias, mediana de 183 dias (DP 109 dias). Dos 4 pacientes que eram inicialmente negativos e apresentaram resultado sorológico positivo na segunda coleta, dois tiveram infecção materna diagnosticada no segundo trimestre gestacional, um no primeiro trimestre e um no terceiro trimestre. Entre os pacientes cuja a mãe teve infecção no segundo trimestre um era SZC e um NSC. O paciente cuja mãe teve infecção no primeiro trimestre foi classificado com SZC e o do terceiro com NSZC.

AMOSTRAS SERIADAS

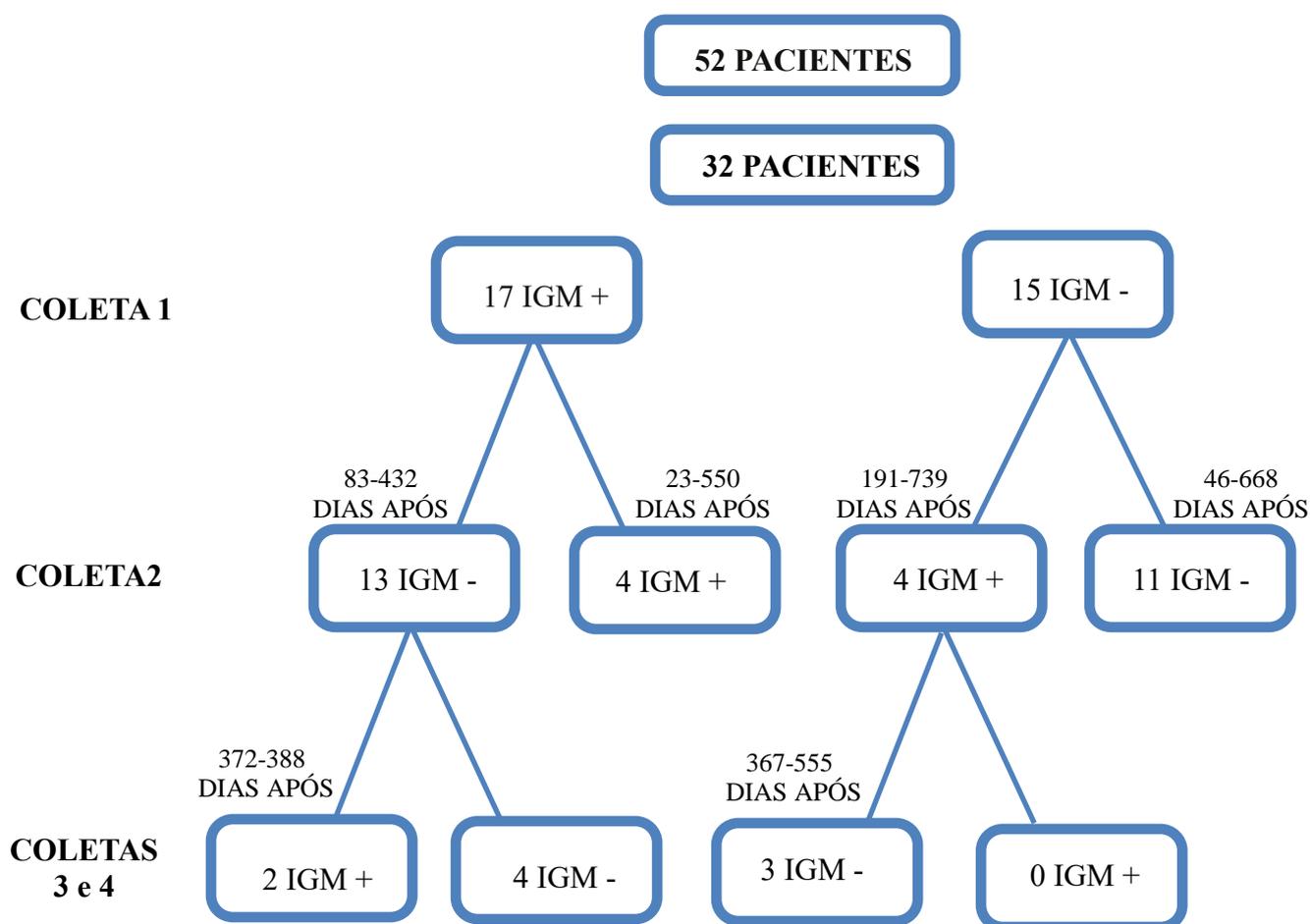


Figura 4: Resultado das Amostras seriadas

8. DISCUSSÃO

O nosso estudo descreveu o papel da sorologia de IgM nos casos clínicos de crianças com RT-qPCR positivo, ou seja, com comprovação de infecção congênita pelo vírus Zika. Ao considerarmos o breve período de detecção do RT-qPCR viral descrito pela literatura em adultos⁴⁴, podemos observar que amostras provenientes de crianças infectadas durante a gestação, apresentam um período de viremia acima do esperado, pois 51,9% dos pacientes foram infectados no primeiro trimestre gestacional, 30,7% no segundo trimestre e 17,3% no terceiro. Não sabemos se a infecção em um período precoce pode resultar em uma inabilidade do sistema imunológico em responder ao vírus, o que poderia ser a causa dessa viremia prolongada.

No entanto, alguns autores também descrevem períodos prolongados em uma parcela minoritária de pacientes previamente hígidos com Zika adquirida¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, sendo descrito períodos de até 100 dias em gestantes. Esse mecanismo ainda não é completamente elucidado, porém algumas hipóteses são propostas, tais como a da atuação da placenta e do feto como reservatório viral¹⁰⁸⁻¹¹⁰ e das alterações do sistema imunológico durante a gestação^{111,112}.

A presença de IgM positiva no nosso estudo foi maior nos pacientes infectados no primeiro trimestre (75,0%), seguida por 10,3% e 13,8% no segundo e terceiro trimestres respectivamente. Os melhores resultados da sorologia IgM foram descritos nos pacientes infectados no primeiro trimestre, que tiveram a amostra colhida nos primeiros 29 dias de vida (grupo IgM<30 dias), sendo 100% das amostras positivas para IgM. Podemos observar que quanto mais precoce for a coleta, assim como é orientado pelo CDC, melhor é a sensibilidade do exame. Observamos um decréscimo na positividade do exame conforme o período de coleta: no grupo IgM <30 dias 55,2% pacientes tiveram resultados de IgM positivos, no grupo IgM 30-120 dias 20,7% dos pacientes tiveram resultados de

IgM positivos e no grupo IgM >120 dias 24,1% das pacientes tiveram resultados de IgM positivos.

De acordo com a literatura a IgM é detectável por volta do 4º dia de doença até 12 semanas⁴⁴. No entanto, como a coleta das amostras para sorologia ocorreu apenas após o nascimento, podemos concluir que para o grupo infectado no primeiro trimestre houve um período mínimo de tempo entre a infecção materna e a coleta de aproximadamente 2 trimestres (180 dias). Mesmo sabendo da impossibilidade de definir o momento exato da infecção fetal, a mesma deve ocorrer logo após a materna, sugerindo períodos maiores de detecção de IgM em crianças infectadas congenitamente quando comparados aos anteriormente relatados. Estudos que demonstraram alterações ultrassonográficas antes de 20 semanas gestacionais compatíveis com síndrome de Zika congênita alguns dos pacientes infectados no primeiro trimestre, indicam proximidade com a infecção materna^{10,113}.

Na população estudada, 21 pacientes tinham síndrome de Zika congênita, sendo 17 deles infectados no primeiro trimestre e 4 no segundo, o que corrobora com os dados da literatura^{6,12,13,25,84,114}. Desses 21 pacientes, 13 tiveram IgM positiva no primeiro exame após o nascimento, sendo todos do primeiro trimestre. Uma vez que nesse período gestacional o sistema imunológico ainda está em desenvolvimento, tem-se também a possibilidade da incapacidade de resposta imune fetal no momento inicial da infecção se traduzir em uma resposta mais tardia de IgM, a qual não se detecta no período neonatal¹¹⁵.

Assim como na Literatura, verificamos que coletas mais tardias tiveram menor positividade, indicando a necessidade de uma abordagem precoce quando houver suspeita de infecção congênita²⁹.

O exame também não mostrou correlação com alterações clínicas, indicando que todos os pacientes suspeitos devem ser clinicamente investigados independente do resultado da sorologia. Inclusive alterações tardias no teste de desenvolvimento de Bayley não tiveram correlação com os resultados sorológicos, indicando que esse acompanhamento deve ser mantido a longo prazo.

Houve associação entre os resultados das sorologias em pacientes com SZC e alterações neurológicas e pacientes NSZC sem alterações neurológicas, principalmente quando a coleta foi feita nos primeiros 29 dias de vida. Diante de um paciente com alterações neurológicas ou características de síndrome zika congênita, a coleta precoce da sorologia pode ser útil para a confirmação do diagnóstico, permitindo o manejo clínico adequado. Diferentemente de outras infecções congênicas, na SZC devemos investigar alterações urodinâmicas, o que não ocorre na rotina das outras TORCHS. Além disso, a confirmação do diagnóstico pode proporcionar a família a busca por tratamentos específicos que venham a ser desenvolvidos, busca por conhecimento em relação àquela infecção específica, bem como a inserção de grupos de apoio, os quais em geral distinguem o tipo de patologia do paciente.

Como não há dados sobre o período de detecção de IgM para Zika em pacientes com infecção congênita, também devemos levar em consideração a possibilidade de o momento de maior titulação desse anticorpo seja mais tardio em relação à infecção adquirida, predominando assim os resultados positivos nas infecções mais antigas.

Em relação aos pacientes com mais de uma amostra coletada, não podemos afirmar persistência durante o período entre as coletas. No entanto, sabendo que todos os pacientes tiveram infecção congênita, podemos supor a possibilidade de reinfecção ou reativação viral. Uma limitação à essa suposição é a possibilidade de reação cruzada com

outros flavivírus aos quais os pacientes estariam expostos após o nascimento. Coletas tardias após o nascimento devem ser cautelosamente analisadas devido a possibilidade de infecção adquirida por outros flavivírus e à imunização contra febre amarela^{33,116}. Dos 4 pacientes que apresentaram IgM positiva em mais de uma amostra, nenhum havia recebido a vacina, nem apresentado sintomas de Zika ou de outra arbovirose.

Embora não possamos confirmar a hipótese de persistência dos anticorpos IgM nesses pacientes, um estudo que dosou o IgM, até 19 meses após a infecção por zika em 62 pacientes, verificou que 75% dos participantes ainda eram positivos entre 12-19 meses após os sintomas, 19% tiveram resultado equivocado e apenas 8% foram negativos¹¹⁷. No nosso estudo, embora não tenha sido o objetivo, tivemos amostras pareadas da maioria dos pacientes. Das 17 amostras positivas que foram comparadas a uma segunda amostra coletada posteriormente, 23,5% mantiveram-se positivas. Pudemos observar um período de até 357 dias entre uma coleta e outra, assim como Griffin e colaboradores encontraram para pacientes com infecção adquirida pela Zika¹¹⁷.

Esses dados foram consistentes com outras infecções por flavivírus, como Febre do Oeste do Nilo e Febre amarela. Em estudos que dosaram IgM, a febre do Oeste do Nilo e após vacinação contra febre amarela, detectaram IgM positiva após 500 dias de doença e 3-4 anos após a vacinação^{118,119}.

Tais estudos apontam para uma possível permanência de anticorpos da classe IgM por períodos prolongados. Para a investigação da infecção congênita, esse dado encoraja a coleta da IgM, mesmo após um período prolongado entre o nascimento e a infecção materna. No entanto, em relação ao diagnóstico materno no período gestacional, essa informação pode apontar para a possibilidade de infecção anterior ao período da gravidez, o que não ajudaria ao diagnóstico de infecção materna no momento da gestação.

O PRNT não foi realizado em nenhum paciente do estudo para confirmação do IgM, pois além de não dispormos do teste, todos os pacientes já tinham confirmação laboratorial com RT-qPCR.

Tivemos 2 pacientes com 3 amostras colhidas sendo os resultados respectivamente positivo, negativo e positivo. Não foram descritos novos sintomas, nem colhido novo RT-qPCR. Pouco se sabe sobre reinfecção ou reativação, mas, assim como em outras infecções por arbovírus, acredita-se que os anticorpos induzam resposta humoral com longa duração, protegendo contra reinfecção¹²⁰. Dessa forma não podemos excluir a possibilidade de uma nova infecção, de uma reativação ou de um possível resultado falso negativo para as amostras entre as positivas.

9. CONCLUSÃO

A coleta deve ocorrer o mais próximo possível ao nascimento, pois observamos que coletas tardias tiveram menos resultados positivos. Além disso, por se tratar de uma doença transmitida por um vetor, do qual há limitações para a proteção de lactentes, quanto mais tarde for a coleta, maior a chance de infecção adquirida pelo zika ou outro flavivírus.

Nos casos de SZC e alterações neurológicas, o resultado da sorologia IgM foi positivo na maioria dos casos quando colhido nos primeiros 29 dias de vida. Diante de crianças com alterações neurológicas ou com características clínicas de SZC, sem relato de infecção materna durante a gestação, a coleta da sorologia deve ser pensada como uma ferramenta diagnóstica. Assim poderemos diferenciar a SZC de outras infecções congênicas, proporcionando o manejo adequado desses pacientes.

Concluimos também que testes sorológicos negativos não afastam o diagnóstico de infecção congênita e que, mesmo em pacientes assintomáticos, com o primeiro teste de desenvolvimento normal, detectamos alterações de desenvolvimento tardias. Isso atenta para a necessidade de seguimento clínico desses pacientes, independentemente dos resultados da sorologia.

Verificamos persistência de amostras positivas até 551 dias de vida, porém são necessários estudos com amostras pareadas para confirmar a persistência desses resultados, reinfecção ou reativação viral.

REFERÊNCIAS

1. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;47(1):6–7.
2. COES - MICROCEFALIAS CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE MICROCEFALIAS. Situação epidemiológica atual. [cited 2018 Mar 8]; Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/24/COES-Microcefalias---Informe-Epidemiol--gico---SE-46---24nov2015.pdf>
3. Cerbino-Neto J, Mesquita EC, Souza TML, Parreira V, Wittlin BB, Durovni B, et al. Clinical Manifestations of Zika Virus Infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1318–20.
4. Atif M, Azeem M, Sarwar MR, Bashir A. Zika virus disease: a current review of the literature. 2016;44(6):695-705.
5. Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med.* 2016;374(7):601–4.
6. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, Horovitz DDG, 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.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo de atenção à saúde e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus zika. 2016. [cited 2018 Mar 8]; Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_resposta_microcefalia_relacionada_infeccao_virus_zika.pdf
8. 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.
9. Nicastrì E, Castillettì C, Liuzzi G, Iannetta M, Capobianchi MR, Ippolito G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro Surveill.* 2016;21(32):30314.
10. Chimelli L, Moura Pone S, Avvad-Portari E, Farias Meira Vasconcelos Z, Araújo Zin A, Prado Cunha D, et al. Persistence of Zika Virus After Birth: Clinical,

- Virological, Neuroimaging, and Neuropathological Documentation in a 5-Month Infant With Congenital Zika Syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018;77(3):193–8.
11. Driggers RW, Ho CY, Korhonen EM, Kuivanen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *New Engl J Med*. 2016;374(22):2142-51.
 12. Pomar L, Malinger G, Benoist G, Carles G, Ville Y, Rousset D, et al. Association between Zika virus and fetopathy: a prospective cohort study in French Guiana. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2019 Mar 17];49(6):729–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28078779>
 13. Halai U-A, Nielsen-Saines K, Moreira ML, de Sequeira PC, Junior JPP, de Araujo Zin A, et al. Maternal Zika Virus Disease Severity, Virus Load, Prior Dengue Antibodies, and Their Relationship to Birth Outcomes. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2017 Sep 15 [cited 2019 Mar 17];65(6):877–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28535184>
 14. Haby MM, Pinart M, Elias V, Reveiz L. Systematic reviews Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bull World Heal Organ* [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 11];96:402–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.17.201541>
 15. Gallian P, Cabié A, Richard P, Paturel L, Charrel RN, Pastorino B, et al. Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique. *Blood*. 2017;129(2):263-266.
 16. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Jun 11 [cited 2018 Mar 8];360(24):2536–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034>
 17. Hayes EB. Zika Virus Outside Africa. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2009 Sep [cited 2018 Mar 8];15(9):1347–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788800>
 18. Zin AA, Tsui I, Rossetto J, Vasconcelos Z, Adachi K, Valderramos S, et al. Screening Criteria for Ophthalmic Manifestations of Congenital Zika Virus Infection. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2018 Mar 8];171(9):847–54. Available from:

- <http://archpedi.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamapediatrics.2017.1474>
19. Zancanelli AM. Infecção gestacional por Zika Vírus: desenvolvimento motor nos primeiros anos de vida, contexto ambiental e perfil epidemiológico [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico-Funcional, Universidade Federal de Juiz de Fora. Brasil. 2018 [cited 2019 Feb 14]; Available from: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/7234>
 20. Wilma Carvalho Neves Forte. Imunologia do Básico ao Aplicado. 3ª. Atheneu, editor. São Paulo; 2015. 50–61 p.
 21. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY. Infecções congênitas e perinatais. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 1999 [cited 2018 Mar 8];75(1). Available from: <http://www.jped.com.br/conteudo/99-75-S15/port.pdf>
 22. Cordeiro MT, Pena LJ, Brito CA, Gil LH, Marques ET. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet* [Internet]. 2016 Apr 30 [cited 2018 Mar 8];387(10030):1811–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27103126>
 23. Carroll ID, Toovey S, Van Gompel A. Dengue fever and pregnancy - a review and comment. *Travel Med Infect Dis* [Internet]. 2007 May [cited 2018 Mar 8];5(3):183–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893906001281>
 24. 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. 2017 [cited 2019 Apr 14];114(31). Available from: <https://www.pnas.org/content/pnas/114/31/8384.full.pdf>
 25. 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. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Dec 15 [cited 2018 Mar 8];375(24):2321–34. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602412>
 26. van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, Barkovich AJ, Júnior H van der L, Filho ELR, et al. Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth — Brazil.

- MMWR Morb Mortal Wkly Rep [Internet]. 2016 Dec 2 [cited 2018 Mar 20];65(47):1343–8. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6547e2.htm>
27. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V, Fonseca EB da, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2018 Mar 8];171(3):288–95. Available from: <http://archpedi.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamapediatrics.2016.3982>
28. Costa Monteiro LM, Cruz GN de O, Fontes JM, Saad Salles TRD, Boechat MCB, Monteiro AC, et al. Neurogenic bladder findings in patients with Congenital Zika Syndrome: A novel condition. *PLoS One* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2018 Mar 20];13(3):e0193514. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0193514>
29. Adebajo T, Godfred-Cato S, Viens L, Fischer M, Staples JE, Kuhnert-Tallman W, et al. Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection — United States, October 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2017 Oct 20 [cited 2019 Jan 20];66(41):1089–99. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6641a1.htm>
30. Shan C, Xie X, Ren P, Loeffelholz MJ, Yang Y, Furuya A, et al. A Rapid Zika Diagnostic Assay to Measure Neutralizing Antibodies in Patients. *EBioMedicine* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2019 Apr 14];17:157–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396417300932>
31. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Mar 10 [cited 2018 Mar 8];374(10):951–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862926>
32. Amir J, Atias J, Linder N, Pardo J. Follow-up of infants with congenital cytomegalovirus and normal fetal imaging. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 2016 Sep [cited 2018 Mar 8];101(5):F428–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26782597>
33. Adebajo T, Godfred-Cato S, Viens L, Fischer M, Erin Staples J, Kuhnert-Tallman W, et al. Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection — United

- States, October 2017 [Internet]. 2006 [cited 2019 Mar 9]. Available from: https://www.cdc.gov/mmwr/cme/conted_info.html#weekly.
34. Charles Calisher BH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *J gen Virol* [Internet]. 1989 [cited 2018 Mar 21];70:37–43. Available from: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/70/1/JV0700010037.pdf?expires=1521678319&id=id&accname=guest&checksum=B2C91F7BC7684C2DAF5D8FA6DDBAA87C>
 35. MAC-ELISA para zika Centros de Controle e Prevenção de Doenças. [cited 2018 Mar 9]; Available from: http://portugues.cdc.gov/img/cdc/PT_49672.pdf
 36. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika Virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1952 Sep [cited 2018 Mar 8];46(5):509–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995440>
 37. Dick GW. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1952 Sep [cited 2018 Mar 8];46(5):521–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995441>
 38. MACNAMARA FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1954 Mar [cited 2018 Mar 8];48(2):139–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13157159>
 39. Simpson DI. ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1964 Jul [cited 2018 Mar 8];58:335–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14175744>
 40. Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 1975 Mar [cited 2018 Mar 8];69(1):49–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1124969>
 41. Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg (Lond)* [Internet]. 1979 Oct [cited 2018 Mar 8];83(2):213–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/489960>

42. Filipe AR, Martins CM, Rocha H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Arch Gesamte Virusforsch* [Internet]. 1973 [cited 2018 Mar 8];43(4):315–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4799154>
43. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1981 [cited 2018 Mar 8];75(3):389–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6275577>
44. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2008 Aug [cited 2018 Mar 8];14(8):1232–9. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article.htm
45. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 Mar 8];20(6):1084–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856001>
46. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Mar 8];21(10):1885–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401719>
47. Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2015 Jun 9 [cited 2018 Mar 8];110(4):569–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061233>
48. França GVA, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CMP, Carmo EH, Pedi VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* [Internet]. 2016 Aug 27 [cited 2017 May 25];388(10047):891–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27372398>
49. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2019 Mar 9];16(6):653–60. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108>

50. de Araújo 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* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Mar 8];16(12):1356–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916303188>
51. Souza WV de, Araújo TVB de, Albuquerque M de FPM, Braga MC, Ximenes RA de A, Miranda-Filho D de B, et al. Microcefalia no Estado de Pernambuco, Brasil: características epidemiológicas e avaliação da acurácia diagnóstica dos pontos de corte adotados para notificação de caso. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2016 [cited 2018 Mar 8];32(4). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2016000400801&lng=pt&tlng=pt
52. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* [Internet]. 2016 May 13 [cited 2019 Apr 14];352(6287):816–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27064148>
53. Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2017 Feb 8 [cited 2018 Mar 8];21(2):134–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28182948>
54. Sacramento CQ, de Melo GR, de Freitas CS, Rocha N, Hoelz LVB, Miranda M, et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Jan 18 [cited 2018 Mar 8];7:40920. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28098253>
55. Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K, Hai R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017 Mar 22 [cited 2018 Mar 8];6(3):e13–e13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28325921>
56. Kuno G, Chang G-JJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol* [Internet]. 2007 Apr 3 [cited 2018 Mar 8];152(4):687–96. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-006-0903-z>

57. Chambers TM, Monath TP. The flaviviruses : structure, replication and evolution [Internet]. Elsevier; 2003 [cited 2019 Jan 27]. 369 p. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Xgfrv4aksVUC&oi=fnd&pg=PA23&dq=molecular+biology+of+flaviviruses+lindenbach&ots=iBB6M9fl7N&sig=IEzvWqMh84qSH7jNBvd31WTQfMg#v=onepage&q&f=false>
58. de Vasconcelos ZFM, Azevedo RC, Thompson N, Gomes L, Guida L, Moreira MEL. Challenges for molecular and serological ZIKV infection confirmation. *Child's Nerv Syst.* 2018;34(1)79-84.
59. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2019 Mar 9];89(17):8880–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085147>
60. Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O'Neal JT, et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016 Jul 13 [cited 2019 Mar 9];20(1):83–90. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312816302116>
61. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3 HHS Public Access. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 14];19(2):258–65.
62. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2016 May 5 [cited 2019 Mar 9];18(5):587–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26952870>
63. Bhattacharyya S, Zagórska A, Lew ED, Shrestha B, Rothlin C V, Naughton J, et al. Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2013 Aug 14 [cited 2019 Apr 14];14(2):136–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23954153>
64. MacMicking JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012 Apr 25 [cited 2019 Apr 14];12(5):367–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531325>

65. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling HHS Public Access. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 14];19(6):882–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4900918/pdf/nihms-789378.pdf>
66. Ministério da Saúde investiga aumento de casos de microcefalia em Pernambuco [Internet]. [cited 2019 Mar 9]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/20629-ministerio-da-saude-investiga-aumento-de-casos-de-microcefalia-em-pernambuco>
67. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects-Reviewing the Evidence for Causality [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 9]. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMsr1604338>
68. 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* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2019 Mar 9];134(5):529. Available from: <http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaophthalmol.2016.0267>
69. van der Linden V, Filho ELR, Lins OG, van der Linden A, Aragão M de FVV, Brainer-Lima AM, et al. Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. *BMJ* [Internet]. 2016 Aug 9 [cited 2019 Mar 9];354:i3899. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27509902>
70. Miranda-Filho D de B, Martelli CMT, Ximenes RA de A, Araújo TVB, Rocha MAW, Ramos RCF, et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. *Am J Public Health* [Internet]. 2016 Apr [cited 2018 Mar 8];106(4):598–600. Available from: <http://ajph.aphapublications.org/doi/10.2105/AJPH.2016.303115>
71. Dain D, Horovitz G, Vinicius Da M, Pone S, Moura Pone S, Dias TR, et al. Cranial bone collapse in microcephalic infants prenatally exposed to Zika virus infection. 2016 [cited 2019 Mar 9]; Available from: <http://combateaesdes.saude.gov.br/images/pdf/>

72. del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DDG, Pessoa ALS, França GVA, et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2019 Mar 9];173(4):841–57. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.38170>
73. Cavalheiro S, Lopez A, Serra S, Da Cunha A, Devanir M, Da Costa S, et al. Microcephaly and Zika virus: neonatal neuroradiological aspects. [cited 2019 Mar 9]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4882355/pdf/381_2016_Article_3074.pdf
74. Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Guillemette-Artur P, Lastère S, Bost-Bezeaud F, Marcelis L, et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Eurosurveillance* [Internet]. 2016 Mar 31 [cited 2019 Mar 9];21(13):30181. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21429>
75. Hazin NA, Poretti A, Di Cavalcanti Souza Cruz D, Tenorio M, van der Linden A, Pena LJ, et al. Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. 2016 [cited 2019 Mar 9];374(22):2193-5. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc1603617>
76. Soares De Oliveira-Szejnfeld P, Levine D, Suely De Oliveira Melo A, Maria M, Amorim R, Gean A, et al. Congenital Brain Abnormalities and Zika Virus: What the Radiologist Can Expect to See Prenatally and Postnatally. *Radiology* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 9];281(1):203-18. Available from: <https://pubs.rsna.org/doi/pdf/10.1148/radiol.2016161584>
77. Ventura C V, Maia M, Bravo-Filho V, Góis AL, Belfort R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 9];387(10015):228.
78. Augusto Moura da Silva A, Sousa Santos Ganz J, da Silva Sousa P, Juliana Rodovalho Doriqui M, Rodrigues Costa Ribeiro M, dos Remédios Freitas Carvalho Branco M, et al. Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. [cited 2019 Mar 9]; Available from: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2211.160956>

79. Souza ASR, Cordeiro MT, Meneses J do A, Honorato E, Araujo Júnior E, Castanha PM da S, et al. Clinical and laboratory diagnosis of congenital Zika virus syndrome and diaphragmatic unilateral palsy: case report. *Rev Bras Saúde Matern Infant* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Mar 9];16(4):467–73. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292016000400467&lng=en&tlng=en
80. Meneses J do A, Ishigami AC, de Mello LM, de Albuquerque LL, de Brito CAA, Cordeiro MT, et al. Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence From 87 Confirmed Cases. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2017 May 15 [cited 2019 Mar 9];64(10):1302–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cix166>
81. Karwowski MP, Nelson JM, Staples JE, Fischer M, Fleming-Dutra KE, Villanueva J, et al. Zika Virus Disease: A CDC Update for Pediatric Health Care Providers. *Pediatrics* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2019 Mar 10];137(5):e20160621. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27009036>
82. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill* [Internet]. 2014 Mar 6 [cited 2018 Mar 8];19(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626205>
83. Klase ZA, Khakhina S, De Bernardi Schneider A, Callahan M V, Glasspool-Malone J, Malone R. Zika Fetal Neuropathogenesis: Etiology of a Viral Syndrome. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 [cited 2019 Mar 9];10(8):e0004877 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4999274/pdf/pntd.0004877.pdf>
84. Ventura C V., Maia M, Ventura B V., Linden V Van Der, Araújo EB, Ramos RC, et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq Bras Oftalmol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 9];79(1):1–3. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0004-2749.20160002>
85. 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* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 10];134(5):529-535. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5444996/pdf/nihms858515.pdf>
86. Chimelli L, Melo ASO, Avvad-Portari E, Wiley CA, Camacho AHS, Lopes VS, et

- al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2017 Jun 22 [cited 2019 Mar 9];133(6):983–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28332092>
87. Parrott J, Boyd RN, Dobson F, Lancaster A, Love S, Oates J, et al. Hip Displacement in Spastic Cerebral Palsy: Repeatability of Radiologic Measurement. *J Pediatr Orthop* [Internet]. 2002 Sep [cited 2019 Mar 10];22(5):660–7. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=01241398-200209000-00017>
88. Orofino DHG, Passos SRL, de Oliveira RVC, Farias CVB, Leite M de FMP, Pone SM, et al. Cardiac findings in infants with in utero exposure to Zika virus- a cross sectional study. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 10];12(3):e0006362. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29579059>
89. Musso D, Roche C, Nhan T-X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol* [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 11];68:53–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021>
90. Gourinat A-C, O’connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine. [cited 2019 Mar 11]; Available from: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140894>
91. Campos R de M, Cirne-Santos C, Meira GLS, Santos LLR, de Meneses MD, Friedrich J, et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *J Clin Virol* [Internet]. 2016 Apr [cited 2018 Mar 9];77:69–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653216300014>
92. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Preliminary Report. *New Engl J Med* [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 8];379(13). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29503984>
93. Slavov SN, Otaguiri KK, Kashima S, Covas DT, Slavov SN, Otaguiri KK, et al. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic.

- Brazilian J Med Biol Res [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 11];49(5):e5420. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2016000500201&lng=en&tlng=em
94. Drebot M, MacDonald J, Lindsay R, Pabbaraju K, Tellier R, Fonseca K, et al. First Case of Zika Virus Infection in a Returning Canadian Traveler. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2014 Nov 5 [cited 2019 Mar 11];91(5):1035–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25294619>
95. Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Lavezzo E, et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Eurosurveillance* [Internet]. 2016 Mar 10 [cited 2019 Mar 11];21(10):30159. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26987769>
96. 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 Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Apr 10 [cited 2019 Mar 11];11(4):e0005528. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28394887>
97. Prisant N, Bujan L, Benichou H, Hayot P-H, Pavili L, Lurel S, et al. Zika virus in the female genital tract. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2019 Mar 11];16(9):1000–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27427201>
98. Chimelli L, Pone SM, Avvad-Portari E, Vasconcelos ZFM, Zin AA, Cunha DP, et al. Persistence of Zika virus after birth: Clinical, virological, neuroimaging, and neuropathological documentation in a 5-month infant with congenital Zika syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018;77(3):193-198.
99. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids-Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2018 [cited 2019 Mar 11];379(13):1234-1243 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5831142/pdf/nihms941176.pdf>
100. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª edição. Elsevier. Rio de Janeiro; 2005. 540–541 p.

101. Centers for Disease Control and Prevention. Types of Zika Virus Tests | Zika Virus [Internet]. [cited 2019 Apr 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/zika/laboratories/types-of-tests.html>
102. 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. 2017 [cited 2019 Jan 30];55(7):2127-2136. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM>
103. Safronetz D, Sloan A, Stein DR, Mendoza E, Barairo N, Ranadheera C, et al. Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017 Sep [cited 2019 Mar 11];23(9):1577-80. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/9/16-2043_article.htm
104. Premkumar L, Collins M, Graham S, Alice Liou G-J, Lopez CA, Jadi R, et al. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 30];56:1504-21. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM>
105. Centers for Disease Control and Prevention. Zika MAC-ELISA For Use Under an Emergency Use Authorization Only Instructions for Use [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 18]. Available from: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>
106. Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, Chapuy-Regaud S, Delobel P, Martin-Blondel G, et al. Zika Virus Infection and Prolonged Viremia in Whole-Blood Specimens. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017 May [cited 2018 Mar 9];23(5):863-5. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/5/16-1631_article.htm
107. Lozier MJ, Rosenberg ES, Doyle K, Adams L, Klein L, Muñoz-Jordan J, et al. Prolonged Detection of Zika Virus Nucleic Acid Among Symptomatic Pregnant Women: A Cohort Study. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2019 Mar 21];67(4):624-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29534160>
108. Meaney-Delman D, Oduyebo T, Polen KND, White JL, Bingham AM, Slavinski SA, et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 Mar 21];128(4):724-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27479770>

109. Bhatnagar J, Rabeneck DB, Martines RB, Reagan-Steiner S, Ermias Y, Estetter LB, et al. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerg Infect Dis*. 2017 [cited 2019 Mar 21];23(3):405-414. Available from: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.161499>
110. Aagaard KM, Lahon A, Suter MA, Arya RP, Seferovic MD, Vogt MB, et al. Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 27 [cited 2019 Mar 21];7(1):41389. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28128342>
111. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2019 Mar 21];63(6):425–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20367629>
112. Granovsky MO, Minkoff HL, Tess BH, Waters D, Hatzakis A, Devoid DE, et al. Hepatitis C virus infection in the mothers and infants cohort study. *Pediatrics* [Internet]. 1998 Aug 1 [cited 2019 Mar 21];102(2 Pt 1):355–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9685438>
113. Villamil-Gómez WE, Guijarro E, Castellanos J, Rodríguez-Morales AJ. Congenital Zika syndrome with prolonged detection of Zika virus RNA. *J Clin Virol* [Internet]. 2017 Oct [cited 2019 Mar 11];95:52–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28866135>
114. Lima GP, Rozenbaum D, Pimentel C, Cristina A, Frota C, Vivacqua D, et al. Factors associated with the development of Congenital Zika Syndrome: a case-control study. [cited 2019 Apr 2];19(1):277. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3908-4>
115. Hayward AR. The human fetus and newborn: development of the immune response. *Birth Defects Orig Artic Ser* [Internet]. 1983 [cited 2019 Apr 3];19(3):289–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606446>
116. Landry ML, St. George K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2017 Jan [cited 2019 Feb 17];141(1):60–7. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2016-0406-AS>
117. Griffin I, Martin SW, Fischer M, Chambers T V, Kosoy O, Falise A, et al. Zika

- Virus IgM Detection and Neutralizing Antibody Profiles 12-19 Months after Illness Onset. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2019 Feb [cited 2019 Mar 22];25(2):299–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30666931>
118. Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, et al. Persistence of Virus-Reactive Serum Immunoglobulin M Antibody in Confirmed West Nile Virus Encephalitis Cases. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2003 Mar [cited 2019 Mar 22];9(3):376–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12643836>
119. Gibney KB, Kosoy OI, Fischer M, Edupuganti S, Lanciotti RS, Delorey MJ, et al. Detection of Anti-Yellow Fever Virus Immunoglobulin M Antibodies at 3–4 Years Following Yellow Fever Vaccination. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2012 Dec 5 [cited 2019 Mar 22];87(6):1112–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109371>
120. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *www.thelancet.com* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 21];390. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>

APÊNDICES

Apêndice 1: FICHA DE COLETA DE DADOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



IFF

INSTITUTO NACIONAL
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

EXPOSIÇÃO VERTICAL AO VÍRUS ZIKA

1. Identificação

Código: _____

Sexo: ()Masc ()Fem ()Indeterminado

Data Nascimento: ___/___/___ Local: _____

Entrada no Estudo: ___/___/___ ()gestação ()parto ()criança [Idade:___dias]

Classificação inicial: ()Sintomático ()Alteração laboratorial isolada ()Alteração
imagem isolada ()Exposto assintomático [()gestação ()periparto ()Leite Materno]

DN Mãe: ___/___/___ Idade mãe:___anos

Raça/Cor: ()Branca ()Preta ()Amarela ()Parda ()Indígena
(Etnia:_____) ()Ignorado

Escolaridade (maior nível completo): ()Sem escolaridade ()Fundamental I

()Fundamental II ()Médio ()Superior () Ignorado

Ocupação: _____

DN Pai: ___/___/___ Idade pai: _____anos

Endereço atual: Bairro:_____ Cidade:_____ UF:___ CEP _____

Tipo de residência: ()casa ()apartamento ()outro _____ Comunidade:

()não ()sim N° pessoas que moram na casa: _____

Renda familiar mensal: _____ reais

Auxílio governamental: () não ()sim, qual? ()BPC ()BF ()TFD ()Passe

()Outro:_____

Morou em outro endereço durante a gestação? ()Não ()Sim

Qual? _____

Viajou durante a gestação? ()Não ()Sim

Ida: ___/___/___ Volta: ___/___/___ País: _____ Estado: _____ Cidade: _____

Ida: ___/___/___ Volta: ___/___/___ País: _____ Estado: _____ Cidade: _____

2. História gestacional

Pré-natal? ()Não ()Sim Unidade de saúde que realizou pré-natal: _____ Município: _____

Número de consultas: 1º trim: _____ 2º trim: _____ 3º trim: _____ Total: _____

Data da primeira consulta: ___/___/___ Idade gestacional na 1ª consulta: _____ semanas

Peso no início da gestação (kg): _____ Peso no final (kg): _____

Altura (m): _____

Vacinas Maternas em dia: () não () sim () Ignorado

Vacina contra Febre Amarela: () Ignorado () não () sim

(Quando? ___/___/___ OU há ___ anos)

Vacinação na gestação?

Vacina	Nº doses	Data 1ª dose	Data 2ª dose	Data 3ª dose
()Influenza			NA	NA
()dT				NA
()DTPa				NA
()Hepatite B				

<input type="checkbox"/> Tríplice viral			NA	NA
---	--	--	----	----

Gestação planejada: não sim

Desenvolveu alguma complicação durante a gestação? Não Sim

Qual: ITU Anemia Diabetes gestacional HAS gestacional Pré-eclampsia

Placenta prévia Oligoidrâmnio Polidrâmnio Insuficiência do colo uterino

Hiperemese gravídica Anomalias anatômicas do útero Deslocamento de

placenta Crescimento intrauterino restrito Incisura Outras _____

Dengue anterior: não sim ignorado n° de vezes: _____ Quando: há ____ a

Chickugunya anterior: não sim ign N° de vezes: _____ Quando: há ____ a

Contato ou convívio com pessoas com quadro sugestivo de Zika/ Chikungunya/

dengue durante a gestação: não sim Período: _____

Diagnóstico laboratorial de alguma doença infecciosa? Não Sim, qual:

Toxoplasmose Rubéola Citomegalovírus Sífilis Herpes simples

Parvovírus HIV Dengue Chikungunya Zika vírus Outras.

Especificar: _____

Outras Infecções durante a gravidez não sim Período: _____

Febre > 38° sem rash não sim Período: _____

Teve contato com pesticidas? não sim, qual(is)? _____

Teve contato com agrotóxicos? não sim, qual(is)? _____

Teve contato com algum produto químico? não sim, qual(is)? _____

Realizou alguma Radiografia? não sim, (1° trim (2° trim (3° trim

Você fez uso de algum destes medicamentos?

Acido fólico: () não () sim, data início do tratamento: __/__/____

Ferro: () não () sim, data início do tratamento: __/__/____

Outros: () não () sim, quais?

Medicamento 1: _____ data do início: __/__/____

Medicamento 2: _____ data do início: __/__/____

Medicamento 3: _____ data do início: __/__/____

Teve manchas vermelhas durante a gestação? () não () sim Quantas vezes?_

1º episódio: Quando? () 1º. Trimestre () 2º. Trimestre () 3º. Trimestre

Data do início do exantema: __/__/____ Duração? _____d

Iniciou onde? () Cabeça/pescoço () Tronco () MMSS () MMII () todo corpo

Ela se espalhou? () Não () Sim, para onde? () Cabeça/pescoço () Tronco

() MMSS () MMII () Difuso por todo corpo

Teve algum dos seguintes sinais e sintomas? () Febre, temperatura máxima? _____°C

duração: _____d () Prurido () Tosse () Coriza () Cefaleia

() Mialgia () Artralgia, quanto tempo? _____d () Vômitos () Linfadenopatia

() Hiperemia conjuntival () Dor retroorbital () Outros: _____

Se teve outros sintomas, o rash surgiu: () Primeiro () Logo após () Dias após Teve

atendimento médico? () Não () Sim, qual diagnóstico? _____ Tomou

remédio? () Não () Sim, qual? _____

2º episódio: Quando? () 1º. Trimestre () 2º. Trimestre () 3º. Trimestre

Data do início do exantema: __/__/____ Duração? _____d

Iniciou onde? () Cabeça/pescoço () Tronco () MMSS () MMII () todo corpo

Ela se espalhou? () Não () Sim, para onde? () Cabeça/pescoço () Tronco

() MMSS () MMII () Difuso por todo corpo

Teve algum dos seguintes sinais e sintomas? ()Febre, temperatura máxima?_____°C

duração:____d ()Prurido ()Tosse ()Coriza ()Cefaleia

()Mialgia ()Artralgia, quanto tempo?_____d ()Vômitos ()Linfoadenopatia

()Hiperemia conjuntival ()Dor retroorbital ()Outros:_____

Se teve outros sintomas, o rash surgiu: ()Primeiro ()Logo após ()Dias após Teve

atendimento médico? ()Não ()Sim, qual diagnóstico? _____ Tomou

remédio? ()Não ()Sim, qual? _____

Hábitos durante a gestação

Álcool: Usou bebida alcoólica na gestação? ()Não ()Sim ()Até confirmar, _sem

Com que frequência usava álcool por semana? (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7ou+)

Quantas doses ou drinks você costumava tomar nesses dias? (1) (2) (3 ou mais)

Com que frequência tomava >3 doses ou drinks? ()Nunca ()mensalmente ou menos()

Mensalmente ()Semanalmente ()Diariamente ()Ign

Tabagismo: Em relação ao cigarro, você diria que:

()Nunca fumei ()Fumei no passado, mas na gestação não

()<10 cigarros por dia () 10 a 20 por dia () > 20 por dia ()Não sei

Se fumante, há quantos anos fuma diariamente? _____

Se ex-fumante, parou de fumar há quanto tempo? _____ ()d ()sem ()m ()a

Drogas ilícitas: Agora nós vamos falar sobre o uso de substâncias estimulantes ou calmantes. Alguma vez você usou?

()Maconha ()Cocaína cheirada ()Qualquer droga injetável ()Crack ou merla ()

Lança-perfume, loló, cola, éter, solventes, esmalte, tinta, clorofórmio ()LSD ()Ecstasy

()Anfetamina ou remédios para emagrecer

US obstétrica:

Data	Semana gestação	PC (cm)	Microcefalia	Calcificações	Ventriculo- megalia	Outros
			()sim ()não	()sim ()não	()sim ()não	
			()sim ()não	()sim ()não	()sim ()não	
			()sim ()não	()sim ()não	()sim ()não	
			()sim ()não	()sim ()não	()sim ()não	

Exames na gestação:

Exame	Data 1º trim	Resultado	Data 2ºtrim	Resultado	Data 3º trim	Resultado
Hemoglobina						
Hematócrito						
Glicose						
Anti-HIV						
Rubéola						
HBsAg						
Anti-HCV						
Toxoplasmose						
Sífilis(VDRL)						
CMV						
HSV						
Outros						

--	--	--	--	--	--	--

3. História Familiar

PC da mãe: _____ PC do pai: _____

Algum grau de parentesco? () Não () Sim, qual? _____

Você possui malformação congênita? () Não () Sim, qual(is)? _____ Alguém na família, sua ou do companheiro tem microcefalia? () Não () Sim

Você fazia uso de algum medicamento de uso contínuo? () Não () Sim, qual(is)? _____

Teve diagnóstico de alguma doença pré-existente? () Não () Sim, qual(is)?

() Diabetes () Outras doenças metabólicas () Hipertensão arterial sistêmica

() Cardiopatia crônica () Doença renal crônica () Pneumopatias crônicas

() Hemoglobinopatia () Câncer () Doença auto-imune () Doença neuroléptica

() Outras, especificar _____

Teve diagnóstico ou recebeu tratamento para alguma DST? () Não () Sim, qual(is)?

() HIV () Sífilis () Gonorreia () Clamídia () Hepatites B e/ou C

() Herpes simples () Outras, _____

4. Heredograma

5. Histórico obstétrico/ginecológico

Primeira gestação? ()Não ()Sim: pular para dados da gestação.

Quantas vezes você já engravidou (considerar abortos e natimortos)? _____

Quantos filhos nasceram vivos? ____ Quantos nasceram mortos? ____ Já teve algum aborto? ()Não ()Sim, quantos: ____ espontâneos:____ provocados:____ Algum com malformação? ()Não ()Sim, qual(is)?_____

Qual é a data de nascimento do seu último filho? ____ / ____ / ____

6. História Perinatal

Idade Gestacional: ____sem____dias ()Capurro ()Ballard ()DUM: ____/____/____

Classificação quanto à idade gestacional: ()Pré-termo ()Termo ()Pós-termo

Gemelar: ()Não ()Sim, especificar: ()1º Gemelar ()2º Gemelar ()3º Gemelar

Tipo de parto: ()Normal ()Fórceps ()Cesáreo ()RN Vivo ()RN Morto

Dano perinatal? ()Não ()Sim, especificar: ()Anóxico ()Isquêmico ()hemorrágico()traumático ()outros:_____

Parto IFF: ()sim ()não: 1ª consulta: ____/____/____ Idade Registro: _____

7. Exame Físico RN:

Peso: _____g Comprimento : ____cm Perímetro torácico: ____cm

PC: ____cm PC medido 24-48h após? ()não ()sim _____cm

Apgar: 1º minuto:____5º minuto____ 10º minuto____ Alta maternidade: ____d

Presença de outras malformações? ()não ()sim, especificar:

()Aparelho circulatório ()respiratório ()digestivo ()osteomuscular ()Órgãos genitais

Descrição: _____

Outros achados clínicos? ()não ()sim, especificar: ()icterícia ()anemia

- ()esplenomegalia ()alterações ósseas ()choro ao manuseio ()hidropsia ()rinite mucosanguinolenta ()hepatomegalia ()lesões cutâneas
- ()pseudoparalisia ()petéquias ()plaquetopenia ()convulsões
- ()outras, especificar: _____

Exame do RN	Normal	OBSERVAÇÃO
Pele / Anexos		() excesso de pele em região occipital
Crânio		() Suturas cavalgadas _____ () Proeminência occipital
Face		() Desproporção crânio-facial
Olhos / Nariz		
Boca / Perioral		
Dentes		
Pescoço		() Excesso de pele
MMSS		
Tórax e ausculta Cardiopulmonar		
Abodome / Visceras		
Quadril		
Genitália / Períneo		
MMII		
Dorso / Coluna Vertebra		
Sistema Nervoso /		() Hipertonia de Membros

Sinais Neurológicos		
Pares Cranianos		

Impressão da Avaliação Dismorfológica:

() Microcefalia Isolada infecciosa/disruptiva () Microcefalia com outras malformações
 () Microcefalia isolada genética () sem Microcefalia () outras malformações /
 dismorfias especificar: _____ () normal

8. Placenta: anatomia patológica: () não () sim,

Descrição: _____

9. Cardiologia:

ECO: () não () sim [IFF:() não () sim] Data: ___/___/___ () normal () alterado

Descrição: _____

10. US Abdominal: () não () sim [IFF:() não () sim] Data: ___/___/___ () N () alt

Descrição: _____

11. Oftalmologia:

Reflexo vermelho: () não () sim [IFF:() não () sim] Data: ___/___/___ () N () alt

Descrição: _____

Fundo de Olho:

Data	Idade	Normal	Alterado Descrição/conducta)

12. Exames Laboratoriais criança:

Exame	Data	Resultado	Data	Resultado
TGO				
TGP				
FA				
Ht				
Hb				
Leucometria				
Plaquetas				
Glicose				

	Material	Data	IgM	IgG	PCR
CMV					
Toxoplasmose					
Sífilis					
HIV*					
HSV*					

Rubéola*					
Parvovírus*					
Chikungunya					
Dengue					
Vírus Zika					

* = não obrigatório

Outros exames (data/exame/resultado):

13. Neurologia: Microcefalia: ()sim ()não

1ª avaliação: Data: ___/___/___ Idade:_____ Sintomas: ()não ()sim: _____

Alterações de exame físico:

Impressão:_____

Punção líquórica: ()Não ()Sim Data : ___ / ___ / _____

Aspecto: ()Límpido ()Purulento ()Hemorrágico ()Turvo ()Xantocrômico

()Outros ()Ignorado Hemácias: _____mm³ Leucócitos: _____mm³ Bastonetes:
 _____% Segmentados _____% Monócitos _____% Linfócitos _____% Ptn _____mg/dl

Cloreto _____mg/dl Glicose _____mg/dl

EEG: Data ___/___/___ Id: _____ Resultado: ()normal ()Alterado: _____

USTF: Data ___/___/___ Id: _____ Resultado: ()sem condições ()normal ()Alt:
 ()calcificações ()lisencefalia ()atrofia cerebral ()ventriculomegalia ()suturas
 calcificadas ()outras, especificar: _____

TC crânio: Data ___/___/___ Idade: _____ Resultado: ()normal ()Alterado
 ()calcificações ()lisencefalia ()atrofia cerebral ()ventriculomegalia ()suturas
 calcificadas ()outras, especificar: _____

RNM crânio: Data ___/___/___ Idade: _____ Resultado: ()normal ()Alterado
 ()calcificações ()lisencefalia ()atrofia cerebral ()ventriculomegalia
 ()suturas calcificadas ()outras, especificar: _____

Seguimento da neurologia:

14. Avaliação Auditiva:

TAN (EOAE): Data ___/___/___ Idade: _____ Resultado: ()normal ()Alt: _____

PEATE: Data ___/___/___ Idade: _____ Resultado: ()normal ()Alterado: _____

Reteste após 30d: Data ___/___/___ Id: _____ Resultado: ()normal ()Alterado

Encaminhamento: _____

PEATE seguimento:

Data	Idade	Normal	Alterado (Descrição)

15. Avaliação do desenvolvimento:

Teste Aplicado	Data	Idade	Normal (p)	Alterado (Descrição)
Linguagem 12m				
Linguagem 24m				

16. Avaliação Nutricional:

Sucção adequada neonatal? () não () sim LM: () não () sim, tempo: _____

Gastrostomia? () não () sim, data: ___/___/___ Idade: _____

Observação: _____

17. Intercorrências

Data	Idade	Problema	Evolução

18. Encerramento do caso

Classificação final:

SZC Exposto Não infectado Inconclusivo Descartado

Etiologia provável:

genética/cromossômica ambiental (fármacos, toxicológicas, radiações ionizantes, outras) inconclusiva infecciosa, qual? _____

Grupo de pesquisa inicial: Caso Controle **Grupo final:** Caso Controle

Desfecho: Data: __/__/__ pediatria abandono transferida: _____

Ignorado óbito Causa mortis: _____

Necropsia: não sim, no iff? sim não, onde? _____

Resultado: _____

Último preenchimento (lápis): ____/____/____ Última monitoria: ____/____/____

Apêndice 2: FICHA DE SEGUIMENTO AMBULATORIAL



INSTITUTO NACIONAL
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

Ambulatório de DIPE – Exposição vertical ao vírus

Zika

Nome:**Data da consulta:****Prontuário:****DN:****Idade:**

Acompanhante:

Mãe com sintomas de Zika na gestação: () sim () não

Confirmação de infecção materna:

PCR+ () sim () não ; sorologia IgG+ () sim () não

Confirmação da infecção na criança:

PCR+ () sim () não; sorologia IgG+ () sim () não

Diagnóstico da criança:

() microcefalia () outra malformação do SNC () assintomático

Últimos exames complementares:

Exame	Data	Normal	Alterado	Observações
USTF				
TC de crânio				
RM de crânio				
EEG				
PEATE				
Fundoscopia				
Ecocardiograma				
USG abdominal				
USG lombossacra				

Usa óculos: () sim () não

Urodinâmica: () Sim () Não - Alteração:

Faz uso de oxibutinina?: () Sim () Não

Intercorrências:

Medicações:

Alimentação:

Tem dificuldade de alimentação: () sim () não

Observações adicionais:

Vínculos:

Fisioterapia:

Fonoaudiologia:

Neurologia:

Outros:

Vacinas em dia: () sim () não _____

() viu cartão () não viu cartão

História do desenvolvimento:

Exame físico:

Peso: _____ (z-score____) Estatura:_____ (z-score____)

PC: _____ (z-score____) IMC: _____ (z-score __)

Ectoscopia:

Cabeça e pescoço: () normal () alterado

Ap.respiratório : () normal () alterado

Ap. cardiovascular: () normal () alterado

Abdome: () normal () alterado

Membros: () normal () alterado

Genitália: () normal () alterado

Neurológico: () normal () alterado

Outros: _____

Impressão:

Recomendações:

ANEXOS

ANEXO 1: Documento do CDC modificado pela Autorização de Uso de Emergência para inclusão de materiais usados por laboratórios fora dos Estado Unidos

MAC-ELISA para zika

Centros de Controle e Prevenção de Doenças

Este documento foi modificado pela Autorização de Uso de Emergência (laboratórios dos EUA) para incluir materiais usados por laboratórios fora dos EUA. Os laboratórios dos EUA devem consultar o protocolo da Autorização para Uso de Emergência (EUA) oficial dos EUA, fornecido pela Rede de Laboratórios de Resposta

Instruções de uso

Índice

<i>Introdução</i>	3
<i>FINALIDADE</i>	3
<i>Amostras</i>	4
<i>Equipamento e insumos</i>	5
<i>Formulações</i>	7
<i>Controle de qualidade</i>	7
<i>Algor</i>	9
<i>Ensaio MAC-ELISA para zika</i>	10
<i>Interpretação de resultados de testes</i>	13
<i>Limitações do ensaio</i>	15
<i>Características de desempenho</i>	16
<i>Contato</i>	20
<i>Referência</i>	20
<i>Referências</i>	20

Introdução

FINALIDADE

Este documento descreve o uso de um ensaio de imunoabsorção enzimática de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) para a detecção de anticorpos do zika vírus em pessoas que atendem aos critérios clínicos e/ou epidemiológicos dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) para teste do zika vírus.

Esse teste destina-se somente a uso conforme descrito na orientação para teste de diagnóstico de zika do CDC e sob a Autorização de Uso de Emergência (EUA) da Food and Drug Administration (FDA). Consulte o website do CDC para obter orientação atualizada para laboratórios: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>.

Laboratórios internacionais não são regidos por essas restrições.

USO PRETENDIDO

O teste MAC-ELISA para zika do CDC destina-se à detecção qualitativa de anticorpos IgM do zika vírus em soro humano ou no líquido cefalorraquidiano (LCR) que é submetido junto com uma amostra de soro do paciente, coletada de indivíduos que atendem a critérios clínicos do CDC para o zika vírus (por exemplo, sinais clínicos e sintomas associados à infecção pelo zika vírus) e/ou critérios epidemiológicos do CDC para o zika vírus (por exemplo, histórico de residência ou viagem para regiões geográficas com transmissão ativa do zika vírus no momento da viagem ou outros critérios epidemiológicos para os quais o teste do zika vírus possa ser indicado como parte de uma resposta para a saúde pública). O ensaio destina-se a uso em laboratórios qualificados designados pelo CDC como parte de um algoritmo multiteste.

Os resultados do ensaio são para a suposta identificação de anticorpos de IgM para o zika vírus. Resultados positivos e resultados duvidosos não são definitivos para o diagnóstico de infecção por zika vírus. Resultados falso-positivos em pacientes com histórico de infecções de outros flavivírus são possíveis. A confirmação da presença de anticorpos IgM antizika em amostras supostamente positivas requer testes adicionais pelo CDC ou por laboratórios qualificados indicados pelo CDC e com a consultoria do CDC, usando o algoritmo emitido pelo CDC. Os laboratórios devem comunicar todos os resultados positivos às autoridades de saúde pública adequadas. Dentro dos Estados Unidos e de seus territórios, resultados equívocos e supostamente positivos devem ser informados ao CDC pelos laboratórios qualificados designados pelo CDC.

Os resultados desse teste não podem ser usados como base exclusiva de decisões de gestão de pacientes e devem ser combinados com observações clínicas, histórico de pacientes, informações epidemiológicas e outras evidências laboratoriais. Os níveis de IgM do zika durante a doença não são bem caracterizados. Os níveis de IgM são variáveis, mas geralmente são positivos a partir do dia quatro após o início dos sintomas e continuam por 12 ou mais semanas após a infecção inicial.

Resultados negativos não eliminam a possibilidade de infecção pelo zika vírus, passada ou presente. Resultados negativos podem ser vistos em amostras coletadas antes do dia quatro após o início dos sintomas ou depois que o período de IgM detectável termina.

O MAC-ELISA para o zika destina-se a uso por equipes de laboratório treinadas, proficientes na realização e interpretação de imunoenaios em laboratório qualificados designados pelo CDC. O MAC-ELISA para zika só deve ser usado sob a EUA da FDA para laboratórios dos EUA. Laboratórios fora dos Estados Unidos não são regidos pelas restrições da EUA, e esse protocolo pode ser usado como orientação.

LIMITAÇÕES DE USO DO PROTOCOLO

O ensaio MAC-ELISA descrito neste documento não foi exaustivamente testado com amostras clínicas. Não são permitidas modificações desses ensaios (ou seja, o uso de plataformas ou produtos químicos diferentes dos descritos). Esses ensaios não devem ser distribuídos sem o consentimento explícito do CDC.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Os ensaios que detectam imunoglobulina M (IgM) específica são vantajosos porque detectam anticorpos produzidos durante os primeiros dias após o início de sintomas clínicos em uma infecção primária, evidenciando a necessidade de amostras na fase de convalescência em muitos casos. A captura de IgM é a abordagem ideal para a detecção de IgM porque é simples, sensível e aplicável a amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e de soro de uma variedade de espécies animais (ex. humanos, equinos, aves).

O ensaio de imunoabsorção enzimática para captura de anticorpos de IgM (MAC-ELISA) fornece uma alternativa útil à imunofluorescência para documentação de uma resposta sorológica. O ELISA é menos subjetivo que a imunofluorescência, e grandes números de amostras podem ser processados. O anti-IgM (o anticorpo de captura) é revestido em placas de 96 poços. Isso é seguido sequencialmente pela adição do soro do paciente e, a seguir, do antígeno viral não infeccioso. A presença de antígeno é detectada usando anticorpo antiviral conjugado enzimático. Um resultado colorimétrico é gerado pela interação da enzima e um substrato cromogênico. Essa alteração colorimétrica é detectada por um espectrofotômetro (leitor de ELISA).

Amostras

AMOSTRAS ACEITÁVEIS

Soro humano agudo e convalescente.

OBSERVAÇÃO: O soro deve ser coletado em um tubo separador de soro. O tubo deve ser centrifugado e o soro decantado antes do envio para evitar a hemólise.

Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR).

O LCR só pode ser testado quando enviado em conjunto com uma amostra de soro do paciente.

MANUSEIO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Armazene todas as amostras de diagnóstico a 2-8 °C antes do teste, e ≤ -20 °C depois que todos os testes previstos forem concluídos. Evite ciclos de congelamento e descongelamento repetidos.

As amostras de pacientes devem ser inativadas por calor por 30 minutos em banho-maria a 56 °C. Se houver alguma possibilidade de existência de vírus chikungunya na amostra, a inativação deverá ser estendida para 2 horas.

SEGURANÇA/PRECAUCÕES

Recomendamos aos laboratórios realizar uma avaliação de riscos ao conduzir novos testes, e precauções de segurança devem ser baseadas na avaliação de riscos do laboratório. Se a infecção pelo vírus chikungunya for possível, os laboratoristas devem reconhecer que o vírus chikungunya produz altos níveis de viremia, e o soro de casos com suspeita de vírus chikungunya deve ser tratado como potencialmente infectante, mesmo para procedimentos sorológicos. Consulte as orientações do CDC para laboratórios de saúde pública estaduais e locais: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>. Consulte Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) para obter mais informações de biossegurança sobre esses vírus e para conhecer práticas de biossegurança em laboratório.

Esse procedimento deve ser realizado em condições de segurança laboratorial que levem em consideração a natureza potencialmente infecciosa das amostras de soro envolvidas. No mínimo, após a inativação por calor, recomenda-se que esses procedimentos sejam realizados usando instalações BSL-2 e práticas BSL-3. Para garantir a segurança da equipe do laboratório, efetue todas as manipulações de amostras dentro de um gabinete de segurança biológica (BSC) Classe II (ou mais alta).

Equipamentos e consumíveis

AVISO LEGAL: Os nomes de fornecedores ou fabricantes são fornecidos como exemplos de fontes adequadas de produtos. O uso de nomes comerciais serve apenas para fins de identificação e não constitui endosso pelo CDC ou pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos.

MATERIAIS FORNECIDOS PELO CDC

- **OBSERVAÇÃO:** Esses materiais serão fornecidos pelo CDC, Ft. Collins, CO. Para solicitar esses reagentes, envie e-mail à Dra. Barbara Johnson em bfj9@cdc.gov. Laboratórios sob a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) devem consultar seus laboratórios de referência nacional ou a OPAS para obter assistência.
- **Antígeno Vero E6 normal (catálogo n° AV0001 do CDC);** antígeno normal liofilizado.
- **Antígeno de cultura de tecido Vero E6 para zika (catálogo n° AV0002 ou AV0003 do CDC;** esses são antígenos produzidos por diferentes classes de zika; apenas uma é necessária para o ensaio); antígeno liofilizado do zika (inativado) preparado para uso no IgM-Elisa para zika.
- **Controle positivo de IgM de flavivírus (catálogo n° AV0004 do CDC):** Anticorpo monoclonal quimérico específico para flavivírus; liofilizado.
- **Controles de ensaio positivo e negativo devem ser executados simultaneamente com todas as amostras de teste.**

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

OBSERVAÇÃO: para materiais que requerem diluição/titulação, consulte as **Formulações** abaixo.

- **Deteção de anticorpo conjugado:** Anticorpo monoclonal conjugado com rábano silvestre 6B6C-1. Disponível em:
 - Hennessy Research, catálogo n° DC153-100 ou
 - InBios (ambos os itens são aceitos),

- o Item 500510: 6B6C-1/HRP conjugado (não diluído), 50 uL
- o Item 500510D: 6B6C-1/HRP conjugado (1/100 de diluição da solução-estoque), 1 mL
- IgM anti-humano (cabra) (Kirkegaard and Perry Laboratories cat. n° 01-10-03)
- Água desionizada
- Ácido clorídrico (para ajustar o pH do tampão de revestimento)
- Carbonato de sódio (Na₂CO₃); (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃); (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher, etc.)
- Fosfato salino tamponado (PBS); (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)
- Tween 20 (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)
- Leite em pó desnatado (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄); (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher)
- Placas Immulon II HB de fundo chato de 96 poços, Dynatech Technologies catálogo n° 3455 (disponível em várias fontes comerciais, ex. Sigma, Thermo Fisher etc.)

OBSERVAÇÃO: Essa é a única placa de 96 poços aprovada para este ensaio.

- Substrato Enhanced K-Blue TMB (3,3', 5, 5' base tetrametilbenzidina; Neogen Corp, catálogo n° 308175
- Soro humano normal – testou negativo para anticorpos do zika vírus
- TMB Stop Solution (KPL) *Somente laboratórios fora dos EUA!*

EQUIPAMENTOS E CONSUMÍVEIS

- Lavadora de microplacas
- Leitor de microplacas com filtro de 450 nm
- Cabine de biossegurança (BSC)
- Incubadora regulada a 37 °C
- Pipetadores de canal único e multicanal (100 µL e/ou 200 µL de canal único, 100 µL e/ou 200 µL de 12 canais)
- Ponteiras de pipeta para os pipetadores listados
- Reservatórios de reagente
- Cronômetro
- Frascos de mistura de reagente; frascos de vidro esterilizados de 1 L; Gibco ou outro fornecedor
- Tubos de microcentrífuga para diluir o soro do paciente; comprar esterilizado ou autoclave e esfriar antes do uso; Corning ou outro fornecedor
- Recipientes de pesagem para medir componentes químicos secos, resistente a produtos químicos
- Marcador permanente.

Formulações

OBSERVAÇÃO: As diluições fornecidas são um ponto de partida para titulação. Os laboratórios devem determinar a diluição ideal para seu laboratório individual. Consulte informações adicionais em Padronização de ensaios, na página 13.

- Tampão de revestimento: Tampão de carbonato/bicarbonato, pH 9,6

1,59 g Na₂CO₃ + 2,93 g NaHCO₃ diluído em 1 L de água.

- Tampão de lavagem: Fosfato salino tamponado (PBS), 0,05% Tween 20, pH 7,2. O PBS está disponível em pó em várias fontes comerciais.
- Tampão de bloqueio: PBS/5% leite/ 0,5% Tween 20
- Solução de parada: 1 N H₂SO₄
- Detecção de anticorpo conjugado: O conjugado pode ser diluído até 1:5000 em tampão de bloqueio
- Controle positivo de IgM de flavivírus: Controle positivo de IgM de flavivírus diluído até 1:3000 em tampão de lavagem
- Antígeno Vero E6 do zika: diluído até 1:160 em tampão de lavagem
- Antígeno Vero E6 normal: diluído até 1:160 em tampão de lavagem
- IgM anti-humano (cabra): diluído a 1:2000 em tampão de revestimento (pode ser necessária titulação)
- Soro de paciente: diluído a 1:400 em tampão de lavagem (não é necessária titulação)
- Controle negativo: Soro humano diluído a 1:400 (não é necessária titulação)

o Novos lotes de soro humano devem ser testados usando este protocolo como se fossem experimentais. Se a densidade óptica (DO) do antígeno viral NÃO for 2X maior que a DO do antígeno normal, pode-se presumir que é negativa.

Controle de qualidade

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- A equipe deve estar familiarizada com o protocolo e com os instrumentos utilizados.
- Use aventais descartáveis limpos e nunca usados e luvas sem talco novas durante o preparo e manuseio do reagente de ensaio. Troque as luvas sempre que suspeitar de contaminação.
- Armazene todos os reagentes a temperaturas adequadas (ver encartes dos produtos). Não use reagentes após suas datas de validade.
- Mantenha os tubos de reagente com a tampa fechada sempre que possível.
- Use somente ponteiros de pipeta com barreira de aerossol (filtro).
- Esvazie todo o lixo diariamente.

CONTROLES DE ENSAIO

Controles de ensaio devem ser executados simultaneamente com todas as amostras de teste.

Controles de anticorpos:

- Controle positivo: Controle positivo de IgM de flavivírus
- Controle negativo: soro humano normal.

Determinação de fundo:

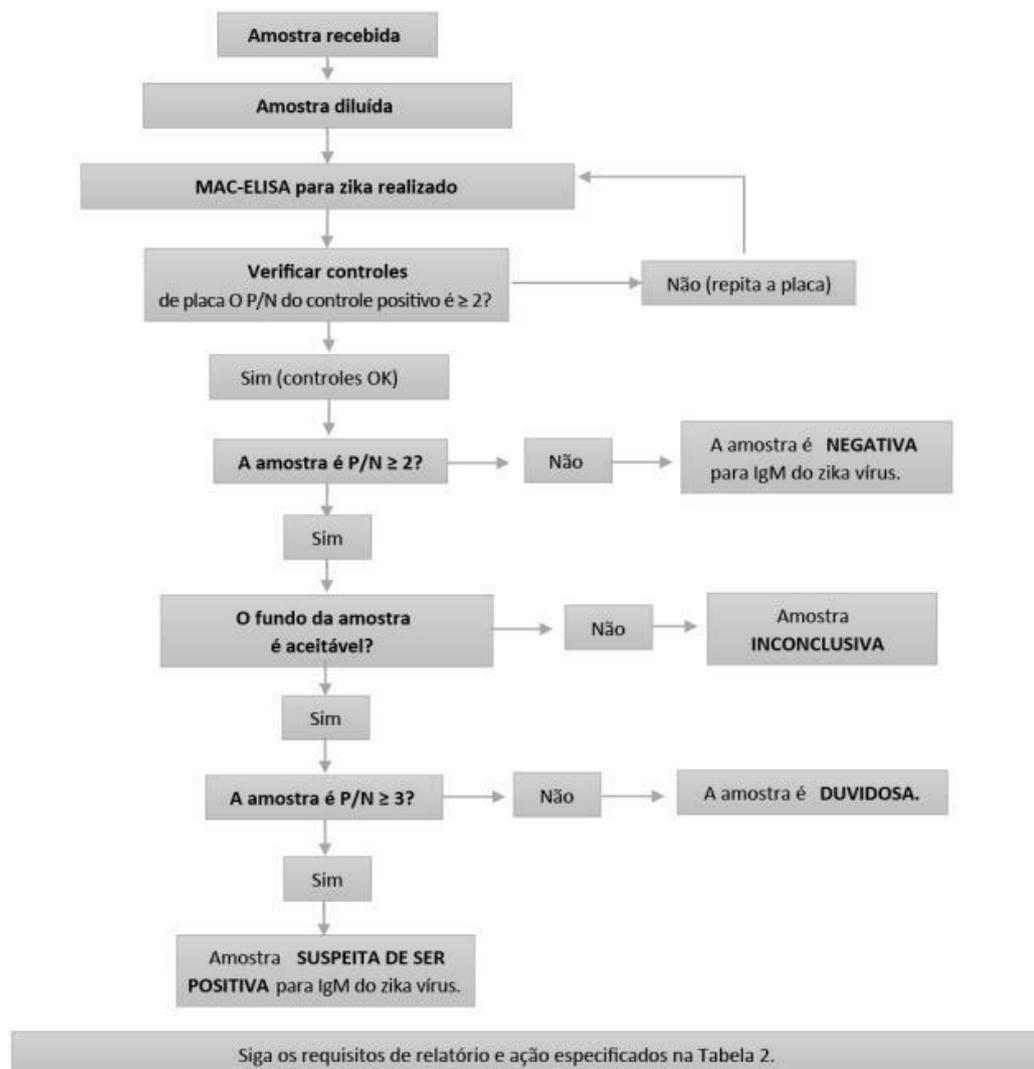
- A amostra reagiu com antígeno Vero E6 normal (para medir o sinal de fundo gerado pela amostra).

Tabela 1: Visão geral dos controles positivos e negativos

Cálculo	Razão	Resultado
P/N do controle positivo	DO média do soro de controle positivo que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (P)	< 2 A placa NÃO É válida
	DO média do soro de controle negativo que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (N)	≥ 2 A placa É válida
P/N de fundo da amostra (para amostras com P/N de amostra ≥2 Consulte a Figura 1)	DO média da amostra que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (P)	< 2 A amostra é Inconclusiva
	DO média da amostra que reagiu com o antígeno Vero E6 normal	≥ 2 A amostra pode ser interpretada de acordo com o algoritmo de teste

Algoritmo de teste

Figura 1: Resumo da interpretação dos resultados dos testes



Ensaio MAC-ELISA para zika

OBSERVAÇÕES SOBRE O PROCEDIMENTO ELISA:

- As placas podem ser revestidas e mantidas a 2-8°C por até uma semana. (Consulte a etapa 2: revestimento das placas, abaixo).
- O soro de controle não diluído pode ser armazenado a 2-8°C por até duas semanas.
- Antígenos Vero E6 virais e normais reconstituídos, não diluídos podem ser armazenados a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ por um período de tempo indefinido.
- O soro de teste e controle pode ser diluído até as diluições de trabalho e refrigerados um dia antes do uso.
- Antígenos e conjugado *devem ser diluídos até as diluições de trabalho imediatamente antes do uso.*

OBSERVAÇÃO: O SEGUINTE PROCEDIMENTO INCLUI INFORMAÇÕES SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE E INTERPRETAÇÃO. CADA AMOSTRA DE SORO É TESTADA EM TRIPLICATA EM ANTÍGENOS VERO E6 VIRAL E NORMAL. OITO (8) AMOSTRAS DE TESTE PODEM SER ANALISADAS POR PLACA. DEVIDO AO VOLUME LIMITADO, AMOSTRAS DE LCR SÃO GERALMENTE TESTADAS SOMENTE INDIVUALMENTE.

1. PREPARAÇÃO DA PLACA:

Determine o número de placas ELISA necessárias. Usando um marcador permanente de ponta fina, numere e rotule as placas de 96 poços. Identifique a localização de cada amostra clínica (S1-S8) usando um modelo correspondente (Consulte a Fig. 2). *Para manter o timing de adição de reagente consistente, processe as placas na ordem de numeração durante todas as etapas do procedimento.* As placas devem ser mantidas em ambiente fechado e umidificado durante todo o tempo de incubação, com exceção da etapa de revestimento. Um saco tipo Ziploc grande contendo papel toalha úmido funciona bem para essa finalidade.

2. REVESTIMENTO DAS PLACAS:

- Dilua o IgM anti-humano (cabra) a 1:2000 em tampão de revestimento, pH 9,6.
- Revesta os 60 poços internos da placa de 96 poços com 75 μL por poço de IgM anti-humano (cabra) diluído. Deixe as colunas externas vazias (consulte a Fig. 2).
- Incube a **2-8 °C durante a noite**. As placas devem permanecer a 2-8 °C até serem necessárias para o teste, por até uma semana.

3. BLOQUEIO DAS PLACAS:

- Após a incubação à noite, descarte o anticorpo de revestimento.
- Seque as placas com papel toalha ou outro material absorvente.
- Bloqueie as placas com 200 μL de tampão de bloqueio por poço.
- Incube à **temperatura ambiente por 30 minutos**.

4. LAVAGEM DAS PLACAS:

- Lave os poços 5X com tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática.
- Os poços devem ser cheios até o topo em cada ciclo (i.e. 300 μL).

5. ADIÇÃO DE AMOSTRAS/CONTROLES:

- Dilua o soro do paciente a 1:400 em tampão de lavagem.
- Adicionam-se 50 μL por poço de soro do paciente diluído (S) a um bloco de 6 poços ou LCR não diluído

a apenas dois poços. O LCR será testado individualmente para os antígenos Vero E6 viral e normal.

OBSERVAÇÃO: O LCR pode ser diluído até no máximo 1:5 em tampão de lavagem se necessário para obter volume suficiente para o teste.

- Adicione 50 µL de controle positivo de IgM de flavivírus (Ref) diluído em tampão de lavagem de acordo com uma titulação previamente determinada.
- Dilua o controle negativo de soro humano (N) 1:400 em tampão de lavagem.
- Adicione 50 µL de controle negativo de soro humano (N) diluído (1:400 em tampão de lavagem) para bloqueio de 6 poços.
- Incube as placas por **1 hora a 37 °C** em câmara umidificada.

6. LAVAGEM DAS PLACAS:

- Lave os poços 5X com tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática.
- Os poços devem ser cheios até o topo em cada ciclo.

7. ADIÇÃO DE ANTÍGENO:

- Dilua o antígeno Vero E6 do **Zika** em tampão de lavagem de acordo com uma titulação previamente determinada.
- Dilua o antígeno Vero E6 **Normal** em tampão de lavagem com a mesma concentração que o antígeno Vero E6 do **Zika**.
- Adicione 50 µL de antígeno Vero E6 do **Zika** por poço aos três poços esquerdos de cada bloco de soro (consulte a Fig. 2).
- Adicione 50 µL de antígeno Vero E6 **Normal** por poço aos três poços direitos de cada bloco (consulte a Fig. 2).
- Incube as placas **durante a noite a 2-8 °C** em uma câmara umidificada.

8. LAVAGEM DAS PLACAS:

- Lave os poços 5X com tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática.
- Os poços devem ser cheios até o topo em cada ciclo.

9. ADIÇÃO DE CONJUGADO:

- Dilua o anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase de rábano silvestre em tampão de bloqueio de acordo com uma titulação previamente determinada.
- Adicione 50 µL de anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase de rábano silvestre por poço.
- Incube as placas por **1 hora a 37 °C** em câmara umidificada.

10. Ligue o leitor de placas para aquecimento.

11. Remova o TMB-ELISA da geladeira.

12. LAVAGEM DAS PLACAS:

- Lave os poços 5X **duas vezes** com tampão de lavagem usando uma lavadora de placas automática.
- Vire as placas a 180º na lavadora após a primeira série de 5 ciclos. Isso oferece resultados consistentes.
- Os poços devem ser cheios até o topo em cada ciclo.

13. ADIÇÃO DE SUBSTRATO:

- Com a placa à temperatura ambiente (20 a 25 °C), adicione 75 µL de substrato TMB por poço a todos os poços.
- Cubra imediatamente as placas para bloquear a luz. Incube à temperatura ambiente por 10 minutos.

- Uma cor azul se desenvolverá em poços positivos para anticorpos.

14. ADIÇÃO DE SOLUÇÃO DE PARADA:

- Adicione 50 µL de solução de parada por poço a todos os poços, incluindo as linhas externas de poços da placa. *Laboratórios fora dos EUA podem usar 75 ul de TMB Stop Solution (KPL).*
- **OBSERVAÇÃO:** O leitor de placas deve ser ajustado para zero em alguns desses poços.
- Os poços que estavam azuis agora mudarão para amarelo.
- Deixe as placas em repouso à temperatura ambiente por 1 minuto.
- Leia as placas em leitor de microplacas usando um filtro de 450 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO
B	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
C	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
		S1		S3		S5		S6		RE		
D	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
E	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
F	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
		S2		S4		S6		S7		N		
G	VAZIO	Antígeno viral	Antígeno normal	VAZIO								
H	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO	VAZIO

Figura 2: Exemplo de disposição para 8 amostras e controles

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO

O MAC-ELISA deve ser padronizado e validado antes do uso em laboratório, e repadronização periódica é necessária. Isso deve ocorrer quando novos números de lotes de reagentes forem introduzidos e, no mínimo, uma vez por ano. Recomenda-se que a densidade óptica média do soro de controle positivo que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika seja definida para aprox. 1,0. O soro de controle normal que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika deve ser < 0,2 (isso varia). A padronização de reagentes é normalmente atingida por meio de titulação, sempre comparando as densidade ópticas dos reagentes ao reagir em antígeno Vero E6 viral e normal. A padronização e a repadronização podem ser confirmadas testando os painéis de verificação.

DETERMINAÇÃO DA VALIDADE DO TESTE

Antes que os resultados possam ser determinados para cada amostra clínica, deve-se determinar que o teste é **válido**. Para que um teste seja válido, a seguinte relação deve ser maior ou igual a 2,0. **Esse é o P/N do controle positivo.**

DO média do controle positivo de IgM do flavivírus que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (P) DO média do soro de controle negativo que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (N)

A validade do teste deve ser determinada para cada placa. Os resultados para amostras clínicas só podem ser determinados se o teste for válido. Se o teste não for válido, essa placa deverá ser repetida. Se o P/N do controle positivo ainda falhar após uma repetição, um ou mais dos reagentes ou parâmetros de teste estava provavelmente errado, e o diagnóstico de falhas deve ser realizado.

DETERMINAÇÃO DE P/N DA AMOSTRA

Para determinar se as amostras clínicas (S1-S8) contêm IgM do zika vírus (o que indicaria recentes infecções por esse vírus), o seguinte deve ser calculado:

DO média da amostra de teste que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (P) DO média do soro humano normal que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika (N)

Esse é o P/N da amostra de teste.

Todas as amostras para as quais a relação P/N da amostra é < 2 , reportar como **negativa**. Não são necessárias análises adicionais. Consulte a Tabela 2 abaixo.

AVALIAÇÃO DO FUNDO DA AMOSTRA

Para cada amostra com P/N da amostra ≥ 2 , determine se fundo não específico está sendo gerado.

O valor de P (média da amostra de teste que reagiu com o antígeno Vero E6 do zika) da amostra de teste deve ser maior ou igual a duas vezes (2X) a DO média da amostra de teste que reagiu com o antígeno Vero E6 normal. Se esse requisito não for atendido, o fundo não específico está sendo gerado, e o resultado

novamente. Se o teste repetido também produzir resultados inconclusivos, envie a amostra para análise adicional e/ou solicite a coleta de soro adicional para análise. Se o requisito for atendido, proceda à interpretação do resultado da amostra.

ANÁLISE DE RESULTADOS POSITIVOS E DUVIDOSOS

Todos os valores P/N de amostras maiores ou iguais a 3,0 devem ser reportados como suspeita de IgM positivo (consulte a tabela abaixo), contanto que atendam aos requisitos acima mencionados. Caso um LCR ou soro agudo inicial seja negativo de acordo com esse teste, uma amostra de soro convalescente deve ser solicitada e testada para que esse paciente seja reportado como negativo para evidência sorológica de infecção viral recente. Sem testar uma amostra convalescente, um resultado negativo poderá refletir teste de uma amostra da fase aguda obtida antes do anticorpo atingir níveis detectáveis. Os valores P/N entre 2,0 e 3,0 devem ser considerados **duvidosos**. Testes adicionais devem ser realizados para determinar o status dessas amostras (consulte a Tabela 2 abaixo).

Deve-se enfatizar que o valor P/N de amostra na diluição de triagem de 1:400 não é uma indicação de concentração absoluta de anticorpos, i.e., o valor P/N não é quantitativo.

Tabela 2: Interpretação de resultados do MAC-ELISA para zika

P/N da amostra de teste	Interpretação	Relatório	Ação
< 2	Negativo	Nenhuma evidência de infecção por zika vírus detectada.	Reporte os resultados. Se a amostra for da fase aguda inicial, consulte as instruções de interpretação acima.
$2 \leq P/N < 3$	Duvidoso	MAC-ELISA para zika foram duvidosos quanto à presença de anticorpos antizika vírus.	Envie um relatório ao CDC junto com a amostra para teste confirmatório.
≥ 3	Suspeita de positivo	Evidência sorológica de possível infecção por zika vírus identificada. É necessário teste adicional.	Envie um relatório ao CDC junto com a amostra para teste confirmatório.

Todos os resultados positivos devem ser relatados ao CDC via ArboNET.

Para obter informações sobre o algoritmo de teste do zika, consulte a orientação do CDC para laboratórios de saúde pública estaduais e locais: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>

Para obter instruções de encaminhamento de amostras, consulte: <http://www.cdc.gov/zika/hc-providers/diagnostic.html>

A interpretação dos resultados do teste MAC-ELISA para zika deve considerar a possibilidade de resultados falso-negativos e falso-positivos. Os resultados falso-negativos podem resultar de:

- Coleta de amostra realizada antes da IgM ter atingido níveis detectáveis (tipicamente aproximadamente 4 dias após o início dos sintomas).
- Coleta de amostra realizada depois que os níveis de IgM atingiram níveis detectáveis (tipicamente aproximadamente 12 semanas após o início dos sintomas).
- Falha em seguir os procedimentos autorizados do ensaio.

O caso mais comum de resultado positivo falso é reatividade cruzada com IgM específico de outros flavivírus, como o vírus da dengue. Somente avaliação limitada de reatividade cruzada com flavivírus ou arbovírus foi realizada. Não foi feita nenhuma avaliação de reatividade cruzada com fator reumatoide. Dados clínicos indicam que reatividade cruzada com anticorpos de vírus contra a dengue é possível. São necessários testes de acompanhamento para eliminar resultados falso-positivos. A confirmação da presença de anticorpos IgM antizika requer testes adicionais pelo CDC ou por laboratórios designados pelo CDC. O método padrão ouro para confirmação da presença de anticorpos antizika é o teste de neutralização por redução de placas (PRNT).

Todos os testes de zika devem ser realizados seguindo as orientações e os algoritmos de teste do laboratório de zika emitidos pelo CDC: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>.

Os resultados negativos não descartam infecções pelo zika vírus e não devem ser usados como o único embasamento para decisões de tratamento/cuidados com o paciente. Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional treinado em conjunto com a análise do histórico e dos sinais e sintomas clínicos do paciente.

Este ensaio se destina apenas ao diagnóstico *in vitro* sob a Autorização de Uso de Emergência da FDA e está limitado a laboratórios qualificados designados pelo CDC. Laboratórios internacionais não são regidos pelas restrições da EUA da FDA.

Todas as amostras devem ser manipuladas como se estivessem infectadas. Precauções adequadas de biossegurança, inclusive equipamento de proteção individual, devem ser aplicadas na manipulação dos materiais das amostras.

A coleta, o armazenamento e o transporte adequados das amostras são essenciais para obter resultados corretos.

O desempenho só foi estabelecido com os tipos de amostras listados no tópico Uso Pretendido. Outros tipos de amostras não são aceitáveis para uso com este ensaio.

Vale ressaltar que, a partir de abril de 2016, qualquer paciente cuja amostra produza resultados de PRNT positivos (ou seja, ≥ 10) para zika vírus e para o vírus da dengue, é agora classificado como portador de infecção por “flavivírus”. O vírus da infecção só é especificado se um resultado for positivo e o outro negativo. A diferença anterior de 4 vezes para identificar a infecção demonstrou ser incorreta em vários casos e foi agora abandonada somente para diagnóstico de zika.

2 de junho de 2016

15

Características de desempenho

Reatividade cruzada

Reatividade cruzada com flavivírus

Soros conhecidos em banco do repositório do CDC foram selecionados para avaliar a reatividade cruzada do MAC-ELISA para zika. Não foi observada nenhuma reatividade cruzada entre o MAC-ELISA para zika e flavivírus que não a dengue.

Tabela 3: Resumo de reatividade cruzada com flavivírus

Flavivírus	Descrição da amostra	Amostras testadas	Negativo pelo MAC-ELISA para zika
WNV	Soros de casos confirmados de vírus do Nilo ocidental.	4	4 (100%)
SLE	Soros de casos confirmados de encefalite de São Luís	1	1 (100%)
YFV	Soros de indivíduos vacinados contra o vírus da febre amarela	4	4 (100%)
JEV	Soros de indivíduos vacinados contra o vírus da encefalite japonesa	2*	2 (100%)

*Dois soros dentro do grupo de recipientes cujos pacientes foram vacinados contra a febre amarela vieram de indivíduos que também foram vacinados contra a encefalite japonesa, portanto são um subconjunto das amostras da linha acima.

O vírus da dengue não foi incluído na avaliação de reatividade cruzada. Dados de testes clínicos apresentados abaixo demonstram reatividade cruzada significativa do MAC-ELISA para zika a anticorpos IgM do vírus contra a dengue.

Reatividade cruzada de não flavivírus

Não foi realizado nenhum estudo experimental com o MAC-ELISA para zika para determinar reatividade cruzada com IgM contra não flavivírus. Entretanto, a literatura (Martin, et al., 2000) indica que somente reatividade cruzada mínima é esperada com IgM contra alfavírus e buniavírus.

Os arbovírus foram originalmente divididos em três grupos com base em diferenças sorológicas significativas, conforme caracterizado por técnicas sorológicas iniciais rudimentares. Essas divisões permanecem: Vírus do grupo A são agora alfavírus; os do grupo B são agora flavivírus; os do grupo C são agora buniavírus. À medida que os métodos sorológicos evoluíram, as distinções sorológicas que originalmente definiam os grupos significam que reatividade cruzada entre os grupos em imunoenaios não é esperada.

Desempenho clínico

Desempenho com amostras dos EUA submetidas ao CDC, Ft. Collins, de 2015 até o presente

No período entre janeiro de 2015 e 13 de fevereiro de 2016, 167 amostras de soro e 2 de LCR foram testadas pelo MAC-ELISA para zika do CDC e pelo ensaio PRNT para Zika do CDC.

Dos 167 registros de teste de soro, um subconjunto continha amostras emparelhadas de sangrias seriais. Das sangrias seriais, somente a primeira sangria positiva para IgM ou duvidosa foi incluída. Se ambas as sangrias seriais foram negativas, somente a primeira foi incluída. O conjunto de dados resultante usado nessa análise é 161 soros. Um resumo dos resultados desses soros é apresentado na Tabela 5. Quarenta e quatro desses registros de teste indicaram que eram de gestantes. Um resumo dos resultados desse subconjunto de soros de gestantes é apresentado na Tabela 6.

Tabela 5: Dados de soros submetidos ao CDC Ft. Collins para testes de 2015 até o presente

		Resultados de PRNT			
		zika	flavivírus	dengue	negativo
MAC-ELISA para zika	positivo	45	16	23	9
	duvidoso	1	0	9	13
	negativo	0	0	6	39

Acordo percentual positivo (somente positivos para zika definitivos em PRNT): $45/46 = 97,8\%$ (95% CI: 88,7% a 99,6%)

Acordo percentual negativo: $45/99 = 45,5\%$ (95% CI: 36,0% a 55,3%)

Tabela 6: Dados de soros de gestantes submetidos ao CDC Ft. Collins para testes de 2015 até o presente Resultados de PRNT

		Resultados de PRNT			
		zika	flavivírus	dengue	negativo
MAC-ELISA para zika	positivo	3	2	1	3
	duvidoso	0	0	2	8
	negativo	0	0	1	24

Acordo percentual positivo (somente positivos para zika definitivos em PRNT): $3/3 = 100\%$ (95% CI: 43,9% a 100%)

Acordo percentual negativo: $25/39 = 64,1\%$ (95% CI: 48,4% a 77,3%)

Resumo de dados de LCR

Ambas as amostras de LCR testadas pelo CDC produziram resultados positivos de infecção pelo zika vírus tanto pelo MAC-ELISA para zika quanto pelo PRNT. Os resultados de LCR foram de acordo com o teste de soro emparelhado.

Avaliação de desempenho com infecções primária e secundária pelo zika, estado de Yap, Micronésia, 2007

O MAC-ELISA para zika do CDC foi incluído em uma bateria de métodos imunológicos de flavivírus do MAC-ELISA e PRNT para avaliação de amostras de soro emparelhadas de 11 casos de zika vírus identificados em um surto de zika no estado de Yap, Micronésia, em 2007 (Lanciotti, et al., 2008). No momento desse surto, o MAC-ELISA para zika empregava sacarose-acetona extraída sugando o antígeno do cérebro de camundongos. Quatro dos 11 casos são infecções primárias por flavivírus, e sete são prováveis infecções secundárias por flavivírus.

Dos soros emparelhados coletados e avaliados na publicação, somente um paciente tinha pelo menos uma amostra de soro dentro do nosso período alegado de ≥ 4 dias após o início dos sintomas e < 12 semanas após o início dos sintomas. Para cada um dos dez casos restantes, a primeira amostra de soro coletada dentro do nosso período alegado está incluída em nossa análise.

Os resultados do MAC-ELISA para zika para essas amostras são comparados aos seus resultados do teste de neutralização pela redução de placas (PRNT), o padrão ouro para teste imunológico de flavivírus.

Tabela 4: Resumo de resultados do MAC-ELISA para zika e PRNT para flavivírus para as primeiras amostras dentro do período para infecções por zika primárias e secundárias no estado de Yap, Micronésia, 2007

	Caso	Amostra	Dias após o início dos sintomas	MAC-ELISA para zika	PRNT (7 flavivírus)
Infecções primárias	822	822a	5	23,2	zika
	830	830b	21	16,3	zika
	849	849b	18	18,2	zika
	862	862a	6	25,4	zika
Infecções secundárias prováveis	817	817b	19	8,1	flavivírus
	833	833b	19	3,1	zika
	844	844b	16	12,7	dengue
	955	955b	14	10,9	flavivírus
	968	Nenhuma amostra dentro do período alegado			
	839	839b	20	17,2	zika
	847	847a	5	0,94	febre amarela

		Resultados de PRNT (7 flavivírus)			
		zika	flavivírus	dengue	febre amarela
MAC-ELISA para zika	Positivo	6	2	1	0
	Negativo	0	0	0	1

Infecções primárias:

Os quatro casos identificados como infecções primárias produziram resultados positivos do MAC-ELISA para zika para sua amostra de soro inicial dentro do período. Essas quatro amostras também produziram resultados positivos pelo PRNT para infecção pelo zika vírus.

Infecções secundárias (prováveis):

Dos seis casos com amostras de soro dentro do período, cinco produziram resultados positivos para as amostras de soro iniciais dentro do período pelo MAC-ELISA para zika. Duas delas (833b e 839b) produziram resultados claramente positivos para infecção pelo zika vírus pelo PRNT. Duas outras amostras (817b e 955b) produziram resultados maiores pelo PRNT para zika vírus do que qualquer outro flavivírus testado. Entretanto, esses resultados não foram 4 vezes maiores que todos os outros resultados, portanto foram interpretados como positivos para flavivírus pelo PRNT. A amostra restante produziu resultados positivos no MAC-ELISA para zika e resultados 4 vezes mais altos no PRNT para dengue do que para zika, a única amostra para a qual o PRNT não concordou com o MAC-ELISA para zika.

A amostra 847a, uma amostra do dia 5, foi negativa no MAC-ELISA para zika e foi positiva para o vírus da febre amarela no PRNT. Não foi observado nenhum efeito de neutralização para zika pelo PRNT. Portanto, os resultados do MAC-ELISA e do PRNT para essa amostra estão de acordo.

Contato

Perguntas ou comentários sobre este procedimento (somente da EUA) podem ser direcionados ao helpdesk da Rede de Laboratórios de Resposta (LRN): LRN@cdc.gov.

Referências

Johnson, AJ, Martin, DA, Karabatsos, N and Roehrig, JT. *Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay*. J. Clinical Microbiology, 38:1827-1831, 2000.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, and Winn Jr. WC , (Eds). *Diagnosis of Infections caused by Viruses, Chlamydia, Rickettsia*, Diagnostic Microbiology, 4ª edição, JB Lippicott Co: 956-1074, 1992.

Lanciotti, RS, O.L. Kosoy, J.J. Laven, J.O. Velez, A.J. Lambert, A.J. Johnson, S.M. Stanfield e M.R. Duffy. *Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronésia, 2007*. Emerg Infect Dis. 2008 (Ago); 14(8): 1232-1239.

Monath, TP, Nystrom, RR, Bailey, RE, Calisher, CH, and Muth, DJ: *Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis*. Journal of Clinical Microbiology 20:784-790, 1984.

Martin, DA., Muth, DA., Brown, T., Karabatsos, N., and Roehrig, JT. *Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays (MAC-ELISA) for routine diagnosis of arboviral infections*. Journal of Clinical Microbiology 38:1823-1826, 2000.

Tsai, TH: *Arboviruses*, In Rose NR, Marcario EC, Fahey JL, Friedman H, and Penn GM, (Eds):

Manual of Clinical Laboratory Immunology, 4ª edição, American Society for Microbiology: 606-618, 1976.

ANEXO 2: Aprovação do CEP

INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DA EMENDA								
Título da Pesquisa: Exposição Vertical ao Zika Vírus e suas conseqüências no neurodesenvolvimento da criança								
Pesquisador: maria elisabeth lopes moreira								
Área Temática:								
Versão: 3								
CAAE: 52675616.0.0000.5269								
Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS								
Patrocinador Principal: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 1.558.751								
Apresentação do Projeto: Emenda								
Objetivo da Pesquisa: Objetivo da emenda								
<ul style="list-style-type: none"> - Melhorar a descrição dos objetivos qualitativos e dos exames a serem realizados - Incluir um TCLE próprio para os recém-nascidos externos - Incluir da carta do SCTIE sobre co-patrocínio do governo brasileiro - Incluir declaração de responsabilidade bio-repositorio 								
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Exposto no projeto inicial.								
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Pesquisa relevante								
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: A pesquisadora acrescentou um novo TCLE para ser aplicado às mães e aos bebês que nasceram em outras unidades que não o IFF e que estão sendo recrutados para realizarem o acompanhamento do desenvolvimento das crianças no IFF. O termo está adequado.								
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>Endereço: RUI BARBOSA, 716</td> <td style="text-align: right;">CEP: 22.250-020</td> </tr> <tr> <td>Bairro: FLAMENGO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: RJ</td> <td>Município: RIO DE JANEIRO</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (21)2554-1730</td> <td>Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepff@ff.fiocruz.br</td> </tr> </table>	Endereço: RUI BARBOSA, 716	CEP: 22.250-020	Bairro: FLAMENGO		UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO	Telefone: (21)2554-1730	Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepff@ff.fiocruz.br
Endereço: RUI BARBOSA, 716	CEP: 22.250-020							
Bairro: FLAMENGO								
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO							
Telefone: (21)2554-1730	Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepff@ff.fiocruz.br							
Página 01 de 02								

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Continuação do Parecer: 1.558.751

Recomendações:

Enviar ao CEP relatórios semestrais e final.

O TCLE e TALE só poderá ser aplicado após assinatura e carimbo do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovar

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimentoparaexternos1RN.doc	24/05/2016 16:01:27	Ana Maria Aranha Magalhães Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimentogestante.doc	24/05/2016 16:00:50	Ana Maria Aranha Magalhães Costa	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_724076 E2.pdf	23/05/2016 11:42:16		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.pdf	23/05/2016 11:33:58	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração do Patrocinador	cartaSCTIE.pdf	23/05/2016 11:13:13	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleversao2gestante.doc	23/05/2016 11:11:03	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleRN.doc	23/05/2016 10:17:44	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	RevisaoZika.doc	23/05/2016 10:17:23	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	neonatologia.pdf	22/01/2016 16:44:50	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de	pediatria.pdf	22/01/2016	maria elisabeth	Aceito

Endereço: RUI BARBOSA, 716
Bairro: FLAMENGO CEP: 22.250-020
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepff@ff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Continuação do Parecer: 1.558.761

Instituição e Infraestrutura	pediatria.pdf	16:44:28	lopes moreira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	22/01/2016 16:43:15	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	obstetricia.pdf	22/01/2016 16:35:54	maria elisabeth lopes moreira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 24 de Maio de 2016

Assinado por:

Ana Maria Aranha Magalhães Costa
(Coordenador)

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-6491

E-mail: cepif@ff.fiocruz.br

ANEXO 3: TCLE para nascidos no IFF**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Exposição Vertical ao Zika Vírus e suas consequências no neurodesenvolvimento da criança****Pesquisadora:** Maria Elisabeth Lopes Moreira

Contato: Avenida Rui Barbosa 716, telefone (21) 25541911

Instituição: Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente**Endereço:** Avenida Rui Barbosa 716, Flamengo.

Nome da gestante _____

Prontuário: _____

Estamos convidando o seu bebê e você a participar da pesquisa intitulada “Exposição Vertical ao Zika vírus e suas consequências no neurodesenvolvimento da criança” pois você ficou grávida em um período onde o vírus está circulando.

Algumas vezes, pessoas que tiveram contato com o vírus da Zika não apresentam sintomas por isso iremos realizar esta pesquisa com um grupo de mães e recém nascidos que nasçam neste período em que o vírus da Zika está circulando, e queremos acompanhar você e o crescimento e desenvolvimento neurológico do seu filho do nascimento até o

final do terceiro ano de vida.

Para isto você e seu filho serão acompanhados no IFF desde a gestação até o final do terceiro ano de vida da criança.

Os seguintes exames serão obtidos para fins desta pesquisa:

- 1- Na mãe: Exame de sangue e ou urina para saber se teve contato com o vírus da Zika e outros vírus como citomegalovírus, rubéola, dengue e chikungunya e toxoplasmose; Ultrassonografias seriadas e outros exames que forem necessários para o seu adequado pré-natal. Estes exames serão colhidos se você apresentar algum sintoma para virose como vermelhidão da pele, febre, dor no corpo, dor na cabeça. Se você não apresentar sintomas vamos colher sangue para armazenar e fazer testes sorológicos em cada trimestre da gravidez ou a cada vez que você precisar de colher sangue para a sua gravidez. Se a ultrassonografia apresentar alguma anomalia congênita e você tiver indicação obstétrica, será também realizada punção de líquido amniótico para realização de testes genéticos e pesquisa do vírus. Punção de líquido amniótico tem um risco de perda fetal associado ao procedimento de 0,5% (a perda de um feto a cada 200 exames realizados) e só será indicada se estritamente necessária para melhorar o diagnóstico.
- 2- No recém-nascido: Exame de sangue do cordão umbilical no momento do nascimento para saber se teve contato com o vírus da Zika e outros vírus como citomegalovírus, rubéola, dengue e Chikungunya e toxoplasmose; ultrassonografia da moleira e/ou tomografia e/ou ressonância nuclear magnética, eletroencefalograma, exames com oftalmologista, exames auditivos e exame neurológico. Todos estes exames serão feitos e colhidos logo após o nascimento

- e se for necessário, os exames serão repetidos de tempos em tempos;
- 3- O bebe será acompanhado para verificar se o crescimento e nutrição estão adequados. Para isto, ele será pesado e medido de tempos em tempos e também fará exames para avaliar a composição do corpo, ou seja, quantidade de músculo, gordura e água no corpo. Este exame é feito colocando o bebe dentro de um equipamento que parece uma incubadora, e dentro do aparelho vai haver uma corrente de ar, que é quentinho, passando pelo corpo dele. O exame não dói e não traz nenhum desconforto para a criança;
 - 4- O recém-nascido será acompanhado em relação ao desenvolvimento até completar 3 anos. Exames para acompanhar o desenvolvimento serão realizados com psicólogos através da aplicação de testes de desenvolvimento próprios para cada idade;
 - 5- Se você estiver amamentando e tiver vermelhidão na pele e/ou outros sintomas de Zika no momento em que vier aqui, também iremos colher amostras de sangue suas e de seu bebe e também amostras do seu leite sequenciais, mais ou menos de 15/15 dias.
 - 6- Se o seu filho apresentar alterações como microcefalia ou outras malformações, será colhido exames genéticos para avaliar se a causa da malformação se deve ao Zika ou se há outras causas;
 - 7- Sua placenta e o sangue do cordão umbilical também serão examinados. Será colhido sangue do cordão umbilical para evitar coletas de sangue no bebe e este sangue também será utilizado para cultivo de células para estudar melhor o vírus;
 - 8- Se você perder o bebê, também estamos solicitando sua autorização para que ele seja examinado pela anatomia patológica com exames específicos (morfológicos

e de imunohistoquímica) para tentar descobrir os motivos.

- 9- Se você estiver amamentando e tiver vermelhidão na pele e/ou outros sintomas de zika, também iremos colher amostras de sangue suas e de seu bebe e também amostras do seu leite sequenciais.

Como atualmente, existem poucos conhecimentos científicos sobre a Zika, estamos pedindo sua autorização para armazenar amostras de sangue/urina, de placenta e de tecidos fetais (se houver perda do bebê) em um local específico (biorepositório) para futuros estudos. As amostras serão usadas para estudar viroses e suas consequências na gravidez. Se houver alguma alteração nos seus exames ou alterações no seu bebe solicitamos também autorização para uso de imagem através de fotografias que não serão identificadas. Você também responderá a alguns questionários próprios do estudo.

Os riscos relacionados a sua participação na pesquisa são os mesmo que ocorrem em uma coleta de sangue, como hematomas e dor, tanto em você como no seu bebe. Os exames oftalmológicos necessitam de colírios para dilatar a pupila o que pode ocasionar ardência passageira. Ultrassonografias não doem e outros exames que envolvam radiação só serão realizados se houver alteração na ultrassonografia ou alguma indicação muito importante. Se estes exames forem alterados os exames de ressonância magnética serão realizados já que eles são necessários para o acompanhamento do bebe. Exames de ressonância costumam necessitar de anestesia ou sedação que será feita por profissional capacitado. Entretanto, se conseguirmos fazer o exame nos primeiros 2 meses de vida poderemos evitar a sedação. Os exames para testar o desenvolvimento adequado não causam dor e apenas precisam de certo tempo para realização. Os benefícios estão ligados ao acompanhamento da sua gravidez e do desenvolvimento do seu recém-nascido no IFF, com vários exames. Você receberá uma cópia dos resultados de todos os exames.

A sua participação e de seu filho/a nesta pesquisa é voluntária e você pode abandonar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo ao tratamento ou acompanhamento do bebe nesta instituição. Em caso de saída do estudo você e seu bebê continuaram a ser atendidos no IFF conforme rotina atual da instituição. Sua participação no estudo não implicará em custos adicionais, não haverá qualquer despesa com a realização dos procedimentos previstos neste estudo. Também não haverá nenhuma forma de pagamento pela sua participação. Se houver dano a você ou seu bebe relacionado a procedimentos da pesquisa você terá direito a indenização. Todos os resultados dos exames ficarão no seu prontuário médico.

Este documento foi elaborado em duas vias. Você receberá a via original deste documento assinado e com todas as páginas rubricadas, tanto pela pesquisadora quanto por você ou o responsável que assinar.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Fernandes Figueira é um comitê de avaliação ética dos projetos de pesquisa que estejam em curso na instituição. O CEP funciona de segunda à sexta-feira, no horário das 08 às 17 h, e se encontra a disposição para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias (e mail: cepiff@iff.fiocruz.br; telefone: 2554-1730/fax: 2552-8491).

Estamos solicitando abaixo seu consentimento livre, esclarecido e voluntario na qualidade de participante da pesquisa e responsável pelo recém nascido:

Em relação a filmagem e uso de imagem você pode:

[] autorizar voluntariamente a fotografia/filmagem do seu filho (a) e a utilização das imagens obtidas exclusivamente em meios de divulgação acadêmicos.

_____ assinatura

Em relação a guarda de material biológico em biorepositorio para futuros exames sem necessidade de solicitação de outro termo semelhante a este você pode:

[] autorizar voluntariamente o armazenamento de material biológico para futuros estudos _____assinatura

Declaração:

- 1- Declaro que li e entendi todo o conteúdo deste documento.
- 2 – Declaro que entendi que a participação na pesquisa pode ocorrer sem que meu filho (a) seja fotografado e/ou filmado, a não ser que eu tenha autorizado a filmagem ou fotografia e que também posso participar sem autorizar a guarda de material biológico para estudos futuros.

3- Declaro estar recebendo uma via original deste documento assinado pelo Investigador Responsável e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas.

Responsável:

Data:

Telefone:

Pesquisadora Responsável

Data:

Instituto Fernandes Figueira

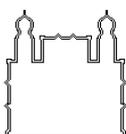
Av. Rui Barbosa 716

Flamengo, Tel.: 2554-1739

Testemunha

Documento/ Telefone

ANEXO 4: TCLE nascidos externos ao IFF



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Fernandes Figueira



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para mães de bebês nascidos externos ao IFF

Exposição Vertical ao Zika Virus e suas conseqüências no neurodesenvolvimento da criança

Pesquisadora: Maria Elisabeth Lopes Moreira

Contato: Avenida Rui Barbosa 716, telefone (21) 25541911

Instituição: Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente

Endereço: Avenida Rui Barbosa 716, Flamengo.

Nome do recém nascido ou lactente _____

Prontuário: _____

Nome da mãe _____

Estamos convidando o seu bebê e você a participar da pesquisa intitulada “Exposição Vertical ao Zika vírus e suas conseqüências no neurodesenvolvimento da criança” pois você ficou grávida em um período onde o vírus está circulando.

Algumas vezes, pessoas que tiveram contato com o vírus da Zika não apresentam sintomas, por isso iremos realizar esta pesquisa com um grupo de recém nascidos que nasçam neste período em que o vírus da Zika está circulando, e queremos acompanhar o crescimento e o desenvolvimento neurológico do seu filho do nascimento até o final do terceiro ano de vida.

Para isto o seu filho será acompanhado nos ambulatórios de pediatria, doenças

infeciosas e neurologia do IFF. Você e seu filho terão seus exames colhidos serão acompanhados até o final do terceiro ano de vida da criança.

Se o bebe já tiver nascido fora do IFF, você deverá trazer todos os exames que você fez no pré-natal, seu cartão de pré-natal e a caderneta da criança, porque vamos anotar os dados relacionados ao seu pré-natal, a presença ou ausência de sintomas de Zika durante a gravidez e outros dados sobre o parto e exames do bebê. Os seguintes exames serão obtidos para fins desta pesquisa:

Em você: Exame de sangue e urina para saber se teve contato com o vírus da Zika e outros vírus como dengue e chikungunya. Se você não tiver tido sintomas de Zika, vamos colher sangue para armazenar e fazer testes sorológicos futuros quando houver um bom teste disponível. Se você não tiver realizado os exames para toxoplasmose rubéola e herpes vamos fazer agora.

No recém-nascido: Exame de sangue, se houver indicação, para saber se teve contato com o vírus da Zika e outros vírus como citomegalovírus, rubéola, dengue e chikungunya e toxoplasmose e se o sangue do cordão umbilical não tiver sido colhido; ultrassonografia da moleira e/ou tomografia e/ou ressonância nuclear magnética, eletroencefalograma, exames com oftalmologista, exames auditivos e dos olhos, com fotos de fundo de olhos se houver alguma alteração e exames de potencial evocado, exame neurológico e genético. Todos estes exames serão feitos e colhidos logo após o nascimento ou assim que o seu filho vier. Também vamos colher um swab bucal do bebe. Este swab parece um cotonete e será esfregado na bochecha interna da boca do bebe.

O bebe será acompanhado para verificar se o crescimento e nutrição estão adequados. Para isto, ele será pesado e medido de tempos em tempos e também fará exames para avaliar a composição do corpo, ou seja, quantidade de músculo, gordura e

água no corpo. Este exame é feito colocando o bebe dentro de um equipamento que parece uma incubadora, e dentro do aparelho vai haver uma corrente de ar, que é quentinho, passando pelo corpo dele. O exame não dói e não traz nenhum desconforto para a criança.

Depois o recém-nascido será acompanhado até completar 3 anos. Exames para acompanhar o desenvolvimento serão realizados e também outros exames auditivos e oftalmológicos se necessários;

Se você estiver amamentando e tiver vermelhidão na pele e/ou outros sintomas de Zika no momento em que vier aqui, também iremos colher amostras de sangue suas e de seu bebe e também amostras do seu leite sequenciais, mais ou menos de 15/15 dias;

Se o seu filho apresentar alterações como microcefalia ou outras malformações, será colhido exames genéticos para avaliar se a causa da malformação se deve ao Zika ou se há outras causas;

Como atualmente, existem poucos conhecimentos científicos sobre a Zika, estamos pedindo sua autorização para armazenar amostras de sangue/urina suas e do bebe e o swab bucal em um local onde ele será congelado (biorepositório) para futuros estudos. As amostras serão usadas para estudar viroses e suas consequências na gravidez deste bebê. Se houver alguma alteração nos seus exames ou nos do seu bebê, solicitamos autorização para uso de imagem através de fotografias que não serão identificadas.

Os riscos relacionados a sua participação na pesquisa são os mesmo que ocorrem em uma coleta de sangue, como hematomas e dor, tanto em você como no seu bebe. Os exames oftalmológicos necessitam de colírios para dilatar a pupila o que pode ocasionar ardência passageira. Ultrassonografias não doem e outros exames que envolvam radiação só serão realizados se houver alteração na ultrassonografia ou alguma indicação muito importante. Se estes exames forem alterados, os exames de ressonância magnética serão

realizados pois eles são necessários para o acompanhamento do bebe.

Exames de ressonância costumam necessitar de anestesia ou sedação, que será feita por profissional capacitado, mas se ela for feita nos primeiros 2 meses de vida pode ser feita sem sedação, por isto preferimos fazer neste período e só repetir se for necessário para o tratamento da criança. Os exames para testar o desenvolvimento adequado não causam dor e apenas precisam de um certo tempo para realização. Os benefícios estão ligados ao acompanhamento do crescimento e do desenvolvimento do seu recém-nascido no IFF, com vários exames. Você receberá uma cópia dos resultados de todos os exames.

A sua participação e de seu filho/a nesta pesquisa é voluntária e você pode abandonar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo ao tratamento ou acompanhamento do bebe nesta instituição. Em caso de saída do estudo você e seu bebê continuaram a ser atendidos no IFF conforme rotina atual da instituição. Sua participação no estudo não implicará em custos adicionais, não haverá qualquer despesa com a realização dos procedimentos previstos neste estudo. Também não haverá nenhuma forma de pagamento pela sua participação. Se houver dano a você ou seu bebe relacionado a procedimentos da pesquisa você terá direito a indenização. Todos os resultados dos exames ficarão no seu prontuário médico.

Este documento foi elaborado em duas vias. Você receberá a via original deste documento assinado e com todas as páginas rubricadas, tanto pela pesquisadora quanto por você ou o responsável que assinar.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Fernandes Figueira é um comitê de avaliação ética dos projetos de pesquisa que estejam em curso na instituição. O CEP funciona de segunda à sexta-feira, no horário das 08 às 17 h, e se encontra à disposições para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam

necessárias (e mail: cepiff@iff.fiocruz.br; telefone: 2554-1730/fax: 2552-8491).

Estamos solicitando abaixo seu consentimento livre, esclarecido e voluntario na qualidade de participante da pesquisa e responsável pelo recém nascido:

Em relação a filmagem e uso de imagem você pode:

[] autorizar voluntariamente a fotografia/filmagem do seu filho (a) e a utilização das imagens obtidas exclusivamente em meios de divulgação acadêmicos.

assinatura

Em relação a guarda de material biológico para exames futuros sem necessidade de obtenção de outro termo semelhante a este, você pode autorizar ou não também. Se você autorizar por favor, assine abaixo.

() Declaro que autorizo o armazenamento de material biológico para futuros estudos [] _____ assinatura

Declaração:

1- Declaro que li e entendi todo o conteúdo deste documento.

Responsável

Data:

Telefone

Pesquisadora

Data:

Instituto Fernandes Figueira

Av. Rui Barosa,716 – Flamengo

Testemunha

Documento:

Telefone: