

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

CAMILA GIUBERTI DE SOUZA

**O vírus Zika na gestação:
Um estudo prospectivo em coorte de gestantes e seus conceptos.**

VITÓRIA
2020

CAMILA GIUBERTI DE SOUZA

**O vírus Zika na gestação:
Um estudo prospectivo em coorte de gestantes e seus conceptos.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas, na área: Medicina II, grande área: Ciências
Orientador: Dr. Reynaldo Dietze.

VITÓRIA
2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S719v Souza, Camila Giuberti de, 1984-
O vírus Zika na gestação: um estudo prospectivo em coorte de
gestantes e seus conceitos / Camila Giuberti de Souza. - 2020.
143 f. : il.

Orientador: Reynaldo Dietze.
Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Infecção pelo vírus Zika. 2. Gravidez. 3. Imunidade. 4.
Transmissão. 5. Diagnóstico. 6. Transtornos do
neurodesenvolvimento. I. Dietze, Reynaldo. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III.
Título.

CDU: 61



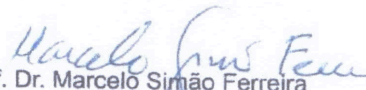
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE TESE DE DOUTORADO

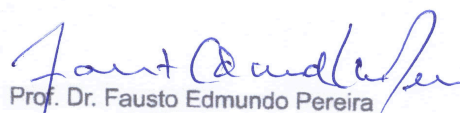
A doutoranda Camila Giuberti de Souza apresentou a tese intitulada "Aspectos da infecção pelo Zika na gestação: Um estudo prospectivo em coorte de gestantes do ES, Brasil" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

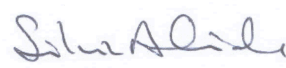
Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu **aprovar** a tese habilitando Camila Giuberti de Souza a obter o Grau de DOUTOR(A) EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

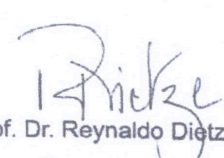
Vitória - ES, 14 de dezembro de 2020.


Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
(Membro Interno)


Prof. Dr. Marcelo Simão Ferreira
(Membro Externo)


Prof. Dr. Fausto Edmundo Pereira
(Membro Interno)


Profa. Dra. Sílvia Almeida
(Membro Externo)


Prof. Dr. Reynaldo Dietze
(Orientador)

A todas as famílias, sobretudo às mães, cujas vidas foram afetadas pelos medos, pelas incertezas e consequências da infecção pelo vírus Zika na gestação.

À memória de meu pai, Osvaldo, que desejava imensamente me ver concluindo esse estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, dr. Reynaldo Dietze, pela mentoria e confiança depositada em mim durante toda a execução desse trabalho.

À Juliana Carnielli, Keyla Fonseca, Solange Vinhas e Mariane Monfardini pelo suporte técnico laboratorial durante períodos do estudo; à Cristiane Oliveira e Alessandra Rodrigues, que realizaram o agendamento das visitas dos participantes, coletas de amostras, e tiveram o cuidado do com a manutenção do vínculo e acompanhamento os participantes da coorte.

À Helena Barroso pelo acompanhamento ginecológico e obstétrico das participantes e à Anna Lúcia Campos pela realização das ultrassonografias e acompanhamento de participantes.

Ao dr. Paulo Merçon de Vargas, pelas análises histopatológicas das placentas, cálculos de idade gestacional, do desenvolvimento físico fetal e pós-natal.

À equipe da maternidade do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes pelo suporte no acompanhamento das gestantes e dos partos;

À Elisa Vitoria Caetano e Tamara Abraham pelo acompanhamento neurológico das crianças;

À Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo, pelo referenciamento dos casos e fornecimento de informações epidemiológicas;

Agradeço também à Sallie Permar, Ralph Corey, Tulika Singh, Dmitry Tchapyjnikov e demais colaboradores da Universidade Duke, pela importantíssima parceria na execução e obtenção de resultados desse projeto. Ao dr. Aravinda da Silva, Caesar Lopez e demais colaboradores indiretos da Universidade UNC pela realização dos Testes de Neutralização

À Sarah Jenkins, Maria Silva e Carolina Guevara e demais membros do departamento de Doenças Virais Emergentes do NAMRU-6, Peru, e à dra. Silvia Almeida, durante sua passagem pela Universidade Federal do Espírito Santo, pelo suporte laboratorial no isolamento viral em cultura de células.

Aos professores da Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da UFES, Fausto Edmundo Pereira, Rodrigo Rodrigues, Moisés Palaci, Daniel Claudio Oliveira, Carlos Graeff, pelo suporte intelectual e ao professor Jaime Combadão pelo orientação em parte as análises estatísticas.

Aos meus colegas de profissão, e amigos, Lorenzo Lyrio e Ronaldo Bragança pelas discussões e troca de experiências científicas.

Aos meus colegas do NDI e da Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, que de alguma forma participaram dessa jornada acadêmica e científica;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo - FAPES e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo suporte financeiro;

E, sobretudo, agradeço às participantes do estudo que, num momento de incertezas relacionadas ao conhecimento do Zika e de suas consequências, concordaram em participar e fornecer suas amostras.

RESUMO

Zika vírus (ZIKV) é um vírus da família *Flaviviridae*, transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*. No início de 2015 foram confirmados os primeiros casos de transmissão autóctone de vírus Zika no Brasil e a partir daí, a infecção pelo ZIKV durante a gestação foi associada a ocorrência de um espectro malformações congênitas no feto, sendo o mais marcante a microcefalia, o que levou a um alerta de saúde global. Muitos aspectos da infecção pelo ZIKV ainda não estão claros, dessa forma é crucial a execução de estudos que visam esclarecer aspectos sobre a transmissão materno fetal e o acompanhamento, a longo prazo, das crianças expostas ao ZIKV no período pré-natal. Sendo assim, o presente trabalho objetivou compreender aspectos virológicos e imunológicos da infecção pelo ZIKV na gestação e seu impacto nos primeiros anos de vida das crianças nascidas, através de uma coorte de 58 casos suspeitos de infecção pelo Zika na gestação, ocorridos no Espírito Santo, Brasil, entre anos de 2015 a 2017. Os resultados aqui obtidos demonstraram que após uma infecção por ZIKV ocorrida durante o segundo trimestre de gestação, o vírus pode, ainda, ser detectado no leite materno do pós parto, porém sem sinal de transmissão para os recém-nascidos amamentados. Além disso, demonstramos aqui que a infecção pelo ZIKV na gestação não prejudica a transferência materno-fetal de anticorpos, tanto os específicos para ZIKV e flavivírus, quanto aqueles produzidos pela vacinação prévia da mãe, e importantes para a proteção do neonato. Mais ainda, pudemos observar que crianças expostas ao ZIKV no período pré-natal, sem microcefalia ao nascimento, podem apresentar maior risco de achados anormais no encéfalo observados em exame de imagem, no entanto, apresentam desenvolvimento cognitivo normal nos primeiros 2 anos e meio de vida, não diferente das crianças não-expostas ao ZIKV. Por fim, contribuimos para o desenvolvimento de um antígeno viral com bom potencial para ser utilizado em plataformas diagnósticas simples e capaz de sobrepor as limitações causadas por reações cruzadas apresentadas pelos dos atuais testes sorológicos.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is Flaviviridae family member virus, transmitted mainly by *Aedes* mosquitoes. In early 2015, the first cases of autochthonous transmission of Zika in Brazil were confirmed and the infection, during pregnancy, has been associated with a spectrum of congenital malformations, the most striking being microcephaly. Many aspects of ZIKV infection are not clear yet, so it is crucial to conduct studies that target aspects of mother-to-child transmission and the long-term monitoring of children prenatally exposed to ZIKV. Thus, the present study aimed to understand virological and immunological aspects of ZIKV infection during pregnancy and its impact on the first years of life of congenitally ZIKV exposed infants, through a cohort of 58 suspected cases of Zika infection during pregnancy, occurred in Espírito Santo, Brazil, between 2015 and 2017. Our results show that after a ZIKV infection during second trimester of pregnancy, virus can still be detected in postpartum breast milk, however with no evidence of transmission to breastfed newborns. In addition, we demonstrate here that ZIKV infection during pregnancy does not impair the efficiency of maternal-fetal transference of antibodies – the specific for ZIKV and flavivirus, and those vaccine-elicited – which plays an important role for the neonate protection. Furthermore, we observed that children congenitally exposed to ZIKV, without microcephaly at birth, present higher prevalence of cerebral anomalies on head imaging at birth, which supports the performance of these exams, even when the child does not present microcephaly. However, non-microcephalic congenitally exposed ZIKV infants present normal cognitive development within the first 2.5 years of life. Finally, we contributed to the development of a viral antigen that has much potential to be used in simple diagnostic platforms and can overcome the cross reactions limitations of current serological tests.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Exacerbação Dependente de Anticorpos (do termo em inglês <i>Antibody Dependent Anhancement</i>)
AIMS	Escala Motora Infantil Alberta (do termo em inglês <i>Alberta Infant Motor Scale</i>)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Teste Cognitivo Adaptativo (do termo em inglês) <i>Cognitive Adaptive Test</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHIK	Chikungunya
CLAMS	Escalas de Marcos do Desenvolvimento Linqüístico e Auditivo (do termo em inglês <i>Clinical Linguistic & Auditory Milestone Scale</i>)
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DENV	vírus Dengue
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido Etileno diamino tetraacético
ES	Espírito Santo
FA	Febre Amarela
FBS	Soro Fetal Bovino (do termo em inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FAPES	Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo
FRNT	Teste de Redução de Focos por Neutralização (do termo em inglês <i>Focus Reduction Neutralization Test</i>)
HEIMABA	Hospital Estadual Infantil e Maternidade Alzir Bernardino Alves
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PRNT	Teste de Redução de Placas por Neutralização (do termo em inglês <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcriptase Reversa e Reação em cadeia da Polimerase
SCD	Síndrome do Choque da Dengue

SCZ	Síndrome Congênita do Zika
SESA	Secretaria de Estado da Saúde
SVO	Sistema de Verificação de Óbito
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
V01, V02, V03...	Visita (do protocolo do estudo) 01, visita 02, visita 03, etc.
VP	Visita parto (do protocolo do estudo)
VPP	Visita pós-parto (do protocolo do estudo)
WNV	vírus do Nilo Ocidental (do termo em inglês <i>West Nile Virus</i>)
ZIKV	vírus Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura do ZIKV.....	19
Figura 2 - Ciclo de transmissão do vírus Zika	24
Figura 3 - Fluxograma de procedimentos de inclusão de gestantes no estudo (forma prospectiva de arrolamento)	39
Figura 4 - Fluxograma de procedimentos de inclusão de participantes no estudo pela forma retrospectiva, implementado em 2019, objetivando aumentar o número de crianças para a avaliação do desenvolvimento neurológico.....	40
Figura 5 - Exemplo de layout da placa do teste ZIKV Detect 2.0 IgM Capture ELISA (Inbios International Inc.)	49
Figura 6 - Resultado do processo de inclusão de participantes no estudo.....	52

Capítulo I - EFICIENTE TRANSFERÊNCIA TRANSPLACENTÁRIA DE IGG EM MULHERES INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA DURANTE A GESTAÇÃO

Figura 1 – Algoritmo usado para categorizar a história de exposição a flavivírus de acordo com o teste de redução de focos por neutralização (FRNT-50) para ZIKV e DENV.....	66
Figura 2 – Histologia da placenta de uma participante infectada por ZIKV na gestação.....	70
Figura 3 – Resposta humoral de IgG ligantes e neutralizantes persistem durante a gestação.....	71
Figura 4 – Transferência transplacentária eficiente de IgG específica para flavivírus.....	71
Figura 5 – Infecção materna por ZIKV não prejudica a transferência transplacentária de IgG neutralizante para DENV	72
Figura 6 – Forte correlação de níveis de IgG elicitados por vacinas entre mãe e criança indicam eficiente transferência transplacentária durante infecção materna na gestação por ZIKV	73

Capítulo IV - DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS DE PROTEÍNA DO ENVELOPE PARA DIFERENCIAR SOROLOGICAMENTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA DA INFECÇÃO PELO VIRUS DENGUE

Figura 1 – Identificação das regiões antigênicas assumidas na proteína E específicas do ZIKV.....	118
Figura 2 – Análise dos antígenos recombinantes purificados por SDS-PAGE e cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).....	120
Figura 3 – Ligação do antígeno recombinante E80 com soro de pacientes com infecção por ZIKV e/ou DENV remota (A) e recente (B).....	121
Figura 4 – Ligação de Z-EDI e Z-EDII com soro de fase convalescente de pacientes com infecção remota (A e B) e recente (C e D) por ZIKV e/ou DENV.....	122
Figura 5 - Padrão de reatividade cruzada dos antígenos Z-EDIII (A) e Z-EDI (B) com amostras longitudinais de DENV.....	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critério de inclusão e exclusão de participantes no estudo.....	37
Quadro 2 - Amostras biológicas e método utilizado para coleta.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos da coorte incluída no estudo.....53

Capítulo I - EFICIENTE TRANSFERÊNCIA TRANSPLACENTÁRIA DE IGG EM MULHERES INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA DURANTE A GESTAÇÃO

Tabela 1 – Sintomatologia da coorte de participantes no momento da inclusão no estudo, baseado na detecção de ZIKV por RT-PCR.....67

Tabela 2 – Perfil humoral sorotipo específico para ZIKV e DENV.....68

Tabela 3 – Patologia placentária.....70

Capítulo II - PERSISTÊNCIA DE VÍRUS ZIKA INFECTANTE EM LEITE MATERNO APÓS INFECÇÃO OCORRIDA NA GESTAÇÃO

Tabela 1 – Características clínicas das 8 gestantes incluídas no estudo.....93

Tabela 2 – Detecção do vírus Zika infectante no leite materno do pós-parto de 8 mulheres que apresentaram infecção por Zika durante a gestação.....94

Tabela 3 – Avaliação das crianças ao nascimento e em visita de acompanhamento aproximadamente 3 meses após o nascimento.....95

Capítulo III - PREVALÊNCIA DE ACHADOS RADIOLÓGICOS NO ENCÉFALO E AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO COGNITIVO, ATÉ OS 2 ANOS E MEIO DE IDADE, EM CRIANÇAS NÃO-MICROCEFÁLICAS EXPOSTAS AO ZIKA NO PERÍODO PRE-NATAL

Tabela 1 – Pontuação nas Escalas Capute (CAT e CLAMS) de crianças não-microcefálicas expostas e não-expostas ao ZIKV no período pré-natal.....109

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	O vírus Zika	19
2.2	Histórico e Emergência	20
2.3	Aspectos clínicos	22
2.4	A transmissão	23
2.5	Patogênese e tropismo viral	25
2.6	A resposta imunológica na infecção pelo ZIKV	28
2.7	Diagnóstico laboratorial	29
2.8	A infecção na gestação e a Síndrome Congênita do Zika (SCZ)	31
3	JUSTIFICATIVA	34
4	OBJETIVOS	35
4.1	Objetivo geral	35
4.2	Objetivos específicos	35
5	MATERIAIS E MÉTODO	36
5.1	Critérios de inclusão de participantes e procedimentos do estudo	36
5.1.1	Determinação da idade gestacional no momento da infecção e do parto	41
5.1.2	avaliação do desenvolvimento motor e cognitivo e das crianças.	41
5.1.3	Espécimes clínicos	42
5.1.4	Amostras maternas	42
5.1.5	Amostras dos recém-nascidos	44
5.1.6	Definição do diagnóstico de Zika	47
5.2	A coorte incluída no estudo	51
6	RESULTADOS	55

CAPÍTULO I: Eficiente transferência transplacentária de IgG em mulheres infectadas pelo vírus Zika durante a gestação.....	56
CAPÍTULO II: Persistência de vírus Zika infectante em leite materno após infecção ocorrida na gestação.....	84
CAPÍTULO III: Avaliação do desenvolvimento neurológico, até os 2 anos e meio de idade, de crianças não-microcefálicas expostas ao Zika no período pré-natal	99
CAPÍTULO IV: Desenvolvimento de antígenos de proteína do envelope para diferenciar sorologicamente a infecção pelo vírus Zika da infecção pelo vírus Dengue	114
7 CONCLUSÃO	129
8 ASPECTOS ÉTICOS E SUPORTE FINANCEIRO.....	130
9 REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

Zika vírus (ZIKV) é um vírus da família *Flaviviridae*, transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, e que pode provocar uma doença leve, autolimitada, caracterizada clinicamente por exantema, artralgia e conjuntivite. Da sua descoberta, em 1947, até 2013, casos de infecção por esse vírus foram restritos à África e Ásia, se expandindo para ilhas do Pacífico. No início de 2015 foram confirmados os primeiros casos de transmissão autóctone do ZIKV no Brasil, marcando sua introdução nas Américas. A partir daí a infecção pelo ZIKV durante a gestação foi associada a ocorrência de um espectro de problemas congênitos no feto, sendo o mais marcante a microcefalia, o que levou a um alerta de saúde global.

Apesar do progresso ocorrido no conhecimento do ZIKV nos últimos anos, ainda não existem vacinas ou terapias licenciadas e persistem falhas no seu conhecimento, principalmente no que diz respeito à infecção na gestação e na sua transmissão materno-fetal. Além disso, ainda não está claro o espectro das consequências, a longo prazo, no desenvolvimento das crianças cujas mães apresentaram infecção pelo ZIKV durante a gestação. Ainda é de fundamental importância a compreensão da infecção natural na gestante e nos seus conceitos, de forma a contribuir para o desenvolvimento de vacinas, terapias, ferramentas diagnósticas e para a manutenção de medidas preventivas eficazes que reduzam o impacto dessa doença. Dessa forma, o presente estudo visa preencher algumas dessas lacunas – contribuindo especificamente para o entendimento dos fatores envolvidos na transmissão materno-fetal do ZIKV, para o estabelecimento de medidas adequadas para sua prevenção e no aprimoramento de protocolos de acompanhamento às crianças expostas – através de um estudo observacional prospectivo de uma coorte de mães com ZIKV e suas crianças, acompanhadas desde a gestação até os primeiros dois anos de vida.

Dado o caráter abrangente deste trabalho e pretendendo uma melhor compreensão pelo leitor, os resultados deste trabalho serão apresentados em capítulos. Antes, porém, serão apresentados o referencial teórico sobre o assunto, a justificativa para realização desse estudo, os objetivos, e os materiais e o método utilizados. Na sessão “materiais e método” será descrito também todas as informações sobre o arrolamento e as características da coorte de participantes, base

para a realização desse estudo. Os resultados serão apresentados em capítulos, onde cada um está alinhado a um dos objetivos pretendidos. Cada um desses capítulos traz uma introdução específica ao tema abordado, seguido pelo artigo já publicado ou o manuscrito que se encontra em processo de publicação. Na parte final será apresentada uma conclusão geral, resumizando todos os resultados aqui obtidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus da família Flaviviridae, gênero Flavivirus, que engloba cerca de 70 vírus, incluindo vírus de importância médica como o da Febre Amarela (YFV), Dengue (DENV), Febre do Nilo Ocidental (WNV) e Encefalite Japonesa (JEV). O ZIKV é transmitido, principalmente, através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). O vírus é envelopado, possui genoma de RNA em fita simples positiva, de aproximadamente 11kb que codifica uma única e longa poliproteína. Esta proteína é clivada por proteases em 3 proteínas estruturais: envelope (E); membrana (M) formada a partir de um precursor PrM, e capsídeo (C) e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) (FAYE et al., 2014). As proteínas estruturais, como o nome sugere, formam a estrutura da partícula viral. As proteínas não-estruturais contribuem na replicação e empacotamento do genoma, assim como na subversão dos mecanismos imunes do hospedeiro.

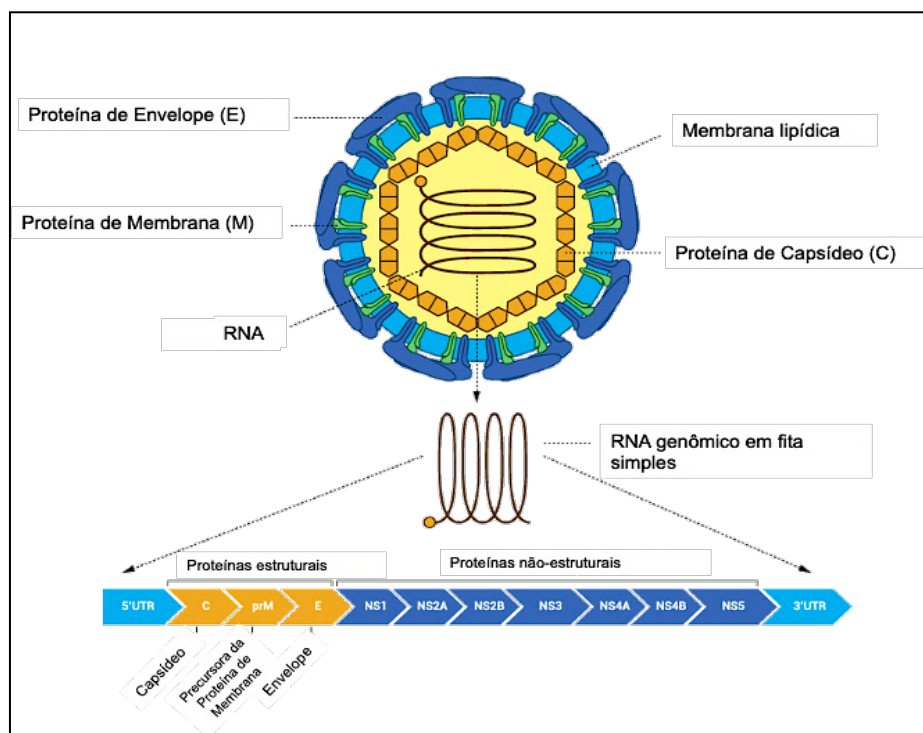


Figura 1 - Representação da estrutura do ZIKV.

Fonte: adaptado de <https://www.promega.com/>

[/media/images/inspiration/zika/ZikaVirusStructureIllustration.png](https://www.promega.com/media/images/inspiration/zika/ZikaVirusStructureIllustration.png) Representação da estrutura do ZIKV.

Análises filogenéticas recentes revelam que nos últimos 100 anos o ZIKV evoluiu basicamente em duas linhagens principais: a Africana e a Asiática. Os vírus recentemente isolados na emergência do ZIKV nas Américas possuem alta homologia com a linhagem Asiática (FAYE et al., 2014; WANG et al., 2016). A grande disseminação do mosquito vetor, o aumento populacional mundial em paralelo ao aumento da mobilidade intercontinental de pessoas e cargas, contribuíram para a expansão geográfica da doença (WEAVER et al., 2016).

2.2 Histórico e Emergência

O nome Zika, é alusivo à floresta Zika, localizada em Uganda, África, local onde o vírus foi isolado pela primeira vez, em 1947. Na ocasião, o isolamento do vírus foi realizado a partir de amostras de sangue de um macaco Rhesus, mantido como sentinela na floresta Zika, em um estudo sobre a Febre Amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Somente em 1964 o vírus foi relacionado à infecção em humanos (SIMPSON, 1964; WIKAN; SMITH, 2017). Nas décadas subsequentes, pouca importância clínica foi-lhe atribuída, devido principalmente ao pequeno número de casos notificados, restritos ao continente africano e Sudeste Asiático, onde a grande maioria dos pacientes apresentava sintomatologia leve com evolução benigna e autolimitada.

A situação mudou a partir de 2007, quando novos casos da doença foram notificados na Ilha Yap, Micronésia, com apresentação clínica semelhante ao Dengue, com exantema e artralgia, porém acrescida de conjuntivite (DUFFY et al., 2009). Testes rápidos (imunocromatográficos) positivos para DENV sugeriam ser este o agente etiológico, entretanto, amostras enviadas ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), para confirmação e sequenciamento do genoma viral mostraram que o agente etiológico, na verdade, possuía mais de 90% de homologia com o ZIKV de linhagem Asiática (LANCIOTTI et al., 2008). Em 2013 a mesma linhagem do vírus atingiu as ilhas da Polinésia Francesa causando uma grande epidemia, concomitante a casos de DENV, endêmico na região. Na ocasião, observou-se pela primeira vez casos da Síndrome neurológica de Guillain-Barré (SGB) em adultos, relacionados à infecção pelo ZIKV (CAO-LORMEAU et al., 2016, 2014; OEHLER et al., 2014). Em 2014, as epidemias de ZIKV atingiram outras ilhas

do Pacífico como Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014).

No Brasil a primeira confirmação oficial de casos autóctones da doença, ocorreu no início de 2015 no estado de Pernambuco, região Nordeste do país. Os casos notificados à época, eram de uma doença febril, de evolução benigna, com sintomas semelhantes à da infecção pelo DENV, porém com resultados laboratoriais negativos para essa infecção (ZANLUCA et al., 2015). Paralelamente à expansão da epidemia de ZIKV, nos últimos meses de 2015, o Ministério da Saúde recebeu uma notificação expressiva de casos de microcefalia congênita observada nos municípios daquela região. Devido a esse aumento alarmante no número de casos de microcefalia, nas primeiras semanas de novembro de 2015, o Ministério da Saúde declarou estado de emergência, convocando inclusive autoridades internacionais em saúde para auxiliar nas investigações (BRASIL, 2015a). Ao final de 2015 e início de 2016, a associação entre a infecção pelo ZIKV na gestação e a ocorrência de anormalidades neurológicas nos fetos foi confirmada por diversos estudos (BRASIL, 2015b; DE ARAÚJO et al., 2017; MLAKAR et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016). Tal fato, não havia sido observado em outras epidemias de ZIKV fora do Brasil, o que levou à um alerta de saúde global. Posteriormente, uma análise retrospectiva dos casos ocorridos na epidemia da Polinésia Francesa em 2013 confirmou a existência de casos de microcefalia congênita, em uma frequência acima da esperada, associada à infecção pelo ZIKV na gestação (CAUCHEMEZ et al., 2016).

Após a confirmação da transmissão autóctone no Brasil, a origem da introdução do ZIKV no país foi objeto de controvérsia. Inicialmente especulou-se que o ZIKV haveria entrado no país durante a Copa do Mundo de Futebol, em 2014, devido ao fluxo de equipes e turistas do mundo todo. Posteriormente, foi cogitado que a provável introdução do ZIKV no Brasil poderia ter ocorrido em agosto de 2014, quando ocorreu, no Rio de Janeiro, um campeonato de canoagem no qual participaram diversas equipes de países do Pacífico, locais nos quais o ZIKV já circulava. (MUSSO, 2015)

Em junho de 2017, um estudo utilizando modelagem matemática, estimou que o ZIKV havia sido introduzido e estabelecido no Brasil provavelmente entre outubro de 2013 e março de 2014, época anterior aos eventos esportivos citados (MASSAD

et al., 2017). Nos meses seguintes à essa publicação, foram publicados dois estudos que reforçam que o fato ocorreu ainda antes. Esses estudos relatam a detecção de ZIKV em amostras humanas e de mosquitos coletadas no Rio de Janeiro entre os meses de março a novembro de 2013. Os resultados mostraram que o ZIKV já circulava no Rio de Janeiro desde abril de 2013, e suportam a ideia de que o vírus tenha sido introduzido no país através de múltiplas entradas, entre outubro de 2012 a maio de 2013 (AYLLÓN et al., 2017; PASSOS et al., 2017)

No Espírito Santo (ES) as primeiras notificações de casos de ZIKV ocorreram em maio de 2015 (ESPÍRITO SANTO, 2016), entretanto, a confirmação laboratorial dos casos autóctones no estado só ocorreu em novembro do mesmo ano (BRASIL, 2015c). Entre janeiro de 2015 a dezembro de 2019, 6.135 casos da doença foram notificados, sendo os anos de 2015 e 2016 responsáveis por mais de 60% do total de notificações (DOS SANTOS, 2018; ESPÍRITO SANTO, 2019, 2020) .

2.3 Aspectos clínicos

Estima-se que entre 29% a 82% dos infectados pelo ZIKV não apresente manifestações clínicas da infecção (HABY et al., 2018). Os sinais e sintomas, quando presentes, são leves e incluem: exantema, artralgia, conjuntivite, febre, mialgia e cefaleia. Agravamento do quadro clínico, com necessidade de hospitalização é incomum (CDC, 2019a; DUFFY et al., 2009). Manifestações neurológicas mais graves, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), foram inicialmente observadas na epidemia de 2013 na Polinésia Francesa (OEHLER et al., 2014). Sua frequência estimada é baixa, ocorrendo em aproximadamente 1,23% dos indivíduos adultos infectados (BARBI et al., 2018).

Além da SGB, a manifestação clínica mais temida da infecção pelo ZIKV é a sua capacidade de produzir malformações fetais congênitas, com destaque para a microcefalia (BRADY et al., 2019; MLAKAR et al., 2016; PLATT; MINER, 2017), além de abortos no início da gestação (DUDLEY et al., 2018; VAN DER EIJK et al., 2016). A ausência de sintomas na infecção não implica necessariamente proteção contra suas possíveis complicações na gestação, como no estudo realizado por Honein e colaboradores em 2017, onde não houve diferença na frequência de microcefalia em

recém-nascidos de gestantes infectadas, que apresentaram, ou não, sintomas clínicos da doença (HONEIN et al., 2017).

Até o momento não há tratamento antiviral específico ou vacinas licenciadas para o ZIKV. O tratamento visa tão somente o controle dos sintomas, incluindo repouso, reposição hídrica e o uso de analgésicos e antipiréticos (CDC, 2019b).

2.4 A transmissão

O ZIKV, assim como outros arbovírus como DENV e o CHIKV, apresenta um ciclo bem estabelecido de transmissão urbana em regiões tropicais. Para esses vírus, existe também, em algumas regiões, a ocorrência de um ciclo silvestre de transmissão, envolvendo primatas e mosquitos de florestas (Figura 2). Apesar da possibilidade de um ciclo silvestre de transmissão, o ZIKV se tornou completamente adaptado ao ambiente urbano, o suficiente para sua manutenção. Independentemente desse fato, é importante mencionar que a existência de um ciclo silvestre pode apresentar implicações importantes para a saúde da população humana e reemergência dos casos (VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019).

A transmissão do ZIKV ocorre primariamente através da picada de mosquitos fêmeas infectados, do gênero *Aedes* (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019), porém a documentação da presença e da persistência do vírus em diferentes fluidos e compartimentos biológicos, como p. ex, urina, secreção vaginal, sêmen, saliva, leite materno, lágrima (DE M. CAMPOS et al., 2016; GOURINAT et al., 2015; MUSSO et al., 2015) e órgãos sólidos (NOGUEIRA et al., 2017), e o relato de casos da infecção na ausência do mosquito, levantaram preocupações acerca das vias não dependentes de vetor na transmissão e prevenção do ZIKV. Até o momento, entre os estudos realizados sobre o potencial de vias não dependentes do vetor, apenas as transmissões por via sexual e a transmissão vertical mãe-conceito intrauterino, apresentam bom grau de evidência científica. Outras rotas de transmissão do ZIKV já relatadas, como amamentação, *intrapartum*, por transfusões de sangue e por exposição laboratorial, apesar de possíveis, seu real impacto ainda permanece inconclusivo, com grau limitado de evidência, já que se baseiam em relatos de casos isolados (RUNGE-RANZINGER et al., 2019).

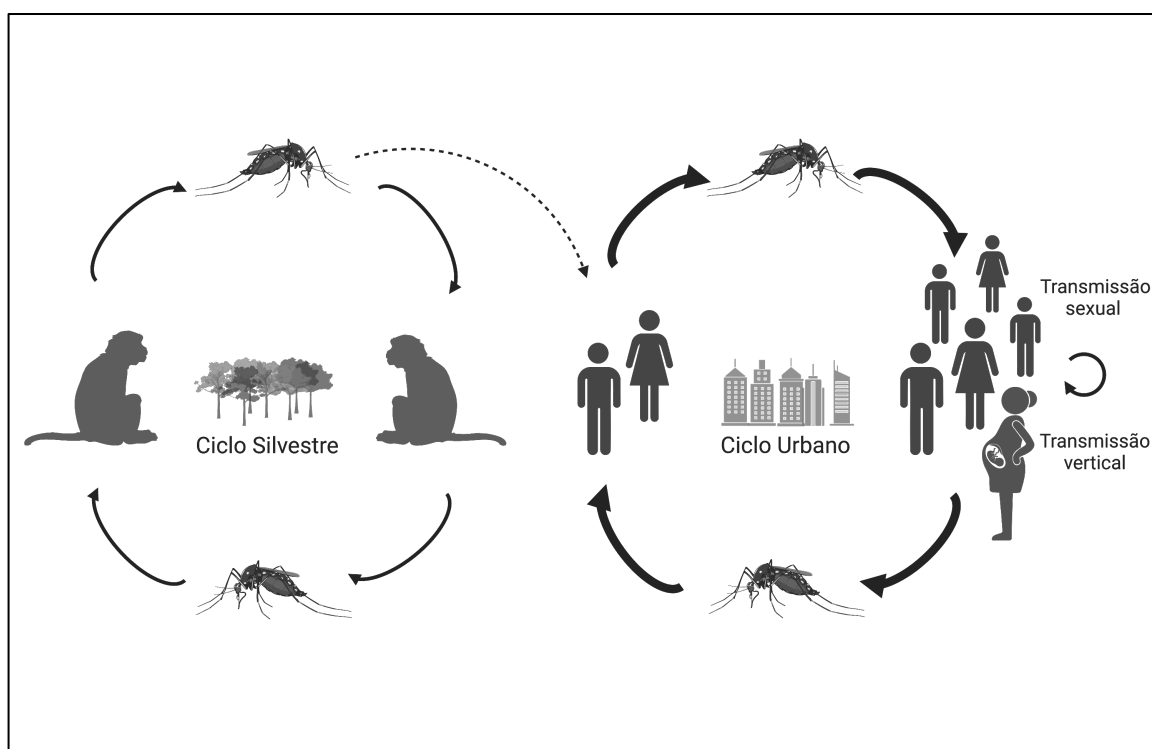


Figura 2 - Ciclo de transmissão do vírus Zika.

(Criado com BioRender.com)

As recomendações para a prevenção da infecção consistem em evitar a picada do mosquito transmissor, incluindo a utilização de repelentes e de utilização de barreiras, como roupas e telas protetoras. Como o ZIKV também pode ser transmitido sexualmente, é recomendada a utilização de preservativos, principalmente no caso de parceiras gestantes ou em idade fértil, pelo risco da infecção ao feto e suas consequências (CDC, 2019c). Não há contraindicação para a amamentação em caso de infecção pelo ZIKV. A Organização Mundial da Saúde (OMS) orienta a manutenção do aleitamento, já que de acordo com as evidências científicas publicadas até o momento, os benefícios do aleitamento materno ainda se sobrepõem ao risco de transmissão através desse fluido (WHO, 2016).

2.5 Patogênese e tropismo viral

Após inoculação através da pele, pela picada do vetor contaminado, o ZIKV pode infectar diferentes populações celulares, incluindo queratinócitos, fibroblastos dérmicos e células dendríticas. O vírus é internalizado através da ligação das proteínas de envelope (E) à receptores da superfície celular, principalmente moléculas DC-SIGN, AXL e Tyro3 (HAMEL et al., 2015). A infecção dos fibroblastos e células dendríticas, seguida da antagonização da resposta de Interferon tipo I do hospedeiro, leva à viremia, que pode se apresentar subjacente aos sintomas (KUMAR et al., 2016). A resposta da imunidade inata é então seguida por eventos imunes adaptativos, nos quais as células dendríticas infectadas migram para os linfonodos regionais estimulando a proliferação e a diferenciação de células T e B, com a produção de citocinas e de anticorpos específicos, que irão atuar no controle e cura da infecção.

Inicialmente acreditava-se que o tempo de viremia era curto, aproximadamente 4 a 5 dias (BEARCROFT, 1956; FONTAINE et al., 2018; LANCIOTTI et al., 2008). Posteriormente, dados obtidos em estudos com primatas não-humanos e em coorte de humanos demonstraram que o tempo de persistência da viremia é variável, e que gestantes podem apresentar viremia prolongada, com detecção do vírus no sangue em até 53 dias pós início dos sintomas (DUDLEY et al., 2016; MEANEY-DELMAN et al., 2016). Estudos sobre a patogenia do ZIKV, *in vivo* e *in vitro*, revelaram também seu amplo tropismo por diversas células como neurônios, astrócitos, células da córnea e da retina, células de Sertoli, Células de Leydig, espermatogônias, células do epitélio vaginal, fibroblastos uterinos, células de Hoffbauer da placenta, (MINER; DIAMOND, 2017), células do epitélio intestinal, do epitélio respiratório (CAGNO et al., 2019) e células do epitélio mamário (HUBERT et al., 2019). O tropismo, a duração da persistência, e a replicação do vírus em determinados compartimentos e fluidos do corpo humano, ainda não foram totalmente esclarecidos e seu entendimento é importante para a adoção de medidas preventivas efetivas em epidemias futuras.

Além do sangue, o ZIKV pode ser detectado em diversos fluidos corporais. A primeira detecção e isolamento do ZIKV em amostra de urina foi descrito em 2014, em amostra de uma turista canadense que havia retornado da Tailândia (FONSECA et al., 2014). Em 2015 Gourinat e colaboradores publicaram um estudo, realizado durante a epidemia de ZIKV em 2013 na Nova Caledônia, sugerindo que a urina de

pacientes poderia ser usada como espécime clínico na detecção de ZIKV por RT-PCR. A sensibilidade do diagnóstico, adicionando a pesquisa do RNA viral nesse espécime, era superior à somente sua pesquisa no soro, e ainda apresentava como vantagem uma janela de detecção do vírus mais longa (GOURINAT et al., 2015). Estudos posteriores confirmaram estes achados (DE M. CAMPOS et al., 2016; ROZÉ et al., 2016) e a urina tem sido frequentemente utilizada na prática para o diagnóstico do ZIKV. Em 2015, o Ministério da Saúde já havia incluído a urina, como espécime clínico alternativo para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo ZIKV (BRASIL, 2015d).

Musso e colaboradores, durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa em 2013, utilizaram amostra de saliva como espécime clínico alternativo para o diagnóstico de pacientes durante a fase aguda da infecção. Naquela ocasião, em comparação ao sangue, a capacidade de detectar partículas de ZIKV na saliva por RT-PCR foi maior (MUSSO et al., 2015). Diferentemente, um estudo prospectivo e maior, iniciado em 2016 em Porto Rico, que avaliou 1.528 pacientes com infecção sintomática pelo ZIKV confirmada, observou apenas 5% de positividade na saliva de pacientes infectados, demonstrando uma baixa sensibilidade da detecção de ZIKV nesse espécime (PAZ-BAILEY et al., 2017) .

O ZIKV também pode atingir os olhos, transpassando a barreira hematoretiniana, através da via hematogênica ou mesmo axonal, causando conjuntivite e uveíte em adultos (FURTADO et al., 2016; PETERSEN et al., 2016) e dano ocular congênito em crianças infectadas intrauterino (DE PAULA FREITAS et al., 2017). Sun e colaboradores reportaram a detecção de RNA viral em amostras de swab conjuntival de seis pacientes infectados com ZIKV (SUN et al., 2016) e, posteriormente, outro estudo realizado em Singapura também detectou vírus em amostras conjuntivais de pacientes já na fase tardia de convalescência, após 30 dias pós início dos sintomas (TAN et al., 2017). Nesses estudos não foi avaliado se os vírus se encontravam infectantes ou se somente se tratava de RNA viral, entretanto, esses achados sugerem o potencial da participação de outros fluidos como via de transmissão do vírus.

Estudos em modelos animais e em humanos tem demonstrado que o ZIKV possui grande tropismo pelo trato genital masculino (STASSEN et al., 2018). O vírus

pode infectar espermatogônias, espermátocitos primários, células de Sertoli, Células de Leydig e células epiteliais (GOVERO et al., 2016), sendo detectado no sêmem de homens sintomáticos (JOGUET et al., 2017; MEAD et al., 2018) quanto assintomáticos (MUSSO et al., 2017). Alguns homens podem excretar vírus até 9 meses depois do início dos sintomas, entretanto isso parece ser mais frequente nas primeiras semanas após o início dos sintomas (MEAD et al., 2018; PAZ-BAILEY et al., 2017). Estudos que avaliaram a presença do ZIKV no trato genital feminino relatam que o vírus também pode ser detectado no muco cervical, mesmo na ausência de vírus no sangue e na urina, (PRISANT et al., 2017) e que pode persistir por mais de 11 semanas após o início dos sintomas (Murray et al., 2017). Essa característica de persistência e eliminação do ZIKV nas secreções do trato genital feminino e masculino é de especial relevância no impacto da transmissão sexual, não dependente do vetor.

No caso de gestantes, o vírus pode alcançar a placenta e infectar as células de Hoffbauer representando um papel importante na manutenção da viremia materna e na disseminação do vírus para o feto (TABATA et al., 2016). Através do cordão umbilical, o vírus pode chegar ao feto, infectando as células progenitoras neuronais e induzindo sua apoptose. Assim, prejudica o desenvolvimento cerebral produzindo sequelas neurológicas na criança (GARCEZ et al., 2016; TANG et al., 2016).

No leite materno de mulheres infectadas pelo ZIKV, também já foram detectados RNA e partículas virais infectantes (BLOHM et al., 2017; DUPONT-ROUZEYROL et al., 2016; GIOVANETTI et al., 2018; SOTELO et al., 2017). Estudos recentes, utilizando camundongos e células epiteliais humanas, relatam que o ZIKV pode se disseminar do sangue para as glândulas mamárias, infectar células desse tecido resultando em replicação do vírus (HUBERT et al., 2019). Esses resultados, juntamente com os relatos de detecção do ZIKV em leite materno humano, geram questionamentos sobre seu tropismo pela mama e sobre o potencial da amamentação como via de transmissão do ZIKV. Apesar disso, até o momento a recomendação da OMS para as áreas de transmissão do ZIKV é que a amamentação seja mantida, independente do status de infecção pelo ZIKV da mãe.

Apesar de muito avanço na área do conhecimento da infecção pelo ZIKV, muitas dúvidas ainda persistem em relação ao tropismo, dinâmica e persistência viral no

hospedeiro. Os fatores relacionados à persistência viral, e à transmissão não dependente do vetor ainda não estão totalmente claros, e nem sobre como se dá a participação de certos tecidos e órgãos como sítios de reservatórios de vírus.

2.6 A resposta imunológica na infecção pelo ZIKV

Os anticorpos para o ZIKV começam a ser produzidos na primeira semana da infecção. Inicialmente, ocorre a produção de anticorpos do tipo IgM, seguidos da produção de anticorpos IgG neutralizantes (PAZ-BAILEY et al., 2017). O desenvolvimento de anticorpos neutralizantes é considerado crucial para a imunidade às infecções virais. No caso dos flavivírus, as proteínas E, prM e NS1 são os principais alvos da resposta de anticorpos (REY et al., 2018). O perfil da resposta imunológica em uma infecção sequencial por flavivírus relacionado (infecção secundária), como ZIKV e DENV, ou mesmo entre os sorotipos DENV, é diferente do perfil de uma primeira infecção por um flavivírus (infecção primária). Na infecção secundária a resposta imune é marcada por uma rápida ativação de células de memória, que foram geradas na primeira exposição, e intensa produção de anticorpos com reatividade cruzada, porém subneutralizantes ao patógeno da presente infecção (SLON CAMPOS; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2018). Nesse contexto, um fenômeno conhecido para certos flavivírus é a exacerbação da infecção por anticorpos reativos, cruzados, provenientes de infecções anteriores por flavivírus heterólogos, denominado Exacerbação Dependente de Anticorpos, em inglês, *Antibody Dependent Enhancement* (ADE). No caso do DENV, do qual são conhecidos quatro sorotipos, há evidências epidemiológicas de que uma infecção primária protege da reinfecção com o mesmo sorotipo, mas representa um fator de risco para doença grave após a reinfecção com um sorotipo diferente (HALSTEAD, 2014).

Devido ao alto grau de similaridade genética e estrutural entre o ZIKV e o DENV, os anticorpos produzidos para esses dois flavivírus podem reagir de maneira cruzada. Ainda não se sabe ao certo se indivíduos com anticorpos induzidos por infecções anteriores por DENV podem desenvolver uma infecção por ZIKV mais grave ou, na gestação, poderiam apresentar maior risco de transmissão materno-fetal e maiores prejuízos ao feto. De fato, em cultura de células, os anticorpos para DENV podem intensificar a infecção pelo ZIKV (CHARLES; CHRISTOFFERSON, 2016;

DEJNIRATTISAI et al., 2016; PRIYAMVADA et al., 2016). Estudos *in vitro* e *in vivo* ainda parecem divergir quanto ao papel de anticorpos preexistentes para DENV no fenômeno de ADE na infecção pelo ZIKV. Na maioria dos estudos realizados *in vivo* até o momento, não foi observada uma patologia aumentada na infecção pelo ZIKV devido a anticorpos DENV preexistentes (LANGERAK et al., 2019), entretanto, Bardina e colaboradores (2017) e relataram uma intensificação *in vivo* da infecção por ZIKV em camundongos, com aumento da morbimortalidade na presença de plasma humano contendo anticorpos para DENV e WNV (Vírus do Nilo Ocidental, do inglês *West Nile Virus*) (BARDINA et al., 2017).

Embora o ADE entre esse flavivírus seja demonstrável na cultura de células, ainda são necessários estudos mais detalhados em animais (principalmente primatas) e evidências epidemiológicas robustas para confirmar se esse fenômeno ocorre *in vivo* na infecção pelo ZIKV. Isso poderia representar um risco aumentado para populações onde há cocirculação desses flavivírus, ou mesmo em populações onde circula o ZIKV e é praticada a vacinação para DENV. Apesar da maioria dos estudos atuais focarem na investigação de ADE na infecção pelo ZIKV, a possibilidade de ADE na infecção pelo DENV devido a anticorpos prévios para ZIKV é também de especial importância. Isso porque a Dengue pode apresentar complicações clínicas graves, como manifestações hemorrágicas, a Síndrome do Choque da Dengue (SCD) e também complicações na gestação e perinatais (KATZELNICK et al., 2017; KLIKS et al., 1988; MACHADO et al., 2013). Dessa forma, os aspectos imunológicos e epidemiológicos desses flavivírus também devem ser levados em consideração na avaliação de uma futura vacina contra o ZIKV.

2.7 Diagnóstico laboratorial

Devido à sintomatologia da infecção pelo ZIKV ser, muitas vezes, branda e se apresentar similar a outras infecções virais, o diagnóstico baseado apenas na clínica é difícil. Dessa forma, e principalmente, em regiões onde há circulação de outros flavivírus, o diagnóstico laboratorial torna-se extremamente importante para a confirmação da doença. Na prática clínica atual, o diagnóstico da infecção pelo ZIKV utiliza-se de métodos moleculares – para identificação do RNA viral – ou sorológicos – para a identificação de anticorpos específicos (CDC, 2019d).

A RT-PCR é uma técnica de biologia molecular que amplifica e detecta o genoma viral. Pode ser aplicada em diversas amostras clínicas, apresenta alta sensibilidade (em amostras coletadas em fase aguda da doença) e alta especificidade (CDC, 2019d). Se positivos, fornecem a confirmação de infecção, entretanto, devido ao curso natural da infecção e o decaimento da viremia, um resultado negativo não exclui definitivamente infecção recente. Além disso, existe a possibilidade de imprecisão no relato do início dos sintomas pelo paciente, uma vez que os mesmos são geralmente brandos. Tal fato pode levar a aplicação do teste numa fase mais tardia da infecção, e na qual é menos provável a detecção do vírus (LANCIOTTI et al., 2008; PAZ-BAILEY et al., 2017).

Para indivíduos com suspeita de infecção pelo ZIKV, um resultado positivo da RT-PCR confirma o diagnóstico e nenhum teste de anticorpos adicional é necessário. No entanto, pelos motivos mencionados anteriormente, um resultado negativo da RT-PCR para ZIKV não exclui a infecção. Nestes casos, um teste sorológico para detecção de anticorpos IgM para ZIKV pode ser utilizado entre uma e 12 semanas após o início dos sintomas. Os testes sorológicos, tem como alvo a detecção de anticorpos IgM ou IgG, e podem ser realizados utilizando diferentes metodologias, como a imunocromatografia (testes rápidos) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). A detecção de anticorpos IgM é útil para o diagnóstico da infecção recente, mas pode apresentar falsos positivos devido à reação cruzada com outros flavivirus, principalmente com o DENV (PRIYAMVADA et al., 2016; RABE et al., 2016). Além disso, resultados negativos na sorologia para IgM também não excluem infecção recente, caso o teste seja realizado precocemente, antes do aumento dos níveis desses anticorpos.

O grande problema dos testes sorológicos para detecção de IgM e IgG, seja por ELISA ou imunocromatografia, desenvolvidos para o diagnóstico da infecção pelo ZIKV está na falta sua especificidade, devido a reatividade cruzada com anticorpos para o DENV ocasionada pela estreita similaridade estrutural entre esses vírus (CHANG et al., 2017; HARRISON, 2016). Em paralelo, os testes que detectam anticorpos para o diagnóstico da Dengue também podem apresentar resultados falso positivos em caso de infecção pelo ZIKV (FELIX et al., 2017).

Outros testes sorológicos, chamados de Testes de Neutralização, como o Teste de Redução de Placas por Neutralização (PRNT, do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*) e suas variações, como o Teste de Redução de Focos por Neutralização (FRNT, do inglês, *Focus Reduction Neutralization Test*), mensuram os títulos de anticorpos neutralizantes específicos a partir da combinação do soro ou plasma do paciente com vírus em cultura de células. Esses ensaios podem ser úteis para confirmar testes de RT-PCR e IgM inconclusivos, ou para avaliar infecções passadas pelo Zika e outros flavivírus (RABE et al., 2016). Em infecções primárias por flavivírus os testes de neutralização permitem a identificação do vírus responsável pela infecção (CALISHER et al., 1989). Já em indivíduos previamente infectados ou vacinados contra outros flavivírus, geralmente não é possível fazer essa diferenciação devido às reações cruzadas (HALSTEAD; ROHANASUPHOT; SANGKAWIBHA, 1983; JOHNSON et al., 2005). Apesar de fornecerem informações importantes em relação à exposição prévia a vírus, os testes de neutralização são de difícil execução, pois dependem de um laboratório equipado com estrutura para cultivo e manutenção de células e vírus, e pessoal capacitado para execução e interpretação dos resultados.

Devido a possibilidade de reações cruzadas e limitações na execução e na interpretação dos resultados dos testes que detectam anticorpos (CALISHER et al., 1989; RABE et al., 2016), atualmente a obtenção de um teste sorológico que seja de execução simples, sensível e específico para a detecção de infecções pelo ZIKV ainda é uma grande busca da área diagnóstica laboratorial.

2.8 A infecção na gestação e a Síndrome Congênita do Zika (SCZ)

A característica mais alarmante da infecção pelo ZIKV, e notada após a epidemia ocorrida no Brasil, foi a sua capacidade de causar defeitos neurológicos congênitos aos fetos. Após a observação do aumento do número de casos de microcefalia relatados nos estados do Nordeste do Brasil em 2015 e 2016, foram conduzidos diversos estudos nessa área, e a infecção pelo ZIKV na gestação foi definitivamente relacionada com a ocorrência de malformações neurológicas, incluindo a microcefalia, malformações osteoarticulares (artrogripose) e abortos (BRASIL et al., 2016; DUDLEY et al., 2018; MARTINES et al., 2016).

A microcefalia é definida como uma condição na qual a circunferência cefálica occipito-frontal está abaixo de 2 desvios padrões para a idade, sexo. (PASSEMARD; KAINDL; VERLOES, 2013; VILLAR et al., 2014). Inicialmente, foi considerada a característica principal relacionada infecção congênita pelo ZIKV, entretanto, com o desenvolvimento dos estudos na área e a observação dos casos ocorridos no mundo inteiro, notou-se a ocorrência de um padrão de defeitos congênitos característicos associada a infecção intraútero, que chamamos hoje de Síndrome Congênita do Zika (SCZ). As similaridade entre as desordens neurológicas congênitas induzidas pelo ZIKV e outros patógenos conhecidos como “TORCHS” ou “STORCH” (Toxoplasma, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes e Sífilis) são notáveis e sugerem que o ZIKV seja considerado um novo membro desse grupo (“STORCHZ”) (COYNE; LAZEAR, 2016).

A SCZ é atualmente definida por microcefalia com colapso parcial do crânio; diminuição do tecido cerebral, com padrões de lesão que podem incluir calcificações; lesões em fundo de olho, incluindo lesões cicatriciais maculares e lesões pigmentares na retina; problemas articulares, como artrogrípse; e hipertonia ao nascimento (CDC, 2020; MOORE et al., 2017). No início da epidemia de ZIKV nas Américas, a incidência de malformações congênitas devido à infecção materna pelo vírus havia sido estimada em mais de 40%, em um estudo observacional prospectivo envolvendo gestantes sintomáticas do Rio de Janeiro, no Brasil (BRASIL et al., 2016). Em outro estudo realizado nos Estados Unidos, a estimativa foi de 6% no geral, e de 11% quando a exposição ao ZIKV ocorria no primeiro trimestre de gestação (HONEIN et al., 2017). Em um estudo mais recente, realizado em gestantes sintomáticas com infecção confirmada por ZIKV, defeitos congênitos possivelmente associados à infecção pelo ZIKV estiveram presentes em 7% das crianças nascidas (HOEN et al., 2018). Hoje sabe-se que ocorrência dos desfechos desfavoráveis relacionados à exposição pré-natal ao ZIKV é influenciada pela idade gestacional em que a infecção ocorre, e que o maior risco está associado à infecção no primeiro trimestre (CAUCHEMEZ et al., 2016; HOEN et al., 2018). Estima-se que a incidência de SCZ quando a infecção ocorre no primeiro trimestre é de 0,88% a 13,2%, enquanto é bastante baixa a partir do segundo trimestre (de 0,003% a 0,063%) (JOHANSSON et al., 2016).

Os fatores de risco envolvidos na ocorrência da SCZ e todo seu possível espectro ainda não estão completamente esclarecidos e são motivos de estudo, tanto

no que diz respeito ao entendimento do mecanismo causador básico, quanto no desfecho a longo prazo. Alguns fatores de risco foram implicados como relacionados ao fenômeno da SCZ: aspectos imunológicos maternos, como por exemplo a facilitação da infecção pela presença de anticorpos para flavivírus provenientes de infecções passadas (ADE); mecanismos moleculares específicos do vírus (FAIZAN et al., 2017); potencialização da infecção por toxinas produzida por algas, má nutrição materna, entre outras causas (BARBEITO-ANDRÉS et al., 2020).

Mais recentemente um outro aspecto da consequência da infecção pelo ZIKV na gestação tem sido levantado: a possibilidade de a criança apresentar determinados problemas neurológicos, anos após o nascimento, como epilepsia, perda de visão e audição e atrasos no desenvolvimento cognitivo e motor (RICE et al., 2018; SATTERFIELD-NASH et al., 2017). Um estudo americano recente acompanhou crianças nascidas de mães infectadas por ZIKV na gestação, até seu segundo ano de vida, e observou prejuízos no desenvolvimento da linguagem em 35% das crianças (NIELSEN-SAINES et al., 2019). Dessa forma, apesar de alguns aspectos mais evidentes da SCZ terem sido parcialmente elucidados, ainda existem lacunas no conhecimento do seu espectro clínico, principalmente a longo prazo e naquelas crianças que não possuem anormalidades evidentes ao nascimento.

3 JUSTIFICATIVA

Devido ao potencial de acometimento neurológico congênito e às lacunas existentes em relação à persistência viral e transmissão materno-fetal do ZIKV, uma atenção especial deve ser dada à compreensão dessa infecção na gestação. Assim, a fim de reduzir o impacto dessa doença, através da manutenção e desenvolvimento de medidas de prevenção e de manejo da doença eficazes, é de extrema relevância que sejam realizados estudos que contribuam para o conhecimento dessa infecção em gestantes e em seus conceptos.

Para tal faz-se necessário a execução de protocolos de pesquisa que abordem e esclareçam diferentes aspectos da infecção, incluindo: o tropismo, a persistência viral e a transmissão materno-fetal; a resposta imune materna e seu impacto protetor ao feto; o aprimoramento do diagnóstico laboratorial para confirmação dos casos; e o entendimento do espectro clínico da infecção congênita pelo ZIKV a longo prazo, avaliando principalmente, aquelas crianças que não apresentaram sinais de microcefalia ao nascimento.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento da persistência viral e da transferência de anticorpos maternos na infecção pelo ZIKV na gestação, assim como seu o impacto no desenvolvimento neurológico das crianças nascidas, através do estudo de uma coorte de mulheres que apresentaram infecção pelo ZIKV na gestação, e seus conceitos, do Espírito Santo, Brasil.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a transferência materno-fetal de anticorpos protetores ao ZIKV após infecção pelo ZIKV durante a gestação;
- 2) Caracterizar a presença do ZIKV em diferentes amostras biológicas no momento do parto e periparto (sangue, urina, placenta, líquido amniótico e leite materno) das mães infectadas pelo ZIKV durante a gestação;
- 3) Avaliar o desenvolvimento neurológico, nos primeiros 2 anos e meio de vida, de crianças nascidas de mães infectadas pelo ZIKV na gestação;
- 4) Testar potenciais ferramentas para aprimorar o diagnóstico laboratorial da infecção pelo ZIKV;

5 MATERIAIS E MÉTODO

Para responder aos objetivos propostos neste estudo foi estabelecida em Vitória, ES, Brasil, uma coorte de mulheres com suspeita de infecção pelo ZIKV durante a gestação, e seus conceptos. Essa coorte de participantes foi acompanhada desde a gestação até dois anos e meio (30 meses) após o nascimento da criança.

O estado do Espírito Santo está localizado na região sudeste do país, e possui uma população, em 2020, estimada em 4.064.052 milhões de habitantes, com aproximadamente 2 milhões vivendo na Região Metropolitana da capital Vitória. (IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2020). O estado apresenta circulação endêmica de DENV nas últimas três décadas e os primeiros casos suspeitos da infecção por ZIKV começaram a ser notificados em maio de 2015 (ESPÍRITO SANTO, 2016). Somente em novembro de 2015, 6 meses depois das primeiras notificações suspeitas, é que casos autóctones foram laboratorialmente confirmados (ESPÍRITO SANTO, 2015). Nos 7 meses seguintes à confirmação laboratorial de casos de ZIKV no ES, e que antecederam o início do estudo, foram notificados 3.100 casos suspeitos de ZIKV. Nesse período, 113 casos suspeitos de SCZ foram notificados à Secretaria Estadual de Saúde, que incluía casos de microcefalia, defeitos do sistema nervoso central e ou natimortos (ESPÍRITO SANTO, 2016). Dessa forma, o cenário local refletia características de transmissão ativa de ZIKV e era considerado apropriado para o estabelecimento de uma coorte para o estudo da infecção na gestação, objetivo desse trabalho.

5.1 Critérios de inclusão de participantes e procedimentos do estudo

A inclusão de participantes do estudo foi realizada em dois momentos do estudo. O primeiro momento de inclusão de participantes, ocorreu entre 2016 a 2018, a partir da suspeita clínica da infecção pelo ZIKV ainda na gestação, conforme consta no projeto inicial. O segundo momento de inclusão, foi realizado em 2019 e arrolou no estudo mães que apresentaram suspeita clínica de ZIKV na gestação com diagnóstico virológico confirmado de infecção, entre 2015 e 2017, e seus conceptos, agora já nascidos. Essa segunda etapa de inclusão (nomeada forma retrospectiva) foi implementada como emenda ao protocolo, e teve por objetivo aumentar o número de

crianças nascidas de mães ZIKV positivas, para avaliação neurológica do desenvolvimento nos primeiros anos de vida.

O primeiro momento de inclusão das participantes no estudo ocorreu a partir de um fluxo de encaminhamento das notificações de gestantes com suspeita de infecção pelo ZIKV, da Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo (SESA) para o Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (Figura 2). Um membro da equipe do estudo, através de contato telefônico, avaliava se as mesmas preenchiam os critérios inclusão do estudo (Quadro 1). Se sim, as potenciais participantes eram convidadas a participar do estudo, sendo agendada de imediato uma visita inicial (V01) no NDI, situado no *campus* Centro de Ciências da Saúde da UFES localizado em Maruípe, Vitória, ES. Nesta visita, e após a obtenção do consentimento para a participação no estudo através da assinatura do TCLE, era realizada uma avaliação clínica geral da gestante para checagem de sinais e sintomas. Na mesma visita era realizada a coleta de amostras e as participantes eram encaminhadas para uma consulta de pré-natal com a ginecologista obstetra da equipe de pesquisa, no ambulatório do Hospital Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), localizado no mesmo *campus*. A consulta com a ginecologista obstetra geralmente ocorria no mesmo dia ou em até em 3 dias após a visita V01. O acompanhamento pré-natal do estudo, incluía além da coleta de amostras regulares no NDI, a realização de ultrassonografia gestacional por médico membro da equipe do estudo, no HUCAM ou no Hospital Estadual Infantil e Maternidade Alzir Bernardino Alves (HEIMABA), em Vila Velha, ES.

Critério de Inclusão:

- Gestante que apresentou suspeita clínica da infecção pelo Zika:
 - Exantema e/ou febre, acompanhada ou não de outros sintomas característicos da infecção pelo ZIKV: hiperemia conjuntival, artralgia, mialgia, dor de cabeça.
- Idade igual ou superior à 18 anos.
- Possibilidade de adesão às visitas programadas do estudo.
- Anuência em participar do estudo

Quadro 1 - Critério de inclusão de participantes no estudo.

Os partos, sempre que possível, eram direcionados para o Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HUCAM, onde uma equipe designada do estudo acompanhava a evolução do caso, a fim de garantir a obtenção das informações clínicas e coleta de amostras previstas para esse momento (Quadro 3). Quando o parto ocorria fora do HUCAM, a equipe do estudo entrava previamente em contato com o obstetra responsável, para obter autorização para a coleta das amostras da participante. Após o parto, eram previstas consultas trimestrais (VPP) da criança e da mãe com a equipe do estudo. Nessas visitas, as crianças eram avaliadas por neuropediatra do estudo quanto a seu desenvolvimento físico (peso, altura, perímetro cefálico) e neurológico através da Escala Infantil Motora de Alberta (Alberta Infant Motor Scale - AIMS) (PIPER et al., 1992) e das Escalas Capute (CAPUTE; ACCARDO, 1996). As mães eram entrevistadas em relação ao seu estado geral de saúde e tinham amostras coletadas (Quadro 2).

Um segundo momento de arrolamento de participantes, ocorreu em 2019, visando aumentar o número de crianças nascidas de mães com confirmação da infecção por ZIKV acompanhadas no estudo, e assim melhorar a análise do desenvolvimento neurológico das crianças. O processo de referenciamento das potenciais participantes foi realizado novamente em colaboração com a SESA do ES. Mães que apresentaram sintomas da infecção pelo ZIKV durante a gestação, com confirmação por RT-PCR, entre 2016 e 2017, e que não haviam sido referenciadas ou contatadas pela equipe no anteriormente, foram agora convidadas a participar do estudo juntamente com seus filhos. Esses participantes iniciaram o acompanhamento do estudo a partir das visitas de acompanhamento (VPP). Os fluxogramas dos processos de inclusão e acompanhamento no estudo podem ser visualizados nas Figuras 2 e 3.

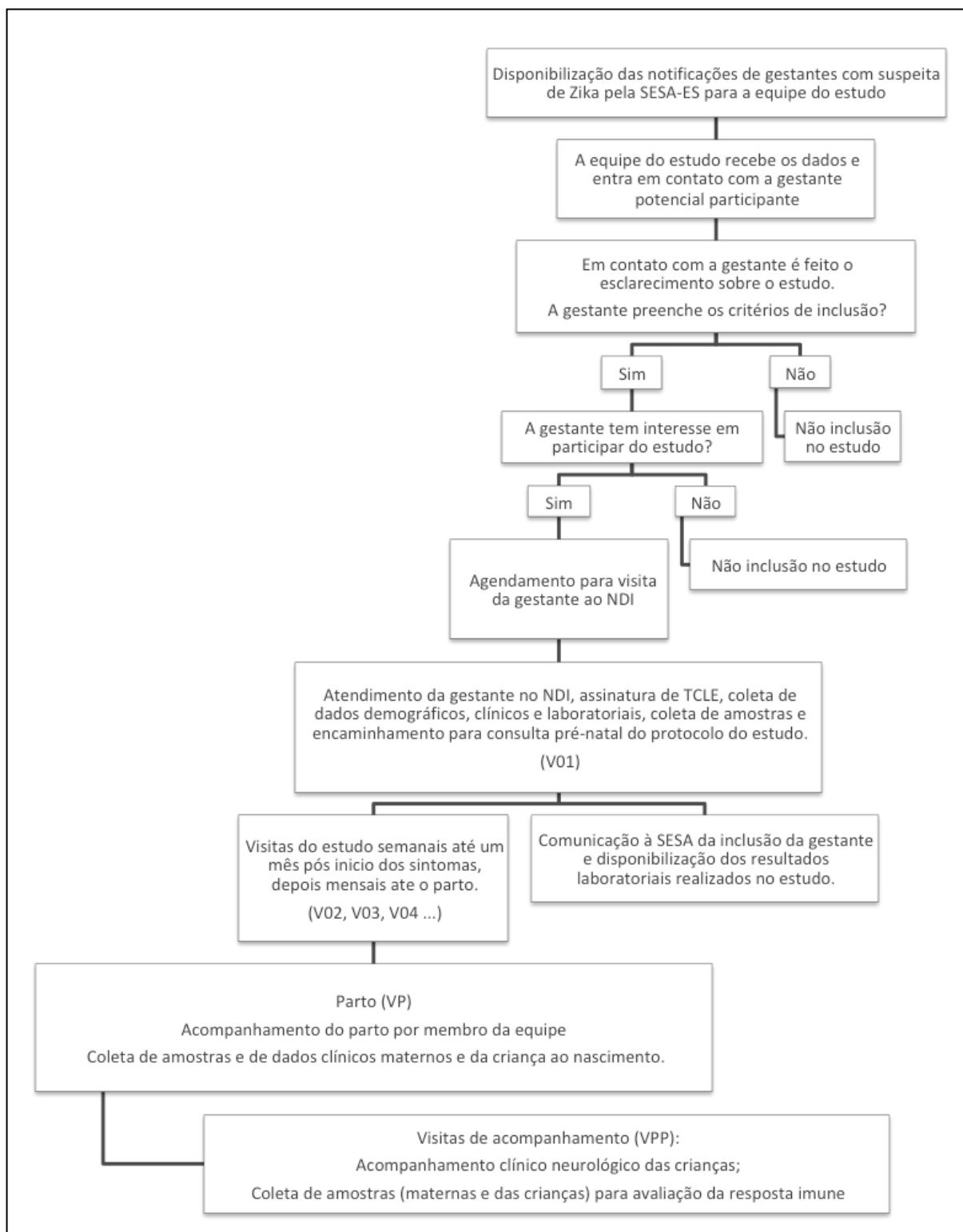


Figura 3 - Fluxograma de procedimentos do primeiro momento de inclusão de participantes, gestantes, no estudo.

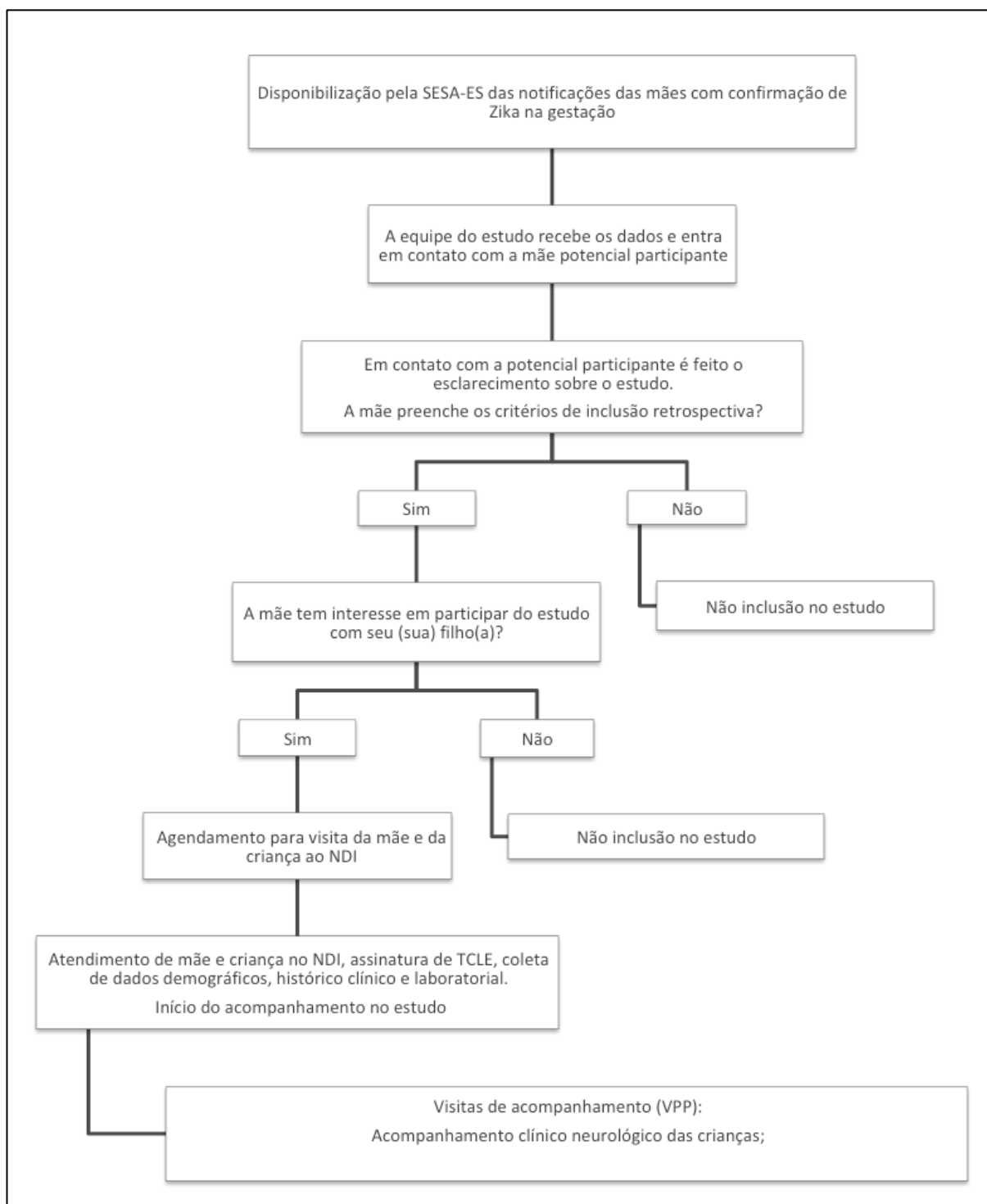


Figura 4 - Fluxograma de procedimentos do segundo momento de inclusão de participantes no estudo, implementado em 2019 e objetivando aumentar o número de crianças nascidas de mães ZIKV positivas acompanhadas quanto ao desenvolvimento neurológico.

5.1.1 Determinação da idade gestacional no momento da infecção e do parto

Para todas as participantes, a idade gestacional (IG) na data dos sintomas da provável, ou confirmada, infecção pelo ZIKV assim como a IG do parto, foram calculadas baseando-se na data da última menstruação (DUM), relatada pela participante, e pelo exame ultrassonográfico realizado entre a 9^a e 22^a semana de gestação (idealmente o mais próximo da 14^a semana), que confere melhor precisão da estimativa da idade gestacional (HADLOCK, 1994).

5.1.2 avaliação do desenvolvimento motor e cognitivo e das crianças.

Nas consultas de acompanhamento após o nascimento (VPP), além dos aspectos antropométricos, como peso, comprimento e perímetro cefálico, as crianças eram avaliadas quanto ao seu desenvolvimento motor e cognitivo, através da Escala Infantil Motora de Alberta (Alberta Infant Motor Scale - AIMS) (Piper *et al.*, 1992), e Escalas Capute (Capute and Accardo, 1996) respectivamente.

A Escala Aberta (AIMS) é utilizada na avaliação do desenvolvimento motor de crianças de 0 a 18 meses de idade. A AIMS é um instrumento observacional da motricidade ampla, que avalia a sequência do desenvolvimento motor e o controle da musculatura antigravitacional nas posturas prono, supino, sentado e de pé, de crianças a termo e pré-termo (Piper *et al.*, 1992). É uma ferramenta dinâmica, observacional, de baixo custo e usada por pesquisadores de diferentes países no rastreamento de atrasos ou dificuldades motoras devido a diferentes causas (Soares-Marangoni *et al.*, 2018). As pontuações obtidas nos testes podem ser utilizadas por profissionais da saúde e familiares para a avaliação de aquisições de habilidades e do desempenho do bebê ao longo do tempo, além de detectar mudanças sutis e avaliar a eficácia de intervenções em crianças com disfunções (Piper *et al.*, 1992).

As escalas Capute foram desenvolvidas pelo neuropediatra Dr. Arnold J. Capute e são utilizadas na avaliação da presença de disfunções em duas áreas do desenvolvimento cognitivo: o do funcionamento visual-motor e da linguagem expressiva e receptiva. A bateria de Testes de Marcos de Linguagem e Recepção - CLAMS (*Clinical Linguistic & Auditory Milestone Scale*) - foi originalmente

desenvolvida para fornecer aos pediatras uma escala de parâmetros lingüísticos e auditivos que podem ser utilizados facilmente na rotina médica. A bateria de resolução de problemas visual-motora - CAT (*Cognitive Adaptive Test*) - requer observação direta de uma criança realizando testes específicos durante a avaliação. O CAT proporciona um meio de distinguir atrasos de linguagem isolados ou distúrbios de comunicação de deficiências cognitivas mais globais (CAPUTE; ACCARDO, 1996). O kit para aplicação das Escalas Capute é composto de instrumentos simples e um formulário para registro.

Atraso suspeito no desenvolvimento motor foi definido como pontuação obtida nos testes da AIMS menor que 1 DP para idade e gênero. Desenvolvimento motor anormal foi definido como pontuação obtida menor que 2 desvios padrões (DP) para idade e gênero. Atraso no desenvolvimento cognitivo foi definido como pontuação menor que 70 nas escalas CAT e CLAMS de Capute.

5.1.3 Espécimes clínicos

5.1.4 Amostras maternas

Os seguintes espécimes clínicos foram coletados das mães: sangue, urina, saliva e secreção vaginal – durante a gestação – e sangue, urina, placenta, líquido amniótico e leite materno, na ocasião do parto (VP). Nas visitas após o parto (VPP) eram coletadas amostras de sangue e leite materno, caso a participante ainda estivesse amamentando (Quadro 3).

5.1.4.1 Sangue

As amostras de sangue, para obtenção de soro e plasma, foram coletadas utilizando dispositivo de coleta a vácuo e tubos específicos para cada tipo de amostra (BD-Vacutainer). Para obtenção de soro foram utilizados tubos secos ou com gel separador e para o plasma foram utilizados tubos com anticoagulante EDTA. Os respectivos tubos foram centrifugados a 1300 G por 10 minutos e a amostra obtida foi aliquotada em criotubos e armazenada a -80°C.

5.1.4.2 *Urina*

As amostras de urina foram coletadas em frasco estéril, por micção espontânea, pela própria paciente após orientação da equipe. A urina era aliqüotada, por um membro da equipe de laboratório, em criotubos estéreis, imediatamente após a coleta ou em até 1 hora após o procedimento. A amostra obtida foi aliqüotada em criotubos e armazenada a -80°C.

5.1.4.3 *Saliva*

As amostras de saliva foram coletadas por método de “cuspe espontâneo”, em frasco estéril de boca larga e eram aliqüotadas imediatamente após a coleta, em criotubos sem e com meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) na proporção 1:1 (v/v) e armazenadas em -80°C.

5.1.4.4 *Secreção vaginal*

A secreção vaginal foi coletada pela ginecologista ou enfermeira da equipe ou através de auto coleta pela participante, após orientação. A coleta era realizada com swab estéril no terço distal da vagina, realizando movimentos suaves, rotacionais, em contato com a parede vaginal. O swab era então imerso em criotubo contendo 500µL de DMEM (Gibco), homogeneizando e pressionado contra as paredes do tubo para transferência do material para o meio de conservação. Foram realizadas duas aliqüotas e armazenadas em -80°C.

5.1.4.5 *Leite materno*

Amostras de leite materno foram coletadas em frasco estéril de boca larga, através de ordenha manual da mama pela própria participante. Em até uma hora após a coleta a amostra foi aliqüotada em criotubos e armazenada em -80°C.

5.1.4.6 *Líquido amniótico*

A coleta de líquido amniótico era realizada no momento do parto, pela equipe de enfermagem, em um frasco estéril, próprio para coleta de amostras clínicas, como

urina. Em até uma hora após a coleta, a amostra era aliqüotada em criotubos e armazenada em -80°C.

5.1.4.7 *Placenta*

Após o parto as placentas foram mantidas refrigeradas (2°C a 8°C) e enviadas inteiras ao patologista do estudo para processamento, em até 24 horas. O processamento incluía a retirada de 4 amostras verticais, cilíndricas, completas do parênquima da placenta para detecção do ZIKV e para as análises histológicas. Duas amostras eram armazenadas em criotubos e congeladas a -80°C para a detecção do vírus por RT-PCR. As outras amostras eram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 4% e incluídas em blocos de parafina, para realização de análises histopatológicas em consonância com rotina do serviço de patologia do HUCAM.

5.1.5 Amostras dos recém-nascidos

As seguintes amostras foram coletadas dos recém-nascidos das participantes: sangue do cordão umbilical – no momento do parto – e amostras de urina e saliva nos dias seguintes ao nascimento.

5.1.5.1 *Sangue do Cordão Umbilical*

As amostras de sangue de cordão umbilical foram coletadas conforme o protocolo do HUCAM. O cordão umbilical era clampeado e seccionado, e o sangue contido no cordão era então drenado para os tubos de coleta. As amostras foram processadas e armazenadas em até 8 horas após a coleta, obtendo-se plasma e soro da mesma forma descrita para as amostras de sangue materno.

5.1.5.2 *Urina*

A urina dos recém-nascidos foi coletada através de método não invasivo, utilizando saco coletor pediátrico. Após a coleta, o saco coletor era selado e acondicionado em frasco estéril. A amostra era transportada para o laboratório, aliqüotada e armazenada em -80°C em até uma hora após a coleta.

5.1.5.3 *Saliva*

A coleta de saliva de recém-nascido foi realizada através de um swab estéril, passado no interior da boca da criança, gengiva e assoalho da língua, até que o mesmo ficasse completamente embebido de saliva. O swab era então imerso em criotubo contendo 500 μ L de meio DMEM (Sigma), homogeneizado e pressionado contra a parede do tubo, até que seu conteúdo fosse transferido para o meio. O volume foi alíquotado em dois criotubos e armazenados em -80°C.

Visita	Amostras	Método de coleta
V01 (Visita Inicial)	Sangue: <ul style="list-style-type: none"> 1 x 8mL tubo para soro (para obtenção de soro) 1 x 4mL tubos EDTA K₂ (para obtenção de plasma) 	Punção venosa à vácuo
	Urina: <ul style="list-style-type: none"> 10 mL 	Micção espontânea em frasco estéril
	Saliva: <ul style="list-style-type: none"> 5 mL 	"cuspe espontâneo" em frasco estéril
	Secreção vaginal: <ul style="list-style-type: none"> swab 	Swab vaginal em meio de transporte (DMEM)
visitas semanais até aproximadamente 1 mês após o início dos sintomas* V02, V03, V04, V05	Sangue: <ul style="list-style-type: none"> 1 x 8mL tubo para soro (para obtenção de soro) 1 x 4mL tubos EDTA K₂ (para obtenção de plasma) 	Punção venosa à vácuo
	Urina: <ul style="list-style-type: none"> 10 mL 	Micção espontânea em frasco estéril
	Saliva: <ul style="list-style-type: none"> 5 mL 	"cuspe espontâneo" em frasco estéril
visitas mensais até o parto V06, V07, V08...	Sangue: <ul style="list-style-type: none"> 1 x 8mL tubo para soro (para obtenção de soro) 1 x 4mL tubos EDTA K₂ (para obtenção de plasma) 	Punção venosa à vácuo
VP (Visita parto)	Placenta: <ul style="list-style-type: none"> (4 fragmentos) 	Fragmentos cilíndricos verticais do parênquima da placenta
	Sangue cordão umbilical: <ul style="list-style-type: none"> 1 x 9mL tubo 1 x 4mL tubo para soro 	Clampeamento e drenagem do sangue para os tubos de coleta
	Líquido amniótico: <ul style="list-style-type: none"> 3mL 	Coleta no parto em frasco estéril
	Sangue materno: <ul style="list-style-type: none"> 1 x 8mL tubo para soro 	Punção venosa à vácuo
	Leite materno/colostró: <ul style="list-style-type: none"> 3mL 	Ordenha manual em frasco estéril
	Urina materna: <ul style="list-style-type: none"> 10 mL 	Micção espontânea em frasco estéril
	Urina da criança <ul style="list-style-type: none"> 3ml 	Micção espontânea em saco coletor pediátrico
	Saliva da criança: <ul style="list-style-type: none"> Swab 	Swab estéril em meio de transporte (DMEM)
VPP (Visitas de acompanhamento após o parto/nascimento)	Leite materno: <ul style="list-style-type: none"> (3mL) 	Ordenha manual em frasco estéril
	Sangue materno: <ul style="list-style-type: none"> 1 x 8mL tubo para soro (para obtenção de soro) 	Punção venosa à vácuo

*As visitas (V02, V03, V04, V05) ocorriam semanalmente se V01 ocorresse em até 14 dias após os sintomas. Se V01 ocorresse em mais de 14 dias após os sintomas, então as próximas visitas (V02, V03, V04...) eram mensais.

Quadro 2 - Amostras biológicas e método utilizado para coleta.

5.1.6 Definição do diagnóstico de Zika

5.1.6.1 RT-PCR em tempo real

Para realizar a detecção do ZIKV nas diferentes amostras clínicas foi utilizada a técnica de RT-PCR em tempo real, de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti (LANCIOTTI et al., 2008), o mesmo recomendado pelo Ministério da Saúde para os Laboratório Centrais (LACEN) e pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC).

O RNA foi extraído de 140 µL das amostras biológicas usando o QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante, e a RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando um conjunto de primers e sonda ZIKV1086, ZIKV 1162c e ZIKV1107-FAM, conforme previamente descrito (LANCIOTTI et al., 2008). 5µL do RNA extraído foram combinados com 500nM de primers, 250nM sonda e nucleotídeos em um volume total de 20µL, incluindo SuperScriptIII RT e DNA polimerase Platinum Taq Mix (Invitrogen). Os controles negativos utilizados foram: 1) amostra de soro coletada em 2016 de um adulto jovem, assintomático e saudável da região de Vitória (controle de amostra negativa) e 2) água livre de nucleases/RNases para PCR (controle negativo “*sem template*”). O controle positivo foi obtido a partir de sobrenadante de cultura de células Vero infectadas com ZIKV proveniente do isolamento de uma amostra de paciente.

Para expandir o diagnóstico diferencial para as outras duas arboviroses endêmicas no Espírito Santo, incluiu-se na mesma placa de um mix de reação para a detecção dos quatro sorotipos de DENV e um outro mix para detecção do vírus CHIKV. O mix para a detecção de DENV continha 200nM de *primers* e 150nM de sonda para os vírus DENV-1 e 3 e 500nM de *primers* e 250nM de sonda para os vírus DENV-2 e 4 (Johnson, Russell and Lanciotti, 2005). Para detecção de CHIKV utilizou-se mix contendo e 500nM de primers e 250nM de sonda (Lanciotti et al., 2007). Para cada reação de detecção de DENV e CHIKV também se utilizou 5µL do RNA extraído. Os controles positivos de CHIKV e DENV também eram provenientes de cultura viral e foram cedidos pelo Laboratório Central do Estado do Espírito Santo (LACEN-ES).

Em paralelo, um volume de 5µL de RNA de cada amostra foi testado utilizando um conjunto de *primers* e sonda para o gene da Ribonuclease P humana como controle da extração e reação. Todas as amostras foram testadas em duplicata e consideradas positivas se apresentassem detecção de amplificação do alvo (ZIKV, DENV ou CHIKV) em Ct (*Cycle threshold*) menor que 38 ciclos Ct <38) em ambos os poços. O processo foi considerado válido se: as amostras apresentassem reação RNase P humana positiva; os controles positivos fossem positivos para o alvo (DEN, ZIKV ou CHIKV) e RNP; e os controles negativos fossem negativos para DEN, ZIKV e CHIKV. As condições de ciclagem definidas foram: 50°C por 15 minutos, 95 ° C por 2 minutos, seguidos por 45 ciclos de 95°C e 60°C em equipamento Applied Biosystems 7500 Fast.

5.1.6.2 Sorologias para ZIKV

5.1.6.2.1 Detecção de anticorpos IgM para ZIKV

Para a detecção de anticorpos IgM para ZIKV foi utilizado o kit ZIKV Detect 2.0 IgM Capture ELISA (Inbios International Inc.). Esse kit consiste em um ensaio imunoenzimático de captura para a detecção de anticorpos IgM contra proteínas de envelope do ZIKV. Foram seguidas as instruções do fabricante, como descritas na bula do produto e apresentadas brevemente a seguir. O kit contém em uma placa de poliestireno de 96 poços com anticorpos anti-IgM humano aderidos, na qual são adicionados, em cada poço, 150µL de controles (positivos e negativo) ou as amostras a serem testadas, diluídos na proporção 1:100 em solução diluente. Após uma hora de incubação a 37°C foram realizados 5 ciclos de lavagem com solução própria fornecida no kit. Após essa etapa, foram adicionadas à placa as três soluções de antígenos prontas para uso. Nesse método a placa é setorizada em três partes e cada amostra é testada para os três antígenos: antígeno ZIKV (antígeno específico ZIKV), antígeno CCA (antígeno controle de reação cruzada) e antígeno NCA (antígeno normal celular) (Figura 4). Após subsequente incubação de 1 hora a 37°C e 5 ciclos de lavagens, foi adicionado 50µL de anticorpos secundários, seguido de 30 minutos a 37°C de incubação. Após a incubação e 5 ciclos de lavagem, foi adicionado 50µL de solução de anticorpo conjugado com peroxidase e incubado a 37°C por 30 minutos. Para a revelação colorimétrica foi adicionado 75µL de substrato TMB e incubado por

15 minutos, em temperatura ambiente e no escuro. Após esta incubação adicionou-se 50µL de solução ácida para paralização da reação enzimática (solução “Stop”), fornecida também no kit. Ao final, a densidade óptica (DO) dos poços da placa foi lida em espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices), em comprimento de onda de 450nm. Os resultados das amostras foram calculados e interpretados conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Os resultados finais são interpretados como “negativo”, “provável infecção por outro flavivírus” ou “Zika positivo”, a depender dos valores obtidos para os controles e para a razão entre os valores da DO obtidos nos poços dos antígenos ZIKV, CCA e NCA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controle Positivo	Controle Positivo	Amostra #13	Amostra #21	Controle Positivo	Controle Positivo	Amostra #13	Amostra #21	Controle Positivo	Controle Positivo	Amostra #13	Amostra #21
B	Controle Negativo	Controle Negativo	Amostra #14	Amostra #22	Controle Negativo	Controle Negativo	Amostra #14	Amostra #22	Controle Negativo	Controle Negativo	Amostra #14	Amostra #22
C	Amostra #1	Amostra #7	Amostra #15	Amostra #23	Amostra #1	Amostra #7	Amostra #15	Amostra #23	Amostra #1	Amostra #7	Amostra #15	Amostra #23
D	Amostra #2	Amostra #8	Amostra #16	Amostra #24	Amostra #2	Amostra #8	Amostra #16	Amostra #24	Amostra #2	Amostra #8	Amostra #16	Amostra #24
E	Amostra #3	Amostra #9	Amostra #17	Amostra #25	Amostra #3	Amostra #9	Amostra #17	Amostra #25	Amostra #3	Amostra #9	Amostra #17	Amostra #25
F	Amostra #4	Amostra #10	Amostra #18	Amostra #26	Amostra #4	Amostra #10	Amostra #18	Amostra #26	Amostra #4	Amostra #10	Amostra #18	Amostra #26
G	Amostra #5	Amostra #11	Amostra #19	Amostra #27	Amostra #5	Amostra #11	Amostra #19	Amostra #27	Amostra #5	Amostra #11	Amostra #19	Amostra #27
H	Amostra #6	Amostra #12	Amostra #20	Amostra #28	Amostra #6	Amostra #12	Amostra #20	Amostra #28	Amostra #6	Amostra #12	Amostra #20	Amostra #28
Antígeno Zika (Zika Ag)				Antígeno para controle de reações cruzadas (CCA)				Antígeno para controle normal (NCA)				

Figura 5 - Exemplo de layout da placa do teste ZIKV Detect 2.0 IgM Capture ELISA (Inbios International Inc.)

5.1.6.2.2 Detecção de anticorpos IgG para ZIKV

Para detecção de anticorpos IgG para ZIKV foi realizada através de uma técnica de ELISA *in house* utilizando o vírion total (*Whole virion ELISA, WVE*). Placas de 96 poços de alta adesão (Greiner) foram revestidas com 30ng de anticorpos monoclonais para flavivírus 4G2 (clone D1-4G2-4-15), por poço, em tampão carbonato (pH 9,6) “overnight”, a 4°C. As placas foram depois boqueadas utilizando uma solução salina tamponada contendo Tris, 0,05% de Tween-20 e 5% de soro caprino, por 1 hora a 37°C, seguida de incubação com vírus ZIKV obtidos de cultura, por 1 hora a 37°C. O plasma a ser testado foi inicialmente diluído 1:25 em solução salina tamponada contendo Tris, 0,05% de Tween-20 e 5% de soro caprino, aplicado em 8 diluições

seriadas de 1:3, 1:5 ou 1:10 e incubado por 1 hora a 37°C. Anticorpos anti-IgG humana conjugados com peroxidase HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc; 109-035-008) foram usados em diluição 1:5.000, seguido de adição de substrato SureBlue (KLP). As reações foram encerradas utilizando solução ácida “Stop” (KLP). A densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm (Perkin Elmer, Victor).

Os valores obtidos para cada diluição foram calculados utilizando curva sigmoide de dose-resposta no software Prism 7 (GraphPad). Os valores de ED50 obtidos, ou seja, o ponto da curva o ponto onde ocorreu de 50% da ligação máxima, foram considerados positivos se o valor de DO obtido fosse dois desvios padrão acima da mediana da DO observada para 11 amostras soro negativas (*cut-off* ZIKV estabelecido= 0.596). Os valores de ED50 obtidos abaixo do valor de *cut-off* estabelecido foram consideradas não ligantes, e, portanto, negativos.

5.1.6.3 Sorologias COMPLEMENTARES para Dengue e Chikungunya

Com o objetivo de complementar o diagnóstico diferencial das arboviroses circulantes no ES, as amostras de soros das gestantes também foram testadas para detecção de anticorpos para DENV e CHIKV. Para detecção de anticorpos IgM para DENV e CHIKV foram utilizados os kits comerciais DENV Detect™ IgM ELISA e Chikij Detect IgM ELISA (Inbios International), respectivamente, conforme as instruções do fabricante fornecidas na bula do produto. Brevemente, o kit CHIKij Detect™ IgM ELISA se destina a detecção qualitativa da presença de anticorpos IgM contra as proteínas de envelope E1 e E2 específicas do CHIKV. O kit DENV Detect™ IgM Capture ELISA é destinado a detecção qualitativa anticorpos IgM contra vírus Dengue através da utilização de um *pool* recombinante de antígenos do vírus. Ambos os kits incluem placas de 96 poços e todos os demais reagentes e controles necessários. Para a leitura da DO dos poços das placas foi utilizado espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices), em comprimento de onda de 450nm, e o cálculo e interpretação dos resultados foi realizado conforme as instruções do fabricante.

Para a complementação dos testes e interpretação dos resultados obtidos também foi realizada a pesquisa de anticorpos IgG para Dengue. Nesse caso foi

também utilizada a técnica de WVE, conforme descrito anteriormente para a detecção de anticorpos IgG para ZIKV, porém utilizando-se de um *pool* de vírus Dengue (DENV1, DENV2 e DENV-4).

5.2 A coorte incluída no estudo

Durante o estudo nos foram referenciadas 164 mulheres notificadas como suspeita ou já com a confirmação de Zika na gestação pelo LACEN-ES. Nos dois momentos de inclusão mencionados foi possível realizar contato telefônico com 111/164 (67,7%) potenciais participantes. As causas de insucesso de contato telefônico foram: número de telefone errado ou inexistente ou não atendimento da ligação. Durante a triagem inicial nos contatos telefônicos, 31/111 (27,9%) não preencheram os critérios de inclusão do estudo (história clínica e laboratorial incompatíveis com infecção por ZIKV ou por já apresentarem um diagnóstico de outra etiologia). Outras 22 (22/111, 19,8%) não foram incluídas por recusarem participar do estudo ou por não comparecimento à visita agendada no NDI. Finalmente, preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo, assinando o TCLE, 58 (52,3%) das 111 potenciais participantes contatadas por telefone (Figura 5). Deste total, 37 (63,8%) foram incluídas a partir da suspeita clínica e ainda durante a gestação, 9 (15,5%) foram incluídas na ocasião do parto no HUCAM e 12 (20,7%) pares de crianças e mães foram incluídos posteriormente, através do segundo momento de inclusão.

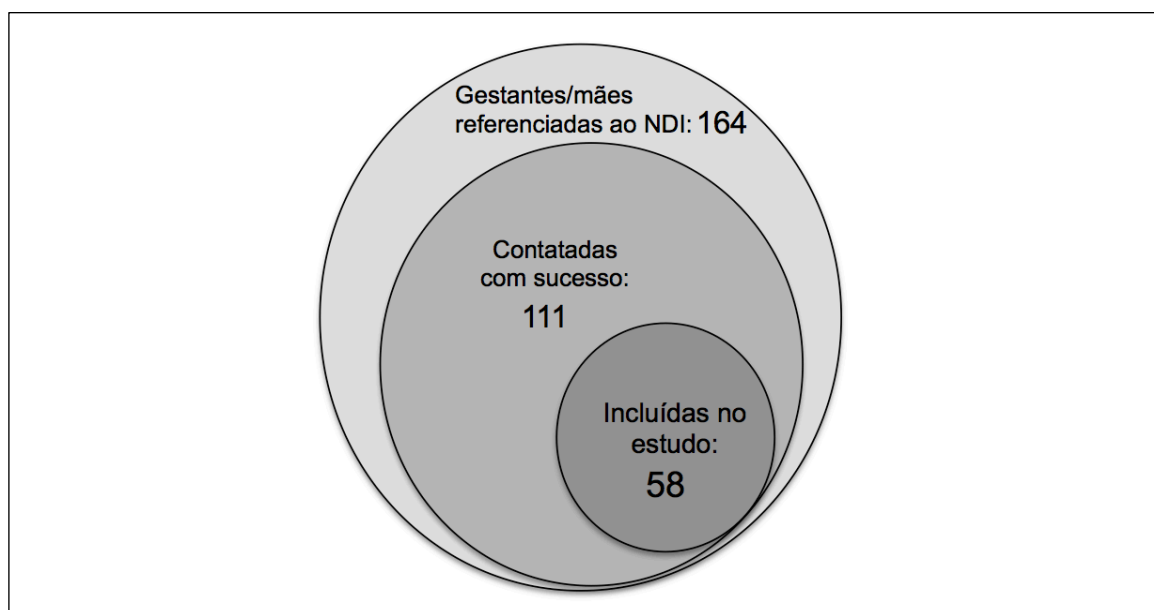


Figura 6 - Resultado da inclusão de participantes.

Das 58 participantes incluídas, 22 (22/58 37,9%) foram classificadas como “ZIKV positivas” na gestação e 36 (36/58 62,1%) foram classificadas como “ZIKV negativas” na gestação. Das 22 ZIKV positivas, 20 tiveram resultados laboratoriais positivos através do RT-PCR e 2 apresentaram resultados positivos através de métodos sorológicos para detecção de IgM e IgG. Das 36 negativas para ZIKV na gestação, 7 (19,4%) tiveram diagnóstico de CHIKV, 4 (11,1%) de DENV e 1 (2,7%) de Toxoplasmose. Após a avaliação médica das demais negativas para as arboviroses e para as TORCHS (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes e Sífilis) realizadas durante o pré-natal, as hipóteses diagnósticas para o evento suspeito de Zika foram: infecções do trato urinário, reações alérgicas causadas por medicamentos, cosméticos ou alimentos. As características demográficas e clínicas das participantes incluídas na coorte deste estudo podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos da coorte incluída no estudo.

	total de participantes da coorte (N=58)	ZIKV positivas (N=22)	ZIKV negativas (N=36)
Dados demográficos			
Idade (mediana e [amplitude] anos)	27 [18-41]	26 [18-41]	28 [18-38]
Raça ou cor			
Branca	27 (46,6%)	7 (31,8%)	20 (55,6%)
Parda	26 (44,8%)	11 (50,0%)	15 (41,7%)
Negra	5 (8,6%)	4 (18,2%)	1 (2,8%)
Amarela	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Indígena	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cidade de Origem			
Vitória (Região Metropolitana), ES Brasil	54 (93,1%)	19 (86,4%)	35 (97,2%)
Outras cidades do ES, Brasil	4 (6,9%)	3 (13,6%)	1 (2,8%)
Sistema de Saúde que utiliza			
Público (SUS)	41 (70,7%)	18 (81,8%)	23 (63,9%)
Privado	17 (29,3%)	4 (18,2%)	13 (36,1%)
Informações clínicas			
Idade gestacional no início dos sintomas (mediana e [amplitude] semanas)	20 [4 - 37]	17 [4 - 37]	21 [4 - 37]
Duração dos sintomas (mediana e [amplitude] dias)	7 [2 - 60]	7 [3 - 15]	7 [2 - 60]
Duração do rash (mediana e [amplitude] dias)	5 [1 - 27]	6 [2 - 14]	5 [1 - 27]
Dias após o início dos sintomas em que foi realizada a primeira coleta de amostra (sangue ou urina) para diagnóstico laboratorial (mediana e [amplitude])	4º [1º - 217º]	4º [2º - 210º]	6º [1º - 217º]
Sintomas			
Exantema	53 (91,4%)	22 (100%)	31 (86,1%)
Prurido	43 (74,1%)	18 (81,8%)	25 (69,4%)
Cefaléia	36 (62,1%)	12 (54,5%)	24 (66,7%)
Artralgia	31 (53,4%)	13 (59,0%)	18 (50,0%)
Mialgia	29 (50,0%)	9 (41,0%)	20 (55,6%)
Febre	27 (46,6%)	6 (27,3%)	21 (58,3%)
Edema	20 (34,5%)	9 (41,0%)	11 (30,6%)
Conjuntivite	19 (32,8%)	7 (31,8%)	12 (33,3%)
Dor Retro-orbital	19 (32,8%)	7 (31,8%)	12 (33,3%)
Nausea	16 (27,6%)	5 (22,7%)	11 (30,6%)
Vômito	9 (15,5%)	3 (13,6%)	6 (16,7%)
Diarreia	7 (12,1%)	1 (4,5%)	6 (16,7%)
Linfadenopatia	4 (6,9%)	2 (9,0%)	2 (5,6%)
Outro	10 (17,2%)	2 (9,0%)	8 (22,2%)

Das 58 participantes incluídas na coorte, 46 foram incluídas a partir da suspeita em gestação ou no momento do parto, e 12 foram incluídas através da segunda etapa de referenciamento pela SESA-ES, de crianças e suas mães que tiveram a confirmação de ZIKV na gestação.

No processo de acompanhamento das gestações tivemos a perda de seguimento de uma gestante ainda antes do parto. Dessa forma, foi possível acompanhar o desfecho de 45 das 46 (97,8%) gestações, o que refletiu uma boa adesão inicial das participantes aos procedimentos do estudo. Das 45 gestações acompanhadas até o momento do parto, óbito fetal ocorreu em duas gestações, ambas de participantes ZIKV negativas. Em um dos casos a participante (ARB029) sofreu aborto com 20,4 semanas de gestação e o material analisado por laboratório privado de análises patológicas (Instituto de Patologia, ES). O laudo patológico do material excluiu anormalidades compatíveis com ZIKV ou restrições no crescimento, corroborando a exclusão da infecção pelo vírus ZIKV como causa do aborto. Após exames maternos adicionais, uma má formação uterina foi apontada pela ginecologista do estudo como possível causa do evento. No outro caso, a participante (ARB042) teve feto natimorto em abril de 2017, em idade gestacional de 32 semanas. O material foi investigado pelo Serviço de Verificação de Óbitos (SVO) do Espírito Santo. Nesse caso, o bebê também não apresentava anormalidades e a causa do óbito fetal apontada foi decorrente de descolamento prematuro da placenta, secundário à hipertensão arterial materna.

Os 12 pares de crianças e mães que foram incluídos no segundo momento de inclusão, em 2019 (Figura 3), se juntaram às demais mães e nascidos vivos já incluídos anteriormente e iniciaram o acompanhamento nas visitas VPP do estudo.

6 RESULTADOS

Dada a abrangência dos tópicos abordados neste trabalho, e visando facilitar a sua compreensão, a sessão “Resultados” foi dividida em capítulos. Cada capítulo apresenta os resultados relacionados a cada objetivo proposto, e corresponde a um manuscrito já publicado ou em processo de publicação em uma revista científica.

Capítulo I: EFICIENTE TRANSFERÊNCIA TRANSPLACENTÁRIA DE IGG EM MULHERES INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA DURANTE A GESTAÇÃO.

Capítulo II: PERSISTÊNCIA DE VÍRUS ZIKA INFECTANTE EM LEITE MATERNO APÓS INFECÇÃO OCORRIDA NA GESTAÇÃO.

Capítulo III: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO NEUROLÓGICO, ATÉ OS 2 ANOS E MEIO DE IDADE, DE CRIANÇAS NÃO-MICROCEFÁLICAS EXPOSTAS AO ZIKA NO PERÍODO PRE-NATAL.

Capítulo IV: DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS DE PROTEÍNA DO ENVELOPE PARA DIFERENCIAR SOROLOGICAMENTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA DA INFECÇÃO PELO VIRUS DENGUE.

CAPÍTULO I: Eficiente transferência transplacentária de IgG em mulheres infectadas pelo vírus Zika durante a gestação.

CAPÍTULO I: EFICIENTE TRANSFERÊNCIA TRANSPLACENTÁRIA DE IGG EM MULHERES INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA DURANTE A GESTAÇÃO.

A transferência transplacentária de anticorpos maternos do tipo IgG, durante a gestação, fornece imunidade passiva ao feto e é fundamental para proteger o recém-nascido contra diversas infecções e reduzir, assim, a morbidade neonatal (FOUDA et al., 2018). A infecção pelo ZIKV na gestação produz uma patologia placentária que poderia levar à diminuição da eficiência da transferência desses anticorpos, como ocorre em outras infecções maternas, como HIV-1 e Malária (MORO et al., 2015; ROSENBERG et al., 2017). Assim, nos perguntamos se a infecção pelo ZIKV durante a gravidez prejudicaria a transferência materna de anticorpos IgG para o feto. Dessa forma, nesta parte do estudo investigamos a eficiência da transferência materno-fetal de anticorpos IgG específicos para ZIKV, para DENV, e aqueles produzidos pela mãe através de algumas vacinas que recebeu, após a infecção por ZIKV na gestação. Esses resultados foram publicados na revista científica *PLOS Neglected Tropical Diseases*, em agosto de 2019, e podem ser visualizados a seguir.

RESEARCH ARTICLE

Efficient transplacental IgG transfer in women infected with Zika virus during pregnancy

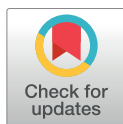
Tulika Singh¹*, Cesar A. Lopez²*, Camila Giuberti³, Maria L. Dennis¹, Hannah L. Itell¹*, Holly J. Heimsath¹, Helen S. Webster¹, Hunter K. Roark¹, Paulo R. Merçon de Vargas⁴, Allison Hall⁵, Ralph G. Corey¹, Geeta K. Swamy⁶, Reynaldo Dietze^{3,7}, Helen M. Lazear^{2*}, Sallie R. Permar^{1*}

1 Duke Human Vaccine Institute, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, United States of America, **2** Department of Microbiology and Immunology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, **3** Núcleo de Doenças Infecciosas—Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil, **4** Department of Pathology, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil, **5** Department of Pathology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, United States of America, **6** Obstetrics and Gynecology, Duke School of Medicine, Durham, North Carolina, United States of America, **7** Global Health & Tropical Medicine—Instituto de Higiene e Medicina Tropical—Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal

* These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Molecular and Cellular Biology PhD program, University of Washington, Seattle, Washington, United States of America

* helen.lazear@med.unc.edu (HML); sallie.permar@duke.edu (SRP)



OPEN ACCESS

Citation: Singh T, Lopez CA, Giuberti C, Dennis ML, Itell HL, Heimsath HJ, et al. (2019) Efficient transplacental IgG transfer in women infected with Zika virus during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis* 13(8): e0007648. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648>

Editor: Ernesto T. A. Marques, University of Pittsburgh, UNITED STATES

Received: March 3, 2019

Accepted: July 22, 2019

Published: August 26, 2019

Copyright: © 2019 Singh et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Duke Global Health Institute* (SRP), Duke-NUS Medical School (SRP), the American Society for Reproductive Medicine* (SRP), the Duke-Brazil Institute* (TS), the National Institutes of Health [R21 AI132677 to SRP; and T32 CA009111 to TS], start-up funds from the University of North Carolina Chapel Hill (HML), and Coordenação de

Abstract

Zika virus (ZIKV) is a newly-identified infectious cause of congenital disease. Transplacental transfer of maternal IgG to the fetus plays an important role in preventing many neonatal infections. However, antibody transfer may also have negative consequences, such as mediating enhancement of flavivirus infections in early life, or trafficking of virus immune complexes to the fetal compartment. ZIKV infection produces placental pathology which could lead to impaired IgG transfer efficiency as occurs in other maternal infections, such as HIV-1 and malaria. In this study, we asked whether ZIKV infection during pregnancy impairs transplacental transfer of IgG. We enrolled pregnant women with fever or rash in a prospective cohort in Vitória, Brazil during the recent ZIKV epidemic. ZIKV and dengue virus (DENV)-specific IgG, ZIKV and DENV neutralizing antibodies, and routine vaccine antigen-specific IgG were measured in maternal samples collected around delivery and 20 paired cord blood samples. We concluded that 8 of these mothers were infected with ZIKV during pregnancy and 12 were ZIKV-uninfected. The magnitude of flavivirus-specific IgG, neutralizing antibody, and vaccine-elicited IgG were highly correlated between maternal plasma and infant cord blood in both ZIKV-infected and -uninfected mother-infant pairs. Moreover, there was no difference in the magnitude of plasma flavivirus-specific IgG levels between mothers and infants regardless of ZIKV infection status. Our data suggests that maternal ZIKV infection during pregnancy does not impair the efficiency of placental transfer of flavivirus-specific, functional, and vaccine-elicited IgG. These findings have implications for the neonatal outcomes of maternal ZIKV infection and optimal administration of antibody-based ZIKV vaccines and therapeutics.

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Finance Code 001 to CG). The pregnancy cohort in Brazil was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (306/2016 to RD; Protocol Financial Support Number: 74910132/16), and led by RD and SRP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. * These funding sources do not have a number associated with the research award.

Competing interests: TS, CAL, CG, MLD, HLI, HJH., PMV, AH, RD, HSW, HKR, and HML all certify no potential conflicts of interest. SRP is serving as a consultant for vaccine programs at Merck, Pfizer, and Moderna. GKS is on the scientific advisory board for investigational vaccine products with Saol Therapeutics and GlaxoSmithKline, the Chair of Data Safety and Monitoring Board with Pfizer, and the site PI at Duke for testing investigational vaccines and products with Novavax, Regeneron, and GlaxoSmithKline/Novartis. In the past three years, RGC has served as a consultant for Arsanis, Basilea, Bayer, Cempra, Contrafect, Meiji Seika Pharma Co., Melinta, Merck, Motif, Paratek, Parion Sciences, Quintiles, Regeneron, SCPharma, The Medicines Company, and Theravance. Moreover, RGC has served on the Adjudication Committee at Bio2 Medical and Novella, the scientific advisory board of Medtronic and Tetrphase, and on the Mortality Board of Pfizer.

Author summary

In 2015, a Zika virus (ZIKV) epidemic emerged in Latin America, where dengue virus (DENV) already was endemic. The ZIKV epidemic revealed an array of birth defects and neurodevelopmental abnormalities in newborns associated with maternal infection. ZIKV may now be co-endemic in Latin America with DENV. Antibodies transferred from mother to the fetus in pregnancy can protect newborns from infections in early life, before they are eligible for vaccination. Conversely, flavivirus-specific IgG transfer could mediate enhancement of DENV infections in early life, or transfer ZIKV immune complexes into the fetal compartment. As a first step in evaluating these potential outcomes, it is important to understand whether ZIKV infection in pregnancy and its associated placental pathology impacts the magnitude or types of IgG subpopulations that are transferred across the placenta. To test this, we assessed paired maternal and cord blood collected at delivery from mothers who presented with rash and/or fever in pregnancy during the ZIKV epidemic in Vitoria, Brazil. Of these, we classified 8 as ZIKV-infected based on virus detection and/or neutralization serology, and 12 as ZIKV-uninfected. Comparing ZIKV-infected and uninfected groups, we detected no difference in transfer efficiency of IgG targeting ZIKV, DENV, or routine vaccine antigens. These findings indicate that the magnitude of IgG transferred across the placenta was not deficient at the time of birth in the setting of maternal ZIKV infection. Sustained transplacental IgG transfer with ZIKV infection during pregnancy indicates that ZIKV exposure in utero should not impact maternal antibody mediated protection during early life. However, concern remains over potential risk of severe primary DENV infection in ZIKV-exposed infants in endemic regions, or whether ZIKV could access the fetal compartment via antibody-mediated transport. This passive antibody transfer in pregnancy is an important consideration for flavivirus vaccine and therapeutic development efforts.

Introduction

The emergence of Zika virus (ZIKV) in the Americas in 2015 revealed that ZIKV could be congenitally transmitted and cause fetal neurological damage [1–3]. Neurodevelopmental defects associated with congenital Zika syndrome (CZS) include microcephaly, arthrogryposis, motor and cognitive impairment, as well as vision and hearing loss [4]. ZIKV is the first example of a teratogenic vector-borne disease in humans. Initial estimates during the epidemic detected a 42% rate of fetal or neonatal abnormalities in symptomatic ZIKV-infected pregnant women [1], whereas subsequent epidemiologic studies with larger populations estimated a 7–14% rate of neurological defects in infants of pregnant women infected with ZIKV [5,6]. While the recent global epidemic has largely waned, the lack of preventative options for protection against ZIKV suggests ZIKV is likely to be a re-emerging and ongoing cause of congenital infections.

Transplacental transfer of IgG during pregnancy provides passive immunity to the fetus and is critical to protecting newborns against infections [7]. Maternal immunization during pregnancy can boost levels of protective IgG transferred to the fetus, providing a valuable tool for reducing neonatal morbidity. For example, tetanus immunization of pregnant women, or women of child-bearing age, resulted in a 94% reduction in neonatal tetanus mortality rates [8]. Moreover, maternal influenza vaccination and the magnitude of maternally derived antibodies are associated with protection of infants from influenza illness [9–11]. These benefits have led to the recommendation of providing diphtheria, tetanus, pertussis combined vaccines

and influenza vaccines routinely during pregnancy [12,13]. Therefore, transplacental transfer of IgG is an important feature of maternal vaccination and natural immunity that may be leveraged for protection against neonatal pathogens.

Humoral immunity is thought to play an important role in protection against flavivirus infections [14–16]. ZIKV neutralizing antibodies likely provide durable protection against reinfection, therefore eliciting robust antibody responses is a key goal of ZIKV vaccine development [17]. Given the severe consequences of ZIKV disease in neonates, an ideal ZIKV vaccine would not only prevent infection in vaccine recipients but also protect fetuses from ZIKV congenital transmission. One way to protect fetuses could be transplacental transfer of ZIKV vaccine-elicited IgG. However, transplacental transfer of flavivirus-specific IgG also can lead to enhanced DENV disease during infancy, and may mediate transcytosis of ZIKV immune complexes [18–20]. Due to the key role of antibody transfer for newborn health, it is important to delineate the quantity and function of IgG transferred from mother to infant during pregnancy and to determine how transfer is altered by congenital pathogens.

The cross-reactive antibody responses between the antigenically similar DENV and ZIKV may lead to risks in early life for DENV disease enhancement in infants through transplacental transfer of flavivirus antibodies [19,21–24]. This risk is known to be mediated by antibodies generated from a prior DENV infection that can enhance DENV viremia and disease and ZIKV antibodies may have the potential to similarly enhance DENV infection [25–27]. Timing of past flavivirus infection also influences this risk as cross-neutralization of DENV and ZIKV is restricted to early convalescence, and antibody populations become more virus-specific over time [28,29]. While DENV-specific IgG are efficiently transferred in healthy pregnancies, waning maternal flavivirus-specific IgG levels throughout the first year of life leads to age-associated increased risk for severe DENV infection [19,30,31].

A second concern regarding placental IgG transfer is the potential of viral transcytosis from maternal to fetal compartment with immune complexes and subsequent enhanced fetal infection. Viruses such as human cytomegalovirus (HCMV) may co-opt this IgG transfer mechanism and traverse the placenta through the neonatal Fc receptor (FcRn)[32,33]. Recent work suggests that ZIKV infection of human placental explants can be enhanced by DENV antibodies [18,34]. However, available epidemiological data suggest that recent DENV infection provides modest protection against ZIKV[35,36], highlighting the need to better understand the impact of cross-reactive antibodies in flavivirus disease. Antibody-dependent transfer of ZIKV across the placenta, antibody-mediated enhancement of DENV disease in infants, and antibody-mediated protection of fetuses and newborns are all dependent on intact transplacental IgG transfer.

Maternal-fetal IgG transfer occurs at placental villus trees in contact with maternal blood [33]. In healthy pregnancies, IgG is transferred efficiently such that IgG concentrations in infant cord blood are often equivalent to or higher than the mother's levels at delivery [7,37]. Many factors contribute to the efficient transplacental IgG transfer via FcRn, such as IgG subclass, antibody avidity, gestational stage, hypergammaglobulinemia [33,38,39], and maternal conditions or placental pathology.

Therefore, the premise for studying transplacental IgG transfer in the context of ZIKV infection in pregnancy is twofold. Firstly, maternal HIV-1 infection and placental damage due to malaria infection are two clinical settings associated with impaired IgG transfer [40–44]. Maternal ZIKV infection also results in placental damage, possibly due to viral infection of multiple placental cell types and inflammatory immunopathology [45–48]. Interestingly, maternal infection with DENV, a closely related flavivirus, leads to increased risk of maternal mortality, pregnancy complications, premature birth, and low infant birth weight, as well as placental damage [49–53]. Yet, DENV infection in pregnancy does not impair transplacental IgG transfer in normal birth weight infants [54]. ZIKV infection in pregnancy can result in

prolonged viremia, suggesting a viral reservoir in an immune privileged site [55–58]. Secondly, maternal malaria and HIV-1 infection have been established to differentially impact transfer of IgG subpopulations specific to routine pediatric vaccines [40,59], which may be dependent on distinct Fc characteristics of each IgG population [60]. This phenomenon impacts antibody half-life in infant circulation and protection in early life. While prior studies show efficient transfer of recently boosted flavivirus antibodies after the ZIKV epidemic [61], we further examined whether pre-existing IgG subpopulations relevant to newborn health are efficiently transferred following maternal ZIKV infection.

To investigate whether ZIKV infection during pregnancy impairs transplacental transfer of IgG specific to flaviviruses and common vaccine antigens, we enrolled a prospective cohort of 26 pregnant women from Vitória, Brazil, who presented with fever and rash symptoms consistent with ZIKV infection during the recent Brazilian ZIKV epidemic. Of these women, 20 paired maternal plasma and infant cord blood samples were available from delivery and used to define the efficiency of transplacental IgG transfer. Evaluating the magnitude and subpopulations of IgG transferred to newborns who are exposed to ZIKV in utero is critical to understanding the extent of vaccine protection or risk of severe flavivirus infections in early life, and the development of antibody-based therapeutics.

Methods

Study population and design

This study enrolled 26 pregnant women living in Southeast Brazil, from which only 20 delivery samples were collected. All enrollees presented with fever and/or rash during the ZIKV epidemic to investigate maternal and infant immunity to ZIKV infection during pregnancy. Two groups of mother-infant pairs are included in this observational study: one group with maternal ZIKV infection during pregnancy, and the other group without ZIKV infection during pregnancy. Therefore, mothers with fever or rash during pregnancy but without ZIKV infection served as a comparator group for those with ZIKV infection and symptomatology.

Participants in this study were enrolled from July 2016 to October 2017 in the city of Vitória, which is the capital of the State of Espírito Santo. There are 4 million inhabitants and 50,000 births per year in Espírito Santo with the majority living in the metropolitan region of Vitória [62,63]. This region has had endemic DENV circulation for the past two decades [64] so it was expected that many participants would have been exposed to DENV previously and be seropositive for DENV. The first clinically suspected cases of ZIKV infection in Brazil were described in May 2015, and six months later (November 2015) the first autochthonous ZIKV case was confirmed in Espírito Santo [65–67]. In the months preceding our enrollment, there was a ZIKV incidence of 3,100 cases per 100,000 inhabitants, and a DENV incidence of 901 cases per 100,000 inhabitants in Espírito Santo [64]. In this timeframe, 77 CZS cases were reported to the State Health Department, including cases of microcephaly, defects of the central nervous system suggestive of congenital infection, or stillbirths [64]. Since this region reflected key features of flavivirus co-endemic settings and had ongoing ZIKV transmission, it was considered representative of regions with a burden of ZIKV disease and appropriate for study of maternal and infant ZIKV immunity.

Recruitment

The enrollment field site is based in the city of Vitória at the the Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), at the Universidade Federal do Espírito Santo. During our study, suspected ZIKV infection was considered a reportable condition to the State Health Department for all patients seen at public or private clinics within the state. Within a week of a case reported by a physician to

the State Health Department, a staff member reported notifications of pregnant suspected ZIKV cases within the State to NDI. Thus the recruitment strategy relied on passive surveillance systems, and no active recruitment was conducted in the community. Upon referral, staff at the NDI contacted pregnant suspected ZIKV cases within the Vitória metropolitan area by phone regarding interest in participating in this study. If interested, pregnant suspected ZIKV cases were invited to the NDI for written informed consent and first recorded visit in our study at the time of enrollment.

Enrollment and follow-up

At the initial visit for study enrollment, three inclusion criteria were confirmed: 1) pregnant women with rash or fever; 2) patient was a minimum of 18 years of age; 3) willingness to participate in study through provision of written informed consent. No exclusion criteria were defined. During the enrollment visit, a clinical history and physical evaluation were performed by a licensed physician, and blood and urine were collected. The following demographic information was collected at enrollment: age, municipality, date of birth, last menstrual date, recall of prior DENV disease, family members or neighbors with symptoms of ZIKV infection, use of insect repellent, prior vaccination for yellow fever virus, sexual activity in the 10 days before symptoms of ZIKV infection, symptoms of ZIKV infection in sexual partners, partner's use of insect repellent, and use of drugs, tobacco, or alcohol during pregnancy. Any clinical records and ultrasounds during the pregnancy before symptoms of ZIKV infection also were collected. All participants were referred for additional prenatal clinical care consultations and ultrasounds. Transportation to the NDI research site for every visit, as well as all recommended consultations with obstetrician-gynecologists and ultrasounds were funded by the study. For each participant, gestational age at the time of symptoms and delivery was calculated based on the last menstrual period date and confirmed by ultrasound (performed at 9–22 weeks).

After the enrollment visit, all participants were followed up weekly for up to four weeks, and monthly visits thereafter until delivery. Though followup of the mothers and infants in this study is ongoing, the present report only includes samples through delivery. At every visit, a standardized questionnaire was administered in the form of a semi-structured interview by a trained research staff member at NDI. Through this questionnaire we collected information on the presence and duration of symptoms related to ZIKV infection.

At the time of delivery, maternal blood and urine, infant cord blood, and placenta were collected. Newborn head circumference was measured by a nurse prior to hospital discharge, and reported to study staff. Head circumferences were converted to z score for the corresponding gestational age using the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project standards. Microcephaly was defined per WHO and INTERGROWTH-21st guidelines as a z score lower than -1.88, which is the 3rd percentile of newborns at each gestational age [68,69].

Sample collection

Blood samples were collected into heparin or EDTA tubes, stored at room temperature up to six hours, and centrifuged at 1300 x G for 10 minutes to obtain plasma. Infant umbilical cord blood was collected by clamping the cord, cutting it, and draining blood into sterile collection tubes. Urine samples were collected mid-stream in a sterile screw-top container and stored at -80°C. Plasma samples were stored at -80°C, then shipped to Duke University on dry ice.

Ethics statement

This prospective cohort study was approved by the Institutional Review Board of Hospital Casiano Antonio Moraes, Brazilian National Research Ethics Committee (CEP/CONEP

Registration number: 52841716.0.0000.5071), and Duke University Medical Center Institutional Review Board (Pro00100218). Women meeting enrollment criteria who provided written informed consent were included.

RT-PCR assay for detection of ZIKV

Viral RNA was extracted from 140 μ L of plasma and urine using QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Previously described RT-PCR primers and probes specific for ZIKV were used: ZIKV1086, ZIKV 1162c, and ZIKV1107-FAM [70]. For this one-step RT-PCR reaction, 5 μ L of RNA was combined with 500nM primers, 250nM probe and nucleotides in a total volume of 20 μ L, including SuperScriptIII RT and Platinum Taq DNA polymerase Mix (Invitrogen). The negative controls were serum from a 30-year old asymptomatic subject in Vitoria collected in 2016, and PCR grade water (no template control). The positive control was supernatant from ZIKV-infected Vero cells. Samples and controls were tested in duplicate, and ZIKV positivity was indicated by detection of amplification at <38 cycles in both duplicate wells on the Applied Biosystems 7500 Fast platform.

ZIKV IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA)

The CDC MAC-ELISA was adapted and used to detect IgM specific for ZIKV in maternal and cord blood plasma [71]. Briefly, 96-well high-binding ELISA plates were coated with 20 μ g/ml of mouse anti-human IgM (Sigma #I0759) overnight at 4°C. Plates were blocked for 30 minutes at room temperature with 5% milk in 0.5% TBST, and then samples were added at a 1:40 dilution in quadruplicate for 1 hour at 37°C. Antigen (ZIKV H/PF/2013 grown in C6/36 cells), or C6/36 conditioned media as a negative control, was added at a 1:40 dilution overnight at 4°C. Then, an HRP-conjugated pan-flavivirus antibody (6B6C-1) was added for 1 hour at 37°C, followed by TMB substrate. Plates were incubated for 20 minutes, upon which 1N H₂SO₄ was added to stop the reaction. A positive result required that the absorbance for a particular plasma was greater than 3-fold higher than the absorbance for that same plasma on C6/36 conditioned media. Samples run on each plate also include a confirmed ZIKV IgM positive and negative sample.

Cell culture and virus stocks

Vero-81 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Media (Gibco 11965092) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Cellgro, Cat#35-016-CV) and L-alanyl-L-glutamine (Thermofisher, GlutaMAX Cat#35050079). Viruses used for the focus reduction neutralization test were DENV1 (WestPac74), DENV2 (S-16803), DENV3 (CH54389), DENV4 (TVP-360), obtained from Dr. Aravinda de Silva, University of North Carolina at Chapel Hill, and ZIKV (H/PF/2013), obtained from the United States Centers for Disease Control and Prevention (Division of Vector-borne Diseases, Fort Collins, CO). For the detection of virion binding antibodies, the following viruses from BEI were used: ZIKV (PRVABC59), DENV1 (Hawaii), DENV2 (New Guinea C), DENV3 (Philippines), and DENV4 (H241). Virus stocks were grown in Vero-81 cells supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum and 10mM HEPES (Corning, Cat#25-060-CI).

Placental sampling and examination

Placenta samples were available from 11 ZIKV-infected and 8 ZIKV-uninfected subjects out of 26 mothers total in the cohort. Fragments were collected from the whole placenta up to 24

hours after delivery. Three sets of full thickness samples of placental parenchyma were obtained in every case and histology performed as previously described [72]. For the histological analysis, sections were fixed in 4% formaldehyde phosphate buffered solution, paraffin embedded, and 5 μ m sections were stained with hematoxylin and eosin. Histological sections were examined specifically for villous lesions by a pathologist. Villitis was diagnosed if inflammatory exudate was present in the trophoblast or in the villous stroma and was categorized by Knox & Fox and Redline criteria [73,74]. Placentas were assessed as low-grade villitis if less than 10 villi were involved per focus, and high-grade if more than 10 villi were involved per focus [73].

Focus reduction neutralization test

We used previously described methods for FRNT-50 in a 96 well plate [29]. Briefly, serial 5-fold dilutions of heat-inactivated plasma were added to 50–80 focus forming units of either DENV or ZIKV and incubated for 1 hour at 37°C, then transferred to a confluent plate of Vero-81 cells and incubated for 1 hour at 37°C. Then an overlay of 1% methylcellulose was added. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and stained with 1 μ g/mL of E60 mouse monoclonal antibody targeting the conserved flavivirus fusion loop [75], then detected with an anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate and True Blue substrate (KPL). FRNT-50 values were calculated with the sigmoidal dose-response (variable slope) curve in Prism 7 (GraphPad), constraining values between 0 and 100% relative infection. A valid FRNT-50 curve required an $R^2 > 0.75$, hill slope absolute value > 0.5 , and had to reach at least 50% relative infection within the range of the plasma dilutions in the assay.

Detection of virion binding IgG

To measure IgG binding responses against whole flavivirus virions, high-binding 96-well ELISA plates (Greiner) were coated with 30 ng/well of 4G2 antibody (clone D1-4G2-4-15) in carbonate buffer, pH 9.6 overnight at 4°C. Plates were blocked in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween-20 and 5% normal goat serum for 1 hour at 37°C, followed by an incubation with either ZIKV, DENV1, DENV2, DENV3 or DENV4 for 1 hour at 37°C. Plasma was tested at a 1:25 starting dilution in 8 serial 3-fold, 5-fold, or 10-fold dilutions, incubating for 1 hour at 37°C. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc; 109-035-008) was used at a 1:5,000 dilution, followed by the addition of SureBlue reserve TMB substrate followed by stop solution (KPL). Optical densities (OD) were detected at 450 nm (Perkin Elmer, Victor). ED₅₀ values were calculated with the sigmoidal dose-response (variable slope) curve in Prism 7 (GraphPad), which uses a least squares fit. An ED₅₀ value was considered valid if the OD at plasma dilution 1:25 was two (2SD) or three (3SD) standard deviations above the mean OD observed for 11 plasma samples from healthy U.S. subjects (2SD OD cut-offs: DENV-1 = 0.406, DENV-2 = 0.648, DENV3 = 0.906, and DENV-4 = 0.885; 3SD OD cut-off: ZIKV = 0.596). Software generated ED₅₀ values from curves with an OD at 1:25 plasma dilution below this cut-off were considered non-binding and plotted at the limit of detection.

Determination of transplacental transfer of IgG against routine pediatric vaccines

IgG binding to antigens from pediatric vaccines that are used routinely in Brazil was tested using a customized binding antibody multiplex assay on the Luminex platform, as previously described [76]. Pediatric vaccine antigens used for screening included: hepatitis B virus surface antigen (antigenic combination: adw), rubella virus capsid (AbCam), *Bordetella pertussis* toxin

and *Corynebacterium diphtheriae* toxin (Sigma-Aldrich), *Haemophilus influenzae* type B oligosaccharide-conjugated to human serum albumin (HbO-HA), and tetanus toxoid (Reagent Proteins). Antibody binding was detected with mouse anti-human IgG-PE (Southern Bio-Tech) and the fluorescent output was measured on a Bio-Plex 200 system (Bio-Rad Laboratories). Antibody concentrations in μg or International Units per mL were interpolated from corresponding sigmoidal curves of serially diluted WHO international reference sera (National Institute of Biological Standards and Control, Potters Bar, UK; NIBSC code numbers: 07/164, 09/222, 06/140, TE-3, 10/262, RUBI-1-94). The efficiency of transplacental IgG transfer was calculated for each mother-infant pair by dividing the concentration of infant pediatric vaccine-specific IgG by the concentration of maternal vaccine-elicited IgG.

Screening for neonatal TORCH pathogens

Data on Toxoplasma, rubella, and syphilis serological status was extracted from the mother's prenatal visit clinical records. All tests were performed by State Health Department or clinical laboratories using commercially available kits approved by the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA), as per the manufacturer's instructions. Chemiluminescent microparticle immunoassay kits were utilized for detection of Toxoplasma IgM and IgG, as well as rubella virus IgG. Syphilis serostatus was assessed using a Venereal Disease Research Laboratory test, which is a nontreponemal test. Congenital HCMV infection was evaluated in our research laboratory using quantitative PCR of infant cord blood. To pellet HCMV from plasma, 200 μL of infant cord blood was transferred to a high g-force micro-centrifuge tube and spun in an S45A fixed angle rotor at 30,000 rpm, 4°C, for 3 hours in a Sorvall Discovery M120 Ultracentrifuge. Then the supernatant was removed and the pellet re-suspended in 200 μL of 1x PBS. DNA was extracted using the Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit according to the manufacturer's protocol. To quantify and detect HCMV DNA, extracted DNA from each sample was amplified in six replicates. For this reaction, 5 μL of DNA was added to 15 μL SYBR Select Master Mix with (ThermoFisher Scientific), 5 μL of water, and 300 nM primers designed to amplify the immediate-early 1 (IE1) gene of HCMV (Integrated DNA Technologies). IE1 Forward Primer (20 bp): CAA GCG GCC TCT GAT AAC CA. IE1 Reverse Primer (24 bp): ACT AGG AGA GCA GAC TCT CAG AGG. For the negative control, PCR grade water was used as a substitute for extracted DNA in the reaction with in four replicate wells. A 10-fold, 7 series dilution of plasmid with the amplification region was serially diluted starting at 1×10^8 copies/mL to generate a standard curve for quantitation of HCMV DNA in each sample. The lowest dilution on the standard that could be reliably amplified across replicates was considered as the threshold for positivity (250 viral DNA copies/mL).

Definition of ZIKV infection

As ZIKV viremia is transient, RT-PCR does not reliably detect ZIKV infection beyond 10–14 days from exposure [77]. Therefore, we combined a RT-PCR diagnostic with serological approaches based on delivery maternal plasma FRNT-50 titer (FRNT-50) against ZIKV and DENV (types 1–4). “Primary ZIKV” infection (no prior DENV or ZIKV infection) was defined as either i) a high ZIKV FRNT-50 (>300) and a low DENV1-4 FRNT-50 (<300), or ii) a low ZIKV FRNT-50 titer that is still >25 and at least one DENV FRNT-50 >25 , suggesting only a weak transient cross-neutralizing response between ZIKV and DENV. A history of both ZIKV and DENV (“DENV+ZIKV”) was defined as high ZIKV FRNT-50 (>300), and at least one DENV FRNT-50 >300 . DENV immunity only (no ZIKV immunity) was classified as low ZIKV FRNT-50 (<300), but DENV FRNT-50 >25 (Fig 1). Thus, we defined ZIKV infection as “primary” or “secondary” ZIKV based on serological evidence of prior DENV exposure,

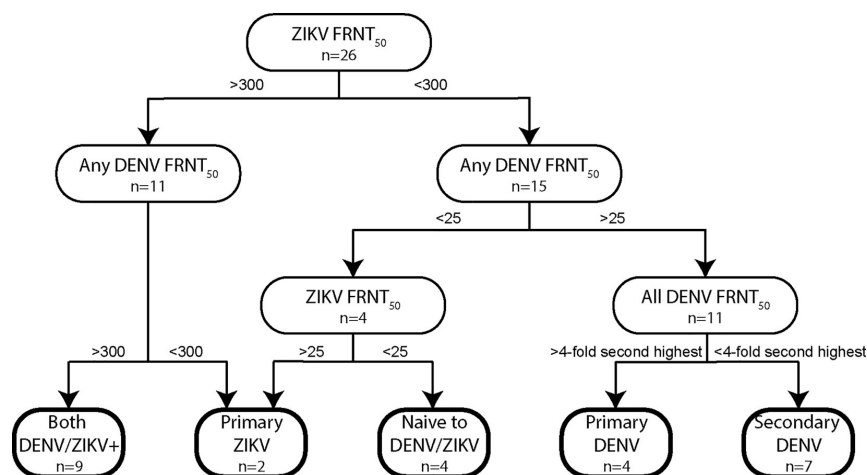


Fig 1. Algorithm used to categorize flavivirus exposure history according to ZIKV and DENV focus-reduction neutralization-50 titers (FRNT-50). Maternal and cord blood plasma were tested by FRNT50 against 5 viruses (ZIKV and 4 DENV serotypes) and FRNT-50 titers used to infer flavivirus exposure history. All samples were anti-flavivirus IgM negative, reducing the likelihood of cross-reactivity resulting from recent infections.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.g001>

whereas the ZIKV-uninfected group may include subjects naïve to both ZIKV and DENV or those exposed to only DENV.

Since infection with one DENV serotype results in neutralizing activity against that same serotype [78], and a subsequent infection with a different serotype results in broad DENV cross-neutralizing activity, we designed criteria to differentiate primary and secondary DENV infections based on whether the second-highest DENV FRNT-50 was within four-fold of the highest DENV FRNT-50. To further account for serological cross-reactivity from recently infected subjects in assessing ZIKV infection status, we confirmed DENV-negative status by RT-PCR where acute samples were available. Sera with FRNT-50 values below the limit of detection for all five viruses were classified as ZIKV and DENV naïve. This definition was based on the assumption that a dominant ZIKV neutralization response at delivery was attributable to the recent symptomatic illness during pregnancy and not a prior ZIKV infection, given the recency of ZIKV introduction to the region during the period of enrollment. RT-PCR results from a plasma sample collected <7 days after symptom onset that were discordant with the serological assessment were repeated.

Statistical analysis and power

Statistical analysis was performed using SAS (version 9.4) and Prism software (GraphPad; version 7). Serological responses are presented as a magnitude of flavivirus binding IgG (ED50), neutralizing (FRNT-50), and vaccine antigen binding IgG ($\mu\text{g/mL}$ or IU/mL). These measures were assessed for each of the 26 maternal and 20 infant delivery samples, for each antigen tested (S1 Fig). The percent IgG transferred from mother to infant describes the transplacental transfer efficiency, and is calculated as the ratio of the magnitude of infant cord blood IgG binding level (measured as ED50 or $\mu\text{g/mL}$) to the maternal IgG binding level multiplied by 100. Note that this percent transfer ratio is specific to each antigen tested. Data are presented as dot plots of percent transfer for each mother infant pair in the ZIKV-infected group as compared to the ZIKV-uninfected group. Scatter plots are used to display the relationship and distribution of the maternal IgG level as compared to the infant IgG level, by antigen.

With a sample size of 26 mothers and 20 infant samples, our study is powered to reject the null hypothesis (no correlation between maternal and infant antibody responses), at an alpha of 0.05 with a power of 0.89 for neutralizing titer correlations, and 0.99 for correlations of IgG binding to flaviviruses or vaccine antigens. Therefore, this study is adequately powered to detect associations between maternal and infant antibody measures. For Wilcoxon Rank tests comparing IgG transfer efficiency between ZIKV-infected and uninfected mothers, this study is powered to assess significant differences between ZIKV-infected and uninfected groups in flavivirus IgG binding at an alpha of 0.05 (power = 0.93), but not for vaccine antigen IgG (power = 0.15) and neutralizing IgG (power = 0.48). This is due to differences in the extent of variability in measures by assay type.

Due to the small size of this cohort, a Gaussian distribution could not be inferred and therefore non-parametric statistical tests were applied. To compare IgG binding between ZIKV-infected and -uninfected groups, the Wilcoxon Signed and Exact Wilcoxon Rank Sum tests were applied. For correction of multiple comparisons, the Bonferroni correction was applied. Data were not stratified beyond the ZIKV infection status exposure group. The Kendall Tau test was used to evaluate correlations between maternal and infant responses with the alpha level of significance set to 0.05.

Results

Cohort characteristics

Pregnant women aged 18 to 39 years were enrolled based on symptoms suggestive of ZIKV infection, such as rash, arthralgia, and fever (Table 1). Nearly all enrolled participants (24/26) were from the Vitoria metropolitan area. One subject (B1_0037) exhibited prolonged viremia, which was detected by RT-PCR up to 42 days post symptoms. Mothers were tested for common congenital “TORCH” pathogens where samples were available (S1 Table). These data indicate no recent *Toxoplasma* infections (no maternal IgM positive sera), high IgG seropositivity to rubella virus, and no evidence for maternal syphilis infection. Testing of infant cord blood for HCMV DNA found one case of congenital HCMV transmission in the ZIKV-uninfected group.

Table 1. Symptomatology of patient cohort at the time of enrollment based on ZIKV detection by RT-PCR.

	ZIKV PCR+ (n = 9)	ZIKV PCR- (n = 13)	ZIKV PCR ND (n = 4)	Total (n = 26)
	9/26	13/26	4/26	26/26
Proportion of mothers symptomatic in each gestational trimester				
First	3/9	3/13	2/4	8/26
Second	4/9	7/13	2/4	13/26
Third	2/9	3/13	0/4	5/26
Proportion with symptoms				
Rash	8/9	13/13	3/4	24/26
Arthralgia	5/9	4/13	3/4	12/26
Fever	3/9	5/13	3/4	11/26
Conjunctivitis	4/9	4/13	3/4	11/26
Myalgia	5/9	4/13	1/4	10/26
Headache	4/9	7/13	3/4	14/26
Retro-orbital pain	2/9	4/13	2/4	8/26
Lymphadenopathy	1/9	1/13	0/4	2/26

ZIKV = Zika virus, RT-PCR = reverse-transcription polymerase chain reaction, ND = not done.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.t001>

Table 2. ZIKV and DENV serotype specific humoral immune profile. Serologic classification of maternal flavivirus infection history was determined by focus reduction neutralization titer 50% (FRNT-50) against ZIKV and DENV in plasma taken at delivery.

Sample ID	Classification	Days since symptoms	FRNT ₅₀					ZIKV RT-PCR
			ZIKV	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	
B1_0015	Naïve	NA	<25	<25	<25	<25	<25	-
B1_0019	Naïve	75	<25	<25	<25	<25	<25	-
B1_0021	Naïve	213	<25	<25	<25	<25	<25	-
B1_0039	Naïve	35	<25	<25	<25	<25	<25	ND
B1_0008	Primary ZIKV	184	3918	126	209	251	106	+
B1_0030	Primary ZIKV	77	1399	<25	<25	<25	<25	+
B1_0001	DENV+ZIKV	193	10858	898	597	1270	491	+
B1_0002	DENV+ZIKV	173	14959	1524	666	5571	502	+
B1_0004	DENV+ZIKV	164	2533	1348	1818	3047	537	+
B1_0005	DENV+ZIKV	217	5213	1379	4218	2270	359	+
B1_0007	DENV+ZIKV	208	5503	1371	2511	822	353	ND
B1_0014	DENV+ZIKV	210	3095	354	1625	930	388	-
B1_0031 ^a	DENV+ZIKV	94	1610	2723	2492	10521	1510	+
B1_0027	DENV+ZIKV	91	654	1079	1711	3730	513	-
B1_0037	DENV+ZIKV	117	11764	2141	8019	22873	4029	+
B1_0009 ^b	Primary DENV2	240	<25	205	1887	238	240	+
B1_0035	Primary DENV2	114	107	68	1201	106	68	-
B1_0011	Primary DENV3	39	<25	374	640	3172	362	-
B1_0006	Primary DENV3	211	<25	89	308	4735	82	ND
B1_0003	Secondary DENV	217	<25	797	122	304	72	-
B1_0016	Secondary DENV	172	<25	232	3222	2051	74	ND
B1_0023	Secondary DENV	92	<25	4417	1693	380	<25	-
B1_0024	Secondary DENV	146	<25	1395	1362	505	299	ND
B1_0026	Secondary DENV	46	<25	2848	1876	635	292	ND
B1_0033	Secondary DENV	91	220	3123	1996	843	197	-
B1_0034	Secondary DENV	111	<25	193	568	939	76	-

ZIKV RT-PCR performed on plasma collected at enrollment (median 146 days since symptoms).

ND = Not Done

^a FRNT-50 based on maternal plasma 3 months after delivery

^b Likely false positive ZIKV RT-PCR result

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.t002>

Serologic profile of flavivirus neutralization

ZIKV testing by RT-PCR was performed in plasma and urine, collected between 2 and 15 days post symptom onset in 22 out of 26 women (Table 2). According to plasma neutralization titers, most women were DENV seropositive, regardless of ZIKV infection status. The remaining four women were referred for enrollment only after the resolution of symptoms, at 36 to 217 days since symptoms, and thus their negative ZIKV RT-PCR result was inconclusive. All women with acute samples available were negative for DENV by RT-PCR at enrollment, and one (B1_0035) was positive for CHIKV by RT-PCR (S2 Table).

Because ZIKV viremia typically is detected only in the acute phase of infection (≤ 14 days after exposure), and the possibility of a false positive RT-PCR ZIKV test, we used serology to classify maternal ZIKV exposure as well as prior DENV infection history. Since detection of ZIKV-binding antibodies by ELISA does not distinguish ZIKV exposure from other flaviviruses, and this region has high DENV seroprevalence, we determined the FRNT-50 of all

maternal plasma samples collected at delivery, which ranged from 39 to 217 days following onset of ZIKV symptoms. Although DENV and ZIKV antibodies cross-react in binding assays (e.g. ELISA), we and others have shown that there is minimal cross-neutralizing activity in convalescent sera [23,29]. By these definitions, 11 out of 26 women had serological evidence of ZIKV infection, only 2 of which were DENV naïve, indicating a primary ZIKV infection (Table 2). Two out of 26 women were naïve for both ZIKV and DENV, and the rest had serological evidence of DENV infection with no ZIKV infection. Though one mother classified as ZIKV naïve (Primary DENV) by serology (B1_0009) had a positive RT-PCR result at initial presentation, subsequent RT-PCR testing of stored plasma was negative, suggesting that the initial result was a false positive. Of note, two patients (B1_0002 and B1_0037) were ZIKV IgM positive at delivery.

Infant outcomes

At birth, all infants born to ZIKV negative mothers were assessed to be healthy. Of the 11 infants born to mothers with serological evidence of ZIKV infection, one infant (born to B1_0001) presented with microcephaly at birth, with a head circumference below 3rd percentile based on WHO International Standards, and neurologic abnormalities such as cortical-subcortical calcifications, dysgenesis of the corpus callosum, pachygyria, and colpocephaly upon transfontanelar ultrasound and CT scan [79]. Delivery cord blood sample was not available for this infant. Neurodevelopmental assessments of the infants from this cohort are ongoing.

Placental histology

Lymphohistiocytic chronic villitis (inflammatory lesions in the placenta with an infiltrate of lymphocytes and macrophages) [80], was observed in the placentas of 5 of 11 (45%) ZIKV-infected mothers (Table 3 and Fig 2). The villitis was focal, involving less than 10 villi per focus, consistent with mild, low grade chronic villitis [73,74]. One placenta (B1_0004) demonstrated mild necrosis in the villitis focus and two placentas (B1_0004 and B1_0014) demonstrated small focal avascular villi with stromal fibrosis, consistent with fetal artery thrombosis in the absence of any other abnormality. We tested frozen placental samples by qRT-PCR but did not detect ZIKV RNA. In contrast, no villitis was observed in any of the 8 ZIKV-uninfected subjects.

Magnitude and kinetics of IgG binding responses to ZIKV and DENV over the course of pregnancy

ZIKV infection during pregnancy has been associated with prolonged viremia in humans and non-human primates [55,81–83], and one patient in our study (B1_0037) exhibited prolonged viremia, with plasma testing positive for ZIKV RNA up to 42 days post onset of symptoms (Fig 3). We compared ZIKV antibody binding dynamics between patient B1_0037 and two other ZIKV-infected women from the cohort for whom multiple sequential serum and urine samples were available for analysis (B1_0014 and B1_0030). B1_0030 only tested positive for ZIKV in urine by RT-PCR at the first 2 visits (within 18 days of symptoms), and B1_0014 tested ZIKV-negative by RT-PCR but was classified as ZIKV-infected by serology. Of note, these cases have different flavivirus exposure histories as B1_0014 had prior exposure to DENV, and B1_0030 had a primary ZIKV infection. The magnitude of maternal plasma IgG binding to ZIKV, DENV1, DENV2, and DENV4 was measured by virion capture ELISA and neutralization was measured by FRNT-50 in plasma collected at every visit during gestation and delivery (Fig 3). We found that all three subjects sustained high levels of flavivirus-binding IgG and

Table 3. Placental pathology. In 5 of 11 ZIKV-infected cases, focal villitis was observed as defined by less than 10 villi per focus.

Subject	Placental Histology Findings
ZIKV infected	
B1_0001	Villitis was not observed
B1_0002	Villitis was not observed
B1_0004	Villitis was observed in two foci, consistent with mild, low grade, chronic villitis of unknown etiology, occurrence of stromal fibrosis and occurrence of necrosis
B1_0005	Villitis was not observed
B1_0007	Villitis was not observed
B1_0008	Villitis was not observed
B1_0031	Villitis was not observed
B1_0027	Villitis was observed in two foci, consistent with mild, low grade, chronic villitis of unknown etiology
B1_0030	Villitis was observed in one focus, consistent with mild, low grade, chronic villitis of unknown etiology
B1_0014	Villitis was observed in two foci, consistent with mild, low grade, chronic villitis of unknown etiology and occurrence of stromal fibrosis
B1_0037	Villitis was observed in one focus, consistent with mild, low grade, chronic villitis of unknown etiology
ZIKV uninfected	
B1_0003	Villitis was not observed
B1_0009	Villitis was not observed
B1_0033	Villitis was not observed
B1_0026	Villitis was not observed
B1_0023	Villitis was not observed
B1_0016	Villitis was not observed
B1_0034	Villitis was not observed
B1_0015	Villitis was not observed

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.t003>

neutralizing antibodies throughout pregnancy, with the peak antibody response detectable one to three weeks post onset of symptoms.

Transplacental transfer of flavivirus-specific and cross-reactive IgG in ZIKV-infected and uninfected women

To determine if ZIKV infection during pregnancy disrupts transplacental transfer of flavivirus-specific IgG from mother to infant, we compared the magnitude of flavivirus-specific antibody binding responses in maternal plasma at delivery and infant cord blood plasma by virion capture ELISA in 20 mother-infant pairs with delivery samples available. For those with ZIKV

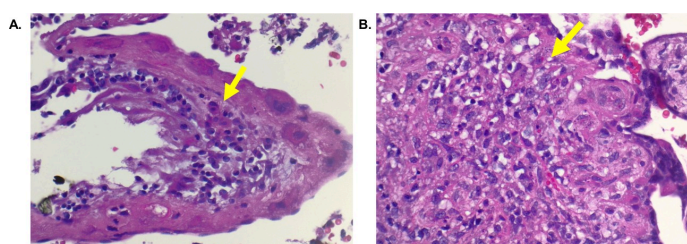


Fig 2. Histology of the placenta from a ZIKV-infected pregnant mother. Placental tissue from subject B1_0004 was stained with hematoxylin and eosin. Lymphocytes and macrophages are present in the chorionic villi (A-100X, B-400X). The arrow indicates inflammatory cells within a villus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.g002>

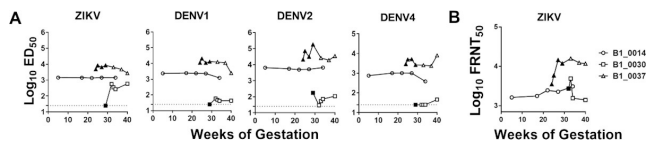


Fig 3. ZIKV binding and neutralizing IgG responses persist throughout pregnancy. A. Maternal plasma collected serially from three women diagnosed with ZIKV during pregnancy was assessed for IgG binding responses to ZIKV via virion capture ELISA. The estimated dilution at 50% of maximal binding (ED₅₀) was calculated from serial dilutions of maternal plasma. Black filled points indicate time points when ZIKV viremia was detected by RT-PCR. B. ZIKV focus reduction neutralization titer throughout pregnancy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.g003>

infection, IgG binding to ZIKV, DENV1, DENV2, DENV3, and DENV4 virions was not significantly different between maternal plasma and paired infant cord blood from delivery (Wilcoxon Signed Rank Test; Bonferroni adjusted $P > 0.05$ for all viruses tested).

We calculated the efficiency of mother-to-fetus transfer of flavivirus-specific IgG as the ratio of the magnitude of infant cord blood antibody binding response to the maternal response, expressed as a transfer efficiency percentage (Fig 4 and S3 Table). For those with paired maternal and infant samples available, we compared the flavivirus-specific IgG transfer efficiencies in ZIKV-infected ($n = 8$) and uninfected ($n = 12$) women, and found no significant difference in the transplacental transfer efficiency of flavivirus-specific IgG between the groups (Exact Wilcoxon Rank Sum Test; Bonferroni adjusted $P > 0.05$ for all viruses tested), indicating that ZIKV infection during pregnancy did not disrupt transplacental transfer of flavivirus-specific IgG.

As expected, in the virion capture ELISA we observed cross-reactive binding to ZIKV with plasma from 8 women who were DENV seropositive but ZIKV-uninfected. These ZIKV-uninfected subjects also demonstrated transfer of ZIKV-binding (cross-reactive, non-neutralizing)

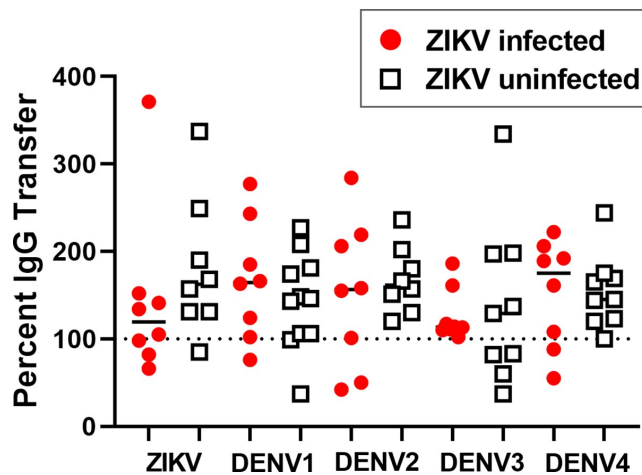


Fig 4. Efficient transplacental transfer of flavivirus-specific IgG. Plasma antibody binding to ZIKV, DENV1, DENV2, DENV3, and DENV4 was measured by virion capture ELISA using serial dilutions of maternal plasma and infant cord blood collected at delivery. The dilution at 50% of maximal binding (ED₅₀) was calculated and the infant ED₅₀ was assessed as a percentage of the maternal ED₅₀ to yield percent transfer. Dotted line indicates 100% transfer and the solid line indicates the median. No significant differences in percent transfer were found in comparing ZIKV-infected and uninfected women for the all viruses tested by Exact Wilcoxon Rank Sum Test; Bonferroni adjusted $P > 0.05$ for all viruses tested.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.g004>

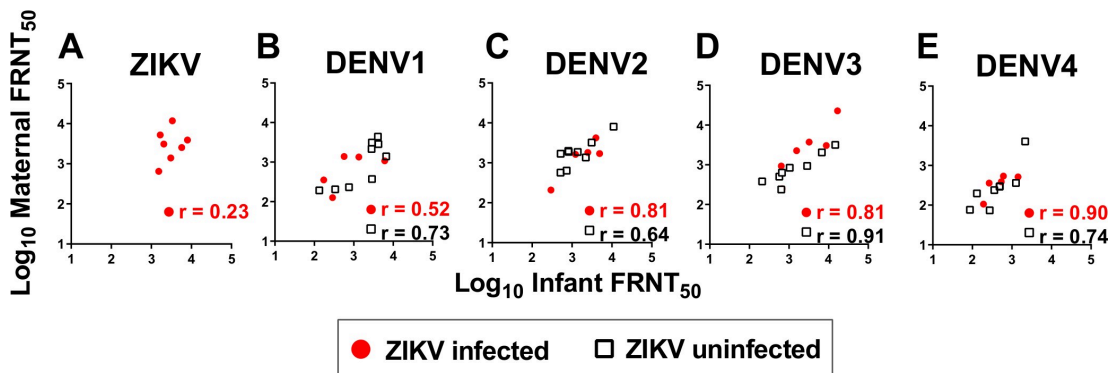


Fig 5. Maternal ZIKV infection does not disrupt transplacental transfer of DENV neutralizing IgG. Kendall Tau correlation of focus neutralization reduction titer-50 (FRNT-50) for maternal plasma and infant cord blood, separated by maternal ZIKV serostatus. Panels indicate correlation of maternal and infant neutralizing titers by flavivirus: ZIKV (A), DENV1 (B), DENV2 (C), DENV3 (D) and DENV4 (E). All correlations are $P < 0.05$, except DENV1 and ZIKV in ZIKV-infected mothers where $P < 0.09$ and $P < 0.45$ respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.g005>

IgG from mother to infant (Fig 4 and S3 Table). As expected, we did not detect ZIKV-specific IgG in 2 ZIKV/DENV naïve subjects or in 2 DENV seropositive patients and therefore percent IgG transfer could not be calculated for these subjects. Of the 8 DENV seropositive subjects with ZIKV-reactive IgG transferred to cord blood, 5 were seropositive for multiple DENV serotypes (B1_0016, B1_0024, B1_0026, B1_0033, and B1_0034), and 2 were seropositive for only a single DENV serotype (B1_0009 and B1_0011), indicating that ZIKV cross-reactive IgG can be transferred to the fetus in the case of primary or secondary DENV exposure history. Moreover, percent IgG transfer was not significantly associated with magnitude of the type-specific IgG in maternal plasma (S2 Fig).

Additionally, we assessed whether there was efficient transplacental transfer of flavivirus neutralizing IgG in ZIKV-infected pregnant women. The DENV FRNT-50 of paired maternal and cord blood plasma also were positively correlated, suggesting that functional maternal IgG were transferred efficiently to the fetus (Fig 5).

Transplacental transfer of vaccine-elicited IgG in ZIKV-infected and uninfected women

To assess whether ZIKV infection during pregnancy impacts placental transfer of IgG against vaccine antigens, we measured the magnitude of IgG binding against a panel of standard vaccine antigens for hepatitis B virus, rubella virus, *Haemophilus influenzae* type B, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, and *Clostridium tetani*. We found no significant differences in the magnitude of vaccine-specific IgG in maternal plasma and infant cord blood from delivery, in both ZIKV-infected and uninfected pregnant women (Wilcoxon Signed Rank Test, $P > 0.05$ for all vaccine antigens). Moreover, in ZIKV-infected and uninfected cases, we observed strong positive correlations in the concentration of vaccine-specific IgG between maternal plasma and infant cord blood for all vaccine antigens tested, indicating efficient placental transfer of vaccine-specific IgG levels regardless of ZIKV infection status (Fig 6 and S3 Table). Based on the protective vaccine-specific IgG levels established by the WHO, infants born to mothers who had protective levels of vaccine-specific IgG and ZIKV infection during pregnancy, received similarly protective IgG levels as infants born to ZIKV-naïve mothers [84].

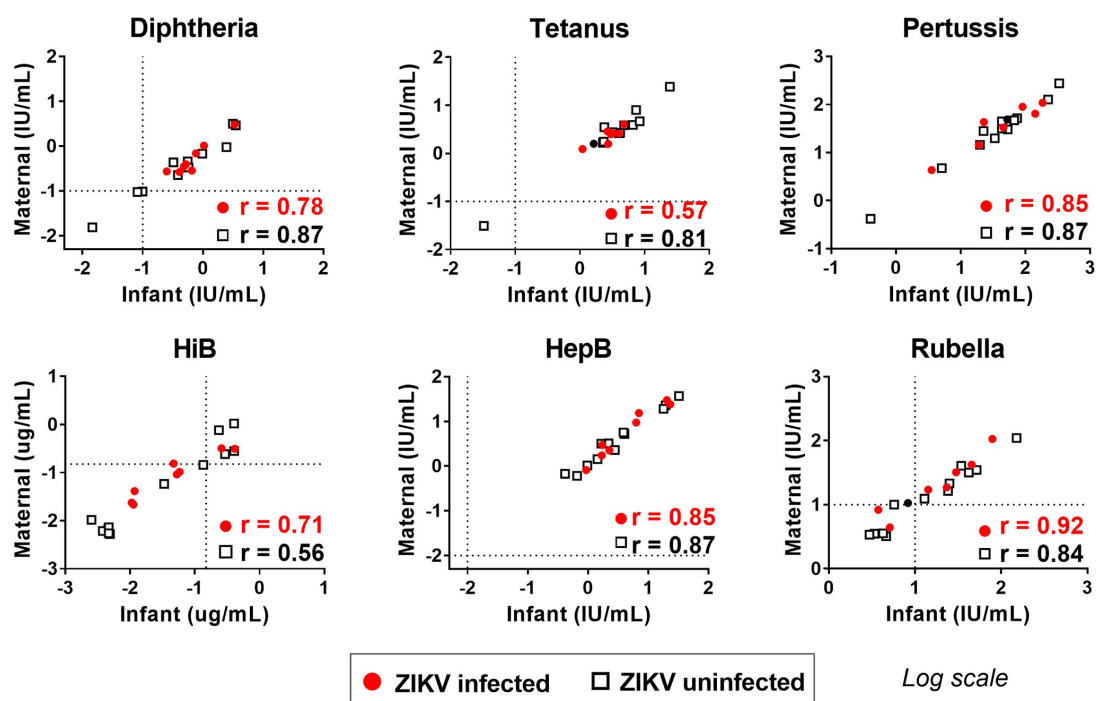


Fig 6. Strong correlation of maternal and infant vaccine-elicited IgG levels in ZIKV-infected mothers indicates efficient transplacental transfer during maternal ZIKV infection. IgG response to vaccine antigens in infant cord blood plasma and maternal plasma collected at delivery were measured by a binding antibody multiplex assay. Concentrations of vaccine-elicited IgG responses were calculated from reference sera standards as International Units (IU)/mL or $\mu\text{g}/\text{mL}$. ZIKV-infected ($n = 8$) and uninfected ($n = 12$) subjects are indicated in red and black respectively, and dotted lines denote WHO established protective IgG levels. Kendall Tau correlations were performed for each ZIKV infection group, with $p < 0.05$ for all.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007648.g006>

Altogether our study demonstrates that efficient transfer of IgG from mother to fetus is maintained in this cohort irrespective of maternal ZIKV infection or placental pathology. Furthermore, this efficient transplacental IgG transfer includes both vaccine-specific antibodies and flavivirus antibodies relevant to maternal vaccination strategies and flavivirus disease in newborns.

Discussion

Transplacental transfer of IgG provides passive immunity to fetuses, which is critical to protecting newborns in their first months of life [7]. However, maternal conditions and infections during pregnancy may disrupt IgG transfer via mechanisms including placental impairment and inflammatory responses [85]. Moreover, viral antigenic complexity and natural history of infection shapes the IgG populations elicited, which have different propensities to be transferred across the placenta by the FcRn [85,86]. Thus, we investigated the impact of maternal infection with ZIKV on maternal-fetal IgG transfer in 20 mother-infant pairs from a prospective cohort in Vitoria, Brazil. We assessed transfer of key IgG populations, including ZIKV and DENV binding and neutralizing IgG, as well as IgG specific to routine vaccine antigens.

For all flavivirus and vaccine antigens tested, we found that maternal and infant binding IgG levels were highly correlated in both ZIKV-infected and -uninfected groups. Also, there were no significant differences in the magnitude of flavivirus-binding IgG levels between

mothers and infants among mothers with ZIKV infection during pregnancy. Moreover, DENV neutralization and binding IgG levels were highly correlated between mothers and infants regardless of maternal ZIKV infection in pregnancy. In the case of DENV1 and ZIKV neutralizing IgG levels, though the positive correlation between mother and infant neutralizing titer was weak ($r = 0.23$ and 0.52 respectively), the outliers of the linear trend were shifted such that the magnitude of infant IgG neutralization is greater than that of the maternal neutralizing titer, indicating efficient IgG transfer. This positive association of maternal and infant IgG levels represents active transfer that is not solely dependent on the magnitude of the type-specific IgG in maternal plasma. Also, the substantially overlapping ranges in antibody levels between mothers and infants suggests no biologically relevant differences in transplacental transfer of flavivirus binding and neutralizing IgG, or of vaccine specific IgG after ZIKV infection in pregnancy. Cumulatively, these data indicate no evidence of impairment in the transplacental IgG transfer at the time of birth after maternal ZIKV infection during pregnancy, as compared to mothers with fever and rash during pregnancy without ZIKV infection.

Our study corroborates recent findings demonstrating efficient transfer of ZIKV, DENV3 and DENV4 neutralizing antibodies in mother-infant pairs from the Northeast of Brazil in 2016 [61]. Specifically, Castanha et al. found that newborns with the outcome of microcephaly, some of whom were exposed to ZIKV in utero, had no evidence of impaired transfer of neutralizing antibodies at birth as compared to controls without microcephaly [61]. Our work complements the finding from that case-control study through a prospective cohort design, in which we identified women with ZIKV infection during pregnancy and followed up until delivery to quantify impact on transplacental IgG transfer. This prospective design adds a temporality to the association between ZIKV infection and neutralizing IgG transfer observed earlier [61]. Moreover, our study represents a geographically distinct site in Southeast Brazil, with lower ZIKV prevalence. Altogether, this work strengthens the body of evidence indicating no impairment in transplacental IgG transfer with ZIKV infection in pregnancy, with implications for maternal vaccination strategies and flavivirus disease in newborns.

As different viral antigen-specific IgG subpopulations may be differentially impaired in placental transfer due to maternal infections and conditions during pregnancy [87], we tested IgG transfer of non-flavivirus antibodies that are specific to diverse vaccine antigens. IgG elicited by routine pediatric and boosted maternal vaccines were also transferred efficiently despite maternal ZIKV infection. In cases where the mother had a protective level of IgG against vaccine-preventable infections, the infant received a similarly protective level.

Our study further aimed to complement existing evidence of placental pathology caused by ZIKV infection, and determine whether this could have a role in the transplacental transfer of humoral immunity. Previous observations of impaired transplacental IgG transfer in the setting of maternal HIV and malaria infection generally have been noted in conjunction with identifiable placental pathology [40,85]. Although we were unable to detect ZIKV RNA in placentas from our study, another study identified ZIKV RNA in 54% of placentas from 44 ZIKV-infected women [48]. We found that 5 of 11 ZIKV-infected women in our cohort had chronic placental villitis, higher than the 5–15% expected for term placentas [88]. Notably, this pathology is similar to that described in placental infection with HCMV, rubella virus, or *Toxoplasma gondii* [80]. In contrast, no villitis was observed in the 8 placentas assessed from ZIKV-uninfected mothers, suggesting that villitis in the ZIKV-infected subjects may have been specific to maternal ZIKV infection in pregnancy. Furthermore, to assess the impact of ZIKV infection associated placental pathology on IgG transfer, subgroups of ZIKV-infected subjects with noted placental pathology would have to be compared to a ZIKV-infected subgroup without placental pathology. However, our limited sample size of 8 ZIKV-infected individuals with paired infant samples precludes formal comparison.

We found that despite disruption of placental architecture in nearly half of our ZIKV-infected pregnancies, transplacental transfer of flavivirus-binding and -neutralizing IgG was sustained following maternal ZIKV infection. This finding is relevant to future studies of vaccine-elicited fetal protection against ZIKV, as animal studies demonstrate envelope binding and neutralizing antibodies as correlates of protection against ZIKV infection [89,90]. Transfer of flavivirus-neutralizing antibody is relevant because neutralization titers are known to correlate with vaccine protection against other flaviviruses, including Japanese encephalitis virus, yellow fever virus, West Nile virus, and tick-borne encephalitis virus [91–94]. Moreover, in ZIKV-infected women with serial plasma collection during pregnancy, ZIKV-specific IgG levels were sustained throughout gestation after peak response within 3 weeks of symptoms. These kinetics suggest that transfer of flavivirus-specific IgG to the fetus should readily occur throughout the 2nd and 3rd trimesters of pregnancy following maternal ZIKV infection. While it is possible that ZIKV infection during pregnancy could result in a transient disruption of transplacental IgG transfer that is restored by the time of birth, our goal was to evaluate levels of maternal IgG present at delivery as these transferred IgG have the potential to modulate protection or disease risk in infants [7–10,18,34,95].

There are several implications of the findings in this study. Efficient transfer of ZIKV-neutralizing IgG in ZIKV-infected mothers could be a mode of transferring protective humoral immunity from mother to infant, despite infection during pregnancy. Notably, transfer of protective levels of vaccine-specific IgG to boost passive immunity in the newborn is a key objective of maternal immunization [96] and our findings suggest that ZIKV infection during pregnancy does not impair this protective mechanism. With candidate maternal ZIKV vaccines or therapeutics, this may be one mode of conferring passive immunity to the fetus and, potentially, reducing the burden of congenital and neonatal ZIKV infection.

Alternatively, transfer of cross-reactive non-neutralizing DENV-elicited antibodies may pose a risk as antibodies from primary DENV infection can enhance secondary DENV infection, leading to more severe disease in infants as maternal antibody titers wane [20,25]. We detected transplacental transfer of ZIKV-binding IgG in DENV-immune mothers without ZIKV infection. Cross-reactive ZIKV-elicited antibodies may be able to mediate antibody-dependent enhancement of subsequent DENV infection in early infancy [20,27,97–99]. Additionally, there is some concern that efficient IgG transfer may facilitate transcytosis of ZIKV-IgG complexes into the fetal compartment, a suggested mechanism of fetal infection for HCMV [18,32]. Thus, transplacental transfer of ZIKV cross-reactive IgG should be considered in the evaluation of candidate ZIKV vaccines, as sub-neutralizing levels of cross-reactive IgG may increase the risk of severe flavivirus infections in fetuses or infants.

Limitations of this study include the small sample size of 26 mothers, including 20 mother-infant pairs with delivery samples available. In assessing statistically significant associations ($\alpha = 0.05$) via Kendall-Tau correlations between mothers and infants, we had 89% to 99% power across assays to detect a true direct correlation of maternal and infant IgG levels. Therefore, our conclusions of intact placental IgG transfer are predominantly based on the high levels of association of maternal and cord blood antibody responses.

As for significant differences in the magnitude of IgG responses between ZIKV-infected and uninfected mother-infants pairs via the Wilcoxon Signed-Rank Test, this study has a 93% power to detect differences in flavivirus binding responses between ZIKV-infected and uninfected groups ($\alpha = 0.05$). However, the study is underpowered (power < 50%) to detect significant differences in magnitude of neutralizing or vaccine-specific responses between ZIKV-infected and -uninfected subjects due to higher levels of variability in these measures. Consequently, significant differences are only reported and analyzed for the flavivirus-binding IgG levels, but not for neutralization and vaccine-elicited IgG levels. Though, noting the

substantially overlapping range of immune responses in the ZIKV-infected group as compared to the ZIKV-uninfected group is biologically relevant to our understanding of transplacental IgG transfer in the setting of maternal ZIKV infection and could inform future studies on neonatal flavivirus immunity.

Another limitation of our study is the challenge of determining whether subjects were truly exposed to ZIKV during pregnancy, as symptoms could have resulted from other infections and/or ZIKV infection could have occurred prior to pregnancy. Since viremia may have subsided by the time of study enrollment, we developed an algorithm to define ZIKV infection serologically, even in the context of cross-reactive antibodies from prior DENV infection. This algorithm and ZIKV case definition were based on the rational assumption that ZIKV seropositivity resulted from a recent infection (i.e. during pregnancy) due to the timing of our study relative to the introduction of ZIKV into Brazil. This assumption will not apply in future studies, since the high force of infection during the 2015–2017 outbreak and the potential for subsequent endemic transmission mean many women will already be ZIKV seropositive before pregnancy. Moreover, this study reflects the findings in a symptomatic pregnancy cohort, whereas the majority of ZIKV infections are asymptomatic [100–102].

In summary, this study demonstrates efficient transplacental transfer of IgG specific to diverse flavivirus and routine vaccine antigens following ZIKV infection during pregnancy in a unique prospective mother-infant cohort from the Latin American ZIKV outbreak. Transplacental transfer of ZIKV-specific IgG in pregnancy may contribute to protection of the fetus from congenital Zika syndrome and the infant from ZIKV infection. However, efficiently transferred IgG might mediate adverse effects in infants including increased risk of severe DENV in infancy, as well as potentially mediating FcRn-dependent transfer of ZIKV immune complexes into the fetal compartment. The relationship between efficient maternal IgG transfer and reduced or enhanced congenital infection or disease remains to be further elucidated. Delineating ZIKV-specific IgG levels and function that favor fetal and neonatal protection will be key for guiding a strategic timeline for pediatric vaccine boosts, timing of vaccine administration during pregnancy, and dosing of antibody therapies targeted for pregnancy. Longitudinal investigations of neonatal immunity, in the context of transplacental transfer of flavivirus antibodies will be a valuable area of investigation to define serological mediators of risk or protection for infants. Given the uncertain benefits or risks of efficient transfer of flavivirus IgG, ZIKV and DENV vaccine strategies will need to carefully consider the timing and type of vaccination and boosting in order to maintain protective levels of antibodies in women of reproductive age and infants.

Supporting information

S1 Fig. Study design flow chart indicating that 26 symptomatic pregnant women were eligible and enrolled into prospective cohort, and only 20 mother-infant pairs were analyzed due to paired sample availability. The 20 pairs were classified into two groups based on ZIKV exposure status during pregnancy. Accordingly, 8 mothers were determined to be infected with ZIKV during pregnancy and 12 were not. Laboratory tests were conducted on all available mother and infant samples without further stratification. (TIF)

S2 Fig. Lack of associations between magnitude of maternal flavivirus-specific IgG and percent IgG transfer. A post-hoc Spearman correlation analysis was conducted to assess whether higher magnitude of maternal flavivirus IgG due to recency of infection during pregnancy could be driving efficient transplacental IgG transfer. No strong positive associations were noted, suggesting that magnitude of maternal IgG alone does not predict percent transfer

for each antigen shown (Unadjusted p-values > 0.05 for ZIKV, DENV1, DENV2, DENV4 and < 0.038 for DENV3).
(TIF)

S1 Table. Clinical results of prenatal screening for TORCH infections. These data from maternal serum samples from pregnancy indicate no recent *Toxoplasma* infections and high seropositivity to rubella virus as tested by chemiluminescent microparticle immunoassays. Also, there was no evidence for syphilis, which was assessed by the VDRL test. Infant cord-blood qPCR testing for CMV indicates one potential case of congenital CMV transmission in the ZIKV-uninfected group. Proportion of mothers or infants with positive test results are reported as the numerator, whereas the denominator is the number of the total samples tested.
(DOCX)

S2 Table. Timeline of infection for each enrolled mother in this study.
(DOCX)

S3 Table. Transplacental transfer efficiency. Median and range shown for mothers and infants by each flavivirus binding, vaccine antigen binding or flavivirus neutralizing response measured. Subjects are grouped by maternal ZIKV infection status to facilitate comparison of the magnitudes of antibody responses and calculated IgG percent transfer. Infant antibody response as a portion of maternal response are indicated in the percent transfer column, where median, range and number of mother-infant pairs per group are shown. Bonferroni adjusted p-values shown from Wilcoxon Signed Rank Tests to assess significant differences in the mother to infant percent transfer of antibodies in the ZIKV-infected versus uninfected groups. No significant differences in the percent transfer of flavivirus binding antibody responses between mother and infant were observed regardless of ZIKV serostatus. NP indicates that a p-value is not shown since this study is not powered to detect significant differences between mothers and infants for those antigens.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Dr. Aravinda de Silva's laboratory for training on the ZIKV and DENV virus capture ELISA, and Dr. Premkumar Lakshmanane for developing and contributing antigen proteins for this study. We thank the onsite team in Brazil, including Juliana Carnielli, Solange Alves Vinhas and Keyla Fonseca, who provided technical support, and to the maternity ward of Cassiano Antonio de Moraes Hospital staff for supporting the participants' deliveries. The Duke Human Vaccine Institute's statistics team has been instrumental in implementing our analysis plan. Most importantly, we thank the participants of our study who made efforts to provide samples for research during pregnancy and illness.

Author Contributions

Conceptualization: Tulika Singh, Cesar A. Lopez, Ralph G. Corey, Geeta K. Swamy, Helen M. Lazear, Sallie R. Permar.

Data curation: Tulika Singh, Cesar A. Lopez, Camila Giuberti, Maria L. Dennis, Reynaldo Dietze, Sallie R. Permar.

Formal analysis: Tulika Singh, Paulo R. Merçon de Vargas, Allison Hall.

Funding acquisition: Tulika Singh, Camila Giuberti, Geeta K. Swamy, Reynaldo Dietze, Helen M. Lazear, Sallie R. Permar.

Investigation: Tulika Singh, Cesar A. Lopez, Camila Giuberti, Maria L. Dennis, Hannah L. Itell, Helen S. Webster, Hunter K. Roark, Paulo R. Merçon de Vargas, Helen M. Lazear, Sallie R. Permar.

Methodology: Tulika Singh, Cesar A. Lopez, Camila Giuberti, Hannah L. Itell, Holly J. Heimsath, Helen M. Lazear, Sallie R. Permar.

Project administration: Tulika Singh, Camila Giuberti, Maria L. Dennis, Holly J. Heimsath, Sallie R. Permar.

Resources: Holly J. Heimsath, Reynaldo Dietze, Helen M. Lazear, Sallie R. Permar.

Supervision: Holly J. Heimsath, Geeta K. Swamy, Helen M. Lazear, Sallie R. Permar.

Validation: Tulika Singh, Cesar A. Lopez.

Visualization: Tulika Singh, Cesar A. Lopez, Allison Hall.

Writing – original draft: Tulika Singh, Cesar A. Lopez, Camila Giuberti.

Writing – review & editing: Tulika Singh, Cesar A. Lopez, Camila Giuberti, Hannah L. Itell, Allison Hall, Geeta K. Swamy, Reynaldo Dietze, Helen M. Lazear, Sallie R. Permar.

References

1. 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*. 2016; 375: 2321–2334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412> PMID: 26943629
2. Lazear HM, Diamond MS. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *J Virol*. 2016; 90: 4864–4875. <https://doi.org/10.1128/JVI.00252-16> PMID: 26962217
3. Pierson TC, Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*. 2018; 560: 573–581. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y> PMID: 30158602
4. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus—reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14: 707–715. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.125> PMID: 27573577
5. Rice ME, Galang RR, Roth NM, Ellington SR, Moore CA, Valencia-Prado M, et al. Vital Signs: Zika-Associated Birth Defects and Neurodevelopmental Abnormalities Possibly Associated with Congenital Zika Virus Infection—U.S. Territories and Freely Associated States, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018; 67: 858–867. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6731e1> PMID: 30091967
6. Hoen B, Schaub B, Funk AL, Ardillon V, Boullard M, Cabié A, et al. Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *N Engl J Med*. 2018; 378: 985–994. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709481> PMID: 29539287
7. Fouda GG, Martinez DR, Swamy GK, Permar SR. The Impact of IgG transplacental transfer on early life immunity. *ImmunoHorizons*. 2018; 2: 14–25. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700057> PMID: 29457151
8. Khan AA, Zahidie A, Rabhani F. Interventions to reduce neonatal mortality from neonatal tetanus in low and middle income countries—a systematic review. *BMC Public Health*. 2013; 13: 322. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-322> PMID: 23570611
9. Benowitz I, Esposito DB, Gracey KD, Shapiro ED, Vázquez M. Influenza vaccine given to pregnant women reduces hospitalization due to influenza in their infants. *Clin Infect Dis*. 2010; 51: 1355–61. <https://doi.org/10.1086/657309> PMID: 21058908
10. Tapia MD, Sow SO, Tamboura B, Tégueté I, Pasetti MF, Kodio M, et al. Maternal immunisation with trivalent inactivated influenza vaccine for prevention of influenza in infants in Mali: a prospective, active-controlled, observer-blind, randomised phase 4 trial. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16: 1026–1035. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30054-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30054-8) PMID: 27261067
11. Nunes MC, Cutland CL, Jones S, Hugo A, Madimabe R, Simões EAF, et al. Duration of Infant Protection Against Influenza Illness Conferred by Maternal Immunization: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr*. 2016; 170: 840–7. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2016.0921> PMID: 27380464
12. Centers for Disease Control and Prevention. Recommended Adult Immunization Schedule for ages 19 years or older. 2019. www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual

13. Recomendações da Sociedade Brasileira de Imunizações. Calendário de vacinação SBIm gestante. 2019. <https://sbim.org.br/images/calendarios/calend-sbim-gestante.pdf>
14. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett ADT, Smith DJ, et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol*. 2011; 92: 2821–2829. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031641-0> PMID: 21900425
15. Murphy BR, Whitehead SS. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 587–619. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101315> PMID: 21219187
16. Vratskikh O, Stiasny K, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Karrer U, et al. Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003458. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003458> PMID: 23818856
17. Abbink P, Stephenson KE, Barouch DH. Zika virus vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16: 594–600. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0039-7> PMID: 29921914
18. Zimmerman MG, Quicke KM, O'Neal JT, Arora N, Machiah D, Priyamvada L, et al. Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies Augment Zika Virus Infection of Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe*. 2018; 24: 731–742.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.008> PMID: 30439342
19. Castanha PMS, Braga C, Cordeiro MT, Souza AI, Silva CD, Martelli CMT, et al. Placental Transfer of Dengue Virus (DENV)-Specific Antibodies and Kinetics of DENV Infection—Enhancing Activity in Brazilian Infants. *J Infect Dis*. 2016; 214: 265–272. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw143> PMID: 27056951
20. Halstead SB, Lan NT, Myint TT, Shwe TN, Nisalak A, Kalyanarooj S, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8: 1474–9. <https://doi.org/10.3201/eid0812.020170> PMID: 12498666
21. Costa-Carvalho BT, Viera HM, Dimantas RB, Arslanian C, Naspitz CK, Solé D, et al. Transfer of IgG subclasses across placenta in term and preterm newborns. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol*. 1996; 29: 201–4. PMID: 8731349
22. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016; 353: 823–6. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505> PMID: 27417494
23. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113: 7852–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607931113> PMID: 27354515
24. Premkumar L, Collins M, Graham S, Liou G-JA, Lopez CA, Jadi R, et al. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. *J Clin Microbiol*. 2018; 56. <https://doi.org/10.1128/JCM.01504-17> PMID: 29263206
25. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* (80-). 2017; 358: 929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836> PMID: 29097492
26. Halstead SB. Biologic Evidence Required for Zika Disease Enhancement by Dengue Antibodies. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 569–573. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161879> PMID: 28322690
27. George J, Valiant WG, Mattapallil MJ, Walker M, Huang Y-JS, Vanlandingham DL, et al. Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. *Sci Rep*. 2017; 7: 10498. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10901-1> PMID: 28874759
28. Montoya M, Collins M, Dejnirattisai W, Katzelnick LC, Puerta-Guardo H, Jadi R, et al. Longitudinal Analysis of Antibody Cross-neutralization Following Zika Virus and Dengue Virus Infection in Asia and the Americas. *J Infect Dis*. 2018; 218: 536–545. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy164> PMID: 29618091
29. Collins MH, McGowan E, Jadi R, Young E, Lopez CA, Baric RS, et al. Lack of Durable Cross-Neutralizing Antibodies Against Zika Virus from Dengue Virus Infection. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 773–781. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161630> PMID: 28418292
30. Hammond SN, Balmaseda A, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 73: 1063–70. PMID: 16354813
31. Simmons CP, Chau TNB, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Thien NT, et al. Maternal Antibody and Viral Factors in the Pathogenesis of Dengue Virus in Infants. *J Infect Dis*. 2007; 196: 416–424. <https://doi.org/10.1086/519170> PMID: 17597456
32. Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L. Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2006; 168: 1210–26. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050482> PMID: 16565496

33. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 715–725. <https://doi.org/10.1038/nri2155> PMID: 17703228
34. Hermanns K, Göhner C, Köpp A, Schmidt A, Merz WM, Markert UR, et al. Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7: 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0002-0>
35. Gordon A, Gresh L, Ojeda S, Katzelnick LC, Sanchez N, Mercado JC, et al. Prior dengue virus infection and risk of Zika: A pediatric cohort in Nicaragua. *PLOS Med*. 2019; 16: e1002726. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002726> PMID: 30668565
36. Rodriguez-Barraquer I, Costa F, Nascimento EJM, Nery N, Castanha PMS, Sacramento GA, et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science*. 2019; 363: 607–610. <https://doi.org/10.1126/science.aav6618> PMID: 30733412
37. Kohler PF, Farr RS. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature*. 1966; 210: 1070–1. PMID: 5950290
38. Avanzini MA, Pignatti P, Chirico G, Gasparoni A, Jalil F, Hanson LA. Placental transfer favours high avidity IgG antibodies. *Acta Paediatr*. 1998; 87: 180–5. PMID: 9512205
39. Garty BZ, Ludomirsky A, Danon YL, Peter JB, Douglas SD. Placental transfer of immunoglobulin G subclasses. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994; 1: 667–9. PMID: 8556518
40. de Moraes-Pinto MI, Verhoeff F, Chimsuku L, Milligan PJ, Wesumperuma L, Broadhead RL, et al. Placental antibody transfer: influence of maternal HIV infection and placental malaria. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998; 79: F202–5. <https://doi.org/10.1136/fn.79.3.f202> PMID: 10194992
41. Dechavanne C, Cottrell G, Garcia A, Migot-Nabias F. Placental Malaria: Decreased Transfer of Maternal Antibodies Directed to Plasmodium falciparum and Impact on the Incidence of Febrile Infections in Infants. *PLoS One*. 2015; 10: e0145464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145464> PMID: 26698578
42. Okoko BJ, Wesumperuma LH, Ota MOC, Pinder M, Banya W, Gomez SF, et al. The Influence of Placental Malaria Infection and Maternal Hypergammaglobulinemia on Transplacental Transfer of Antibodies and IgG Subclasses in a Rural West African Population. *J Infect Dis*. 2001; 184: 627–632. <https://doi.org/10.1086/322808> PMID: 11494168
43. Chaikitgosiyakul S, Rijken MJ, Muehlenbachs A, Lee SJ, Chairsi U, Viriyavejakul P, et al. A morphometric and histological study of placental malaria shows significant changes to villous architecture in both Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infection. *Malar J*. 2014; 13: 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-4> PMID: 24386908
44. Moro L, Bardaji A, Nhampossa T, Mandomando I, Serra-Casas E, Sigauque B, et al. Malaria and HIV Infection in Mozambican Pregnant Women Are Associated With Reduced Transfer of Antimalarial Antibodies to Their Newborns. *J Infect Dis*. 2015; 211: 1004–1014. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu547> PMID: 25271267
45. Szaba FM, Tighe M, Kummer LW, Lanzer KG, Ward JM, Lanthier P, et al. Zika virus infection in immunocompetent pregnant mice causes fetal damage and placental pathology in the absence of fetal infection. *PLoS Pathog*. 2018; 14: e1006994. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006994> PMID: 29634758
46. Yockey LJ, Jurado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, Milano KM, et al. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol*. 2018; 3: eaao1680. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aao1680> PMID: 29305462
47. Rosenberg AZ, Yu W, Hill DA, Reyes CA, Schwartz DA. Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. *Arch Pathol Lab Med*. 2017; 141: 43–48. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0401-OA> PMID: 27681334
48. Bhatnagar J, Rabeneck DB, Martines RB, Reagan-Steiner S, Ermias Y, Estetter LBC, et al. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 405–414. <https://doi.org/10.3201/eid2303.161499> PMID: 27959260
49. Friedman EE, Dallah F, Harville EW, Myers L, Buekens P, Breart G, et al. Symptomatic Dengue infection during pregnancy and infant outcomes: a retrospective cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e3226. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003226> PMID: 25299383
50. Ribeiro CF, Lopes VGS, Brasil P, Pires ARC, Rohloff R, Nogueira RMR. Dengue infection in pregnancy and its impact on the placenta. *Int J Infect Dis*. 2017; 55: 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.002> PMID: 28088588
51. Paixao ES, Harron K, Campbell O, Teixeira MG, Costa M da CN, Barreto ML, et al. Dengue in pregnancy and maternal mortality: a cohort analysis using routine data. *Sci Rep*. 2018; 8: 9938. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28387-w> PMID: 29967399

52. Tan PC, Soe MZ, Si Lay K, Wang SM, Sekaran SD, Omar SZ. Dengue Infection and Miscarriage: A Prospective Case Control Study. *Guzman MG, editor. PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6: e1637. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001637> PMID: 22590658
53. Chitra TV, Panicker S. Maternal and fetal outcome of dengue fever in pregnancy. *J Vector Borne Dis.* 2011; 48: 210–3. PMID: 22297282
54. Perret C, Chanthavanich P, Pengsaa K, Limkittikul K, Hutajaroen P, Bunn JEG, et al. Dengue infection during pregnancy and transplacental antibody transfer in Thai mothers. *J Infect.* 2005; 51: 287–93. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.10.003> PMID: 16291281
55. Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, Kuivainen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med.* 2016; 374: 2142–2151. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601824> PMID: 27028667
56. 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.* 2016; 128: 724–730. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001625> PMID: 27479770
57. Suy A, Sulleiro E, Rodó C, Vázquez É, Bocanegra C, Molina I, et al. Prolonged Zika Virus Viremia during Pregnancy. *N Engl J Med.* 2016; 375: 2611–2613. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1607580> PMID: 27959695
58. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Sharp TM. Persistence of Zika Virus in Body Fluids—Final Report. *N Engl J Med.* 2019; 380: 198–199. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1814416>
59. Abu-Raya B, Smolen KK, Willems F, Kollmann TR, Marchant A. Transfer of Maternal Antimicrobial Immunity to HIV-Exposed Uninfected Newborns. *Front Immunol.* 2016; 7: 338. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00338> PMID: 27630640
60. Martinez DR, Fong Y, Li SH, Yang F, Jennewein MF, Weiner JA, et al. Fc Characteristics Mediate Selective Placental Transfer of IgG in HIV-Infected Women. *Cell.* 2019;178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.046> PMID: 31204101
61. Castanha PMS, Souza W V., Braga C, Araújo TVB de, Ximenes RAA, Albuquerque M de FPM, et al. Perinatal analyses of Zika- and dengue virus-specific neutralizing antibodies: A microcephaly case-control study in an area of high dengue endemicity in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13: e0007246. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007246> PMID: 30856223
62. Conheça cidades e estados do Brasil; Espírito Santo. [cited 20 Aug 2007]. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es>
63. Brazilian Ministry of Health Database—DATASUS [Internet]. Available: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>
64. Secretaria de estado da saúde. Boletim Epidemiológico nº. 1–2016. Dengue, Chikungunya e Zika—Semana 13–2016 [Internet]. 2016. Available: https://mosquito.saude.es.gov.br/Media/dengue/BoletimEpidemiologico/BoletimEpidDengue_01_2016_Final.pdf
65. Secretaria de Estado da Saúde divulga número de casos de Zika. 2015. <http://www.saude.es.gov.br/default.asp>
66. Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos D dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110: 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192> PMID: 26061233
67. Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screation GR. The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol.* 2018; 19: 1189–1198. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3> PMID: 30333606
68. World Health Organization. Screening, assessment and management of neonates and infants with complications associated with Zika virus exposure in utero. World Health Organization; 2017; <https://www.who.int/csr/resources/publications/zika/assessment-infants/en/>
69. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet.* 2014; 384: 857–68. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60932-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60932-6)
70. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287> PMID: 18680646
71. Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1823–6. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10790107> PMID: 10790107
72. Mayhew TM. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta.* 2008; 29: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.05.010> PMID: 17658596

73. Redline RW. Villitis of unknown etiology: noninfectious chronic villitis in the placenta. *Hum Pathol.* 2007; 38: 1439–46. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.05.025> PMID: 17889674
74. Knox WF, Fox H. Villitis of unknown aetiology: its incidence and significance in placentae from a British population. *Placenta.* 5: 395–402. PMID: 6522353
75. Oliphant T, Nybakken GE, Engle M, Xu Q, Nelson CA, Sukupolvi-Petty S, et al. Antibody Recognition and Neutralization Determinants on Domains I and II of West Nile Virus Envelope Protein. *J Virol.* 2006; 80: 12149–12159. <https://doi.org/10.1128/JVI.01732-06> PMID: 17035317
76. Itell HL, McGuire EP, Muresan P, Cunningham CK, McFarland EJ, Borkowsky W, et al. Development and application of a multiplex assay for the simultaneous measurement of antibody responses elicited by common childhood vaccines. *Vaccine.* 2018; <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.048> PMID: 30087048
77. Oduyebo T, Polen KD, Walke HT, Reagan-Steiner S, Lathrop E, Rabe IB, et al. Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Pregnant Women with Possible Zika Virus Exposure—United States (Including U.S. Territories), July 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017; 66: 781–793. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6629e1> PMID: 28749921
78. Wahala WMPB, de Silva AM. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses.* 2011; 3: 2374–2395. <https://doi.org/10.3390/v3122374> PMID: 22355444
79. World Health Organization. Child Growth Standards. 2018 [cited 19 Jun 2019]. <http://www.who.int/childgrowth/en/>
80. Tambllyn JA, Lissauer DM, Powell R, Cox P, Kilby MD. The immunological basis of villitis of unknown etiology—review. *Placenta.* 2013; 34: 846–55. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.07.002> PMID: 23891153
81. Oliveira DBL, Almeida FJ, Durigon EL, Mendes ÉA, Braconi CT, Marchetti I, et al. Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection. *N Engl J Med.* 2016; 375: 1202–1204. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1607583> PMID: 27653589
82. Nguyen SM, Antony KM, Dudley DM, Kohn S, Simmons HA, Wolfe B, et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. *PLOS Pathog.* 2017; 13: e1006378. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006378> PMID: 28542585
83. Magnani DM, Rogers TF, Maness NJ, Grubaugh ND, Beutler N, Bailey VK, et al. Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. *Nat Commun.* 2018; 9: 1624. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04056-4> PMID: 29691387
84. World Health Organization. Biologicals, Vaccine Standardization. 2019 [cited 19 Jun 2019]. <http://www.who.int/biologicals/vaccines/en/>
85. Wilcox CR, Holder B, Jones CE. Factors Affecting the FcRn-Mediated Transplacental Transfer of Antibodies and Implications for Vaccination in Pregnancy. *Front Immunol.* 2017; 8: 1294. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01294> PMID: 29163461
86. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 985646. <https://doi.org/10.1155/2012/985646> PMID: 22235228
87. Pou C, Nkulikiyimfura D, Henckel E, Olin A, Lakshmikanth T, Mikes J, et al. The repertoire of maternal anti-viral antibodies in human newborns. *Nat Med.* 2019; 25: 591–596. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0392-8> PMID: 30886409
88. Russell P. Inflammatory lesions of the human placenta. III. The histopathology of villitis of unknown aetiology. *Placenta.* 1: 227–44. PMID: 7443642
89. Larocca RA, Abbink P, Peron JPS, de A. Zanotto PM, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature.* 2016; 536: 474–478. <https://doi.org/10.1038/nature18952> PMID: 27355570
90. Dowd KA, Ko S-Y, Morabito KM, Yang ES, Pelc RS, DeMaso CR, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science.* 2016; 354: 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.aai9137> PMID: 27708058
91. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 1055–65. <https://doi.org/10.1128/CVI.00131-10> PMID: 20463105
92. Hombach J, Solomon T, Kurane I, Jacobson J, Wood D. Report on a WHO consultation on immunological endpoints for evaluation of new Japanese encephalitis vaccines, WHO, Geneva, 2–3 September, 2004. *Vaccine.* 2005; 23: 5205–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.002> PMID: 16055233
93. Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK. Yellow fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded doses of 17D vaccine. *Appl Microbiol.* 1973; 25: 539–44. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4633476> PMID: 4633476

94. Kreil TR, Burger I, Bachmann M, Fraiss S, Eibl MM. Antibodies protect mice against challenge with tick-borne encephalitis virus (TBEV)-infected macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1997; 110: 358–61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1997.4311446.x> PMID: 9409636
95. Rathore APS, Saron WAA, Lim T, Jahan N, St John AL. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus-induced microcephaly in fetuses. *Sci Adv*. 2019; 5: eaav3208. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav3208> PMID: 30820456
96. Omer SB. Maternal Immunization. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2017; 376: 1256–1267. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1509044> PMID: 28355514
97. Chau TNB, Quyen NTH, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NTP, et al. Dengue in Vietnamese infants—results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2008; 198: 516–24. <https://doi.org/10.1086/590117> PMID: 18598189
98. Valiant WG, Huang Y-JS, Vanlandingham DL, Higgs S, Lewis MG, Mattapallil JJ. Zika convalescent macaques display delayed induction of anamnestic cross-neutralizing antibody responses after dengue infection. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7: 130. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0132-z> PMID: 30006514
99. Fowler AM, Tang WW, Young MP, Mamidi A, Viramontes KM, McCauley MD, et al. Maternally Acquired Zika Antibodies Enhance Dengue Disease Severity in Mice. *Cell Host Microbe*. 2018; 24: 743–750.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.09.015> PMID: 30439343
100. Paixao ES, Leong W-Y, Rodrigues LC, Wilder-Smith A. Asymptomatic Prenatal Zika Virus Infection and Congenital Zika Syndrome. *Open Forum Infect Dis*. 2018; 5: ofy073. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy073> PMID: 29732381
101. 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*. 2009; 360: 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715> PMID: 19516034
102. Mitchell PK, Mier-Y-Teran-Romero L, Biggerstaff BJ, Delorey MJ, Aubry M, Cao-Lormeau V-M, et al. Reassessing Serosurvey-Based Estimates of the Symptomatic Proportion of Zika Virus Infections. *Am J Epidemiol*. 2019; 188: 206–213. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy189> PMID: 30165474

CAPÍTULO II: Persistência de vírus Zika infectante em leite materno após infecção ocorrida na gestação

CAPÍTULO II: PERSISTÊNCIA DE VÍRUS ZIKA INFECTANTE EM LEITE MATERNO APÓS INFECÇÃO OCORRIDA NA GESTAÇÃO

Sabe-se o ZIKV pode persistir no organismo e ser excretado por longo período em diversos fluidos corporais, como urina, saliva, lágrima, sêmen e secreções vaginais. Além disso, foi reconhecida a ocorrência de transmissão materno-fetal do ZIKV durante a infecção na gestação e também a possibilidade de uma viremia mais prolongada nesses casos. Tal fato levanta questões a respeito do tropismo viral e da transmissão não dependente do vetor, o mosquito *Aedes*. Embora nos últimos anos tenha havido muito progresso no conhecimento da infecção pelo ZIKV, ainda há falta de informações sólidas sobre a infecção pelo ZIKV na gestação, a persistência do vírus no organismo materno, e a transmissão materno-fetal, incluindo o potencial de transmissão no momento peri e pós-natal. Tal conhecimento é crucial para a implementação de medidas de prevenção de transmissão robustas, e no desenvolvimento de vacinas e antivirais eficazes, com vistas a redução do impacto dessa doença. Nessa parte o estudo objetivamos investigar a persistência do ZIKV em diferentes amostras biológicas maternas no momento do parto, após uma infecção pelo ZIKV ocorrida durante a gestação. Os resultados gerados desta parte do trabalho estão em submissão para a publicação em uma revista científica e podem ser visualizados a seguir.

Persistência de vírus Zika infectante em leite materno após infecção ocorrida na gestação.

INTRODUÇÃO

Após a epidemia ocorrida no Brasil em 2015-16, a infecção pelo vírus Zika (ZIKV) em gestantes foi associada a um espectro de danos neurológicos ao feto, causando um alerta de saúde global.¹ Desde então, uma atenção especial tem sido dada ao estudo da infecção pelo ZIKV na gestação, do tropismo e persistência viral, bem como da resposta imune protetora materna. Compreender em quais compartimentos biológicos maternos, e por quanto tempo, o ZIKV persiste é crucial para caracterizar as rotas de transmissão vertical, orientar o desenvolvimento de vacinas e terapias eficazes, e estabelecer medidas de saúde pública afim de reduzir o impacto dessa doença.

OBJETIVO

Avaliar as amostras do parto e do pós-parto, quanto a presença de ZIKV, em mulheres que apresentaram infecção por ZIKV durante a gestação, e seus filhos.

MATERIAIS E MÉTODO

Neste estudo foram incluídas 8 gestantes, a partir de uma coorte prospectiva, observacional, de mulheres que apresentaram sintomas da infecção pelo ZIKV durante a gestação, entre dezembro de 2015 a janeiro de 2018, na região metropolitana de Vitória, sudeste do Brasil. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Cassiano Antonio de Moraes e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE: 52841716.0.0000.5071) e o consentimento

foi obtido de todas as participantes. A infecção por ZIKV foi confirmada nos primeiros 4 dias após o início dos sintomas, por detecção do RNA viral no soro e/ou urina, utilizando RT-PCR em tempo real.² Placenta, líquido amniótico, soro, urina e leite materno foram coletados no momento do parto e/ou pós-parto. A presença de ZIKV foi testada por RT-PCR em tempo real e a positividade foi definida pela amplificação do genoma do ZIKV em até 38 ciclos (Cycle threshold ≤ 38), utilizando conjunto de *primers* e sondas previamente descritos.² Amostras de saliva e urina das crianças nascidas foram coletadas nos primeiros dias após o nascimento e testadas pelo mesmo método de RT-PCR em tempo real.²

As amostras com resultado positivo para o RNA do ZIKV foram inoculadas em culturas de células Vero 76 (ATCC® CRL-1587™) para avaliar a existência de partículas virais infectantes. Resumidamente, as amostras foram diluídas (1:5 v/v) em meio Essencial Mínimo de Eagle (EMEM, Quality Biological) contendo 2% de soro fetal bovino (FBS, GIBCO) e 1% de solução Antibiótico-Antimicótico 100x (Sigma). Após 24 horas de incubação a 4°C, 100 μ L dessa mistura foram inoculados, em duplicata, em monocamada de células Vero 90% confluentes. As placas foram incubadas a 37°C, em 5% de CO₂. 72 horas após a inoculação, o meio foi substituído por meio fresco, sem FBS, e as culturas foram novamente incubadas. Após 96 horas (7 dias após a inoculação da amostra), foi realizada uma passagem, inoculando 100 μ L do sobrenadante das culturas em uma nova cultura de células Vero 90% confluentes. Cinco dias depois, a infecção e a replicação viral nas culturas foi avaliada através da observação de efeito citopático (CPE), confirmada pela presença do RNA do ZIKV no sobrenadante da cultura, detectado por RT-PCR.²

RESULTADOS

Durante a gestação, as 8 mulheres apresentaram infecções sintomáticas por ZIKV, com resolução dos sintomas em 15 dias (mediana: 7 dias). As infecções ocorreram no primeiro (2/8, 25%), segundo (4/8, 50%) e terceiro (2/8, 25%) trimestre de gestação (Tabela 1). No momento do parto todas as mulheres já se apresentavam assintomáticas. O soro, a urina e o líquido amniótico, coletados no momento do parto, foram negativos para a presença de ZIKV. Foi possível obter amostra de placenta de 6 das 8 participantes (#1, #3, #5, #6, #7, e #8) e todas essas foram negativas para a detecção da presença do ZIKV. Diferentemente, o ZIKV foi detectado em amostras de leite materno de 3 (#6, #7 e #8) das 8 mães, aos 114, 90 e 20 dias após o início dos sintomas, respectivamente (Tabela 2). Efeito citopático foi observado em todas as culturas de células inoculadas com amostras de leite materno positivas no RT-PCR (#6, #7 e #8), sugerindo a presença de partículas virais infectantes. Embora menos proeminente, também foi observado efeito citopático no controle negativo (amostra de leite materno de uma mulher assintomática, negativa para infecção por ZIKV em RT-PCR). No entanto, esse sobrenadante de cultura se apresentou negativo na RT-PCR para ZIKV, como esperado, sugerindo que o efeito citopático observado nos controles negativos seria devido a um dano à camada celular causado pelos componentes deste espécime. As amostras de leite materno que apresentaram RNA do ZIKV (#6, #7 e #8), foram positivas após inoculação em cultura de células, com presença de CPE e detecção de ZIKV no sobrenadante (Tabela 2), indicando que o vírus presente no leite materno era infeccioso e replicou em cultura de células. As amostras de leite materno coletadas posteriormente, em visita de seguimento dessas três mães (#6, #7 e #8), respectivamente aos 85, 237 e 112 dias (2,8, 7,9 e 3,7 meses) após o parto, não se encontravam mais positivas para o RNA do ZIKV.

Todas as 8 crianças nasceram a termo e clinicamente saudáveis, no entanto, a criança #2 apresentou microcefalia congênita (Tabela 3). Avaliamos as evidências de infecção ativa pelo ZIKV no recém-nascido testando suas amostras de saliva e urina, coletadas alguns dias após o nascimento. Nesse momento, nenhum dos 8 recém-nascidos apresentou ZIKV detectável em urina ou saliva (Tabela 3). Amostras de sangue das crianças não foram coletadas devido à recusa materna, sendo uma limitação deste estudo.³ Todas as crianças foram amamentadas até pelo menos seis meses de idade, de acordo com a recomendação para alimentação infantil em áreas de transmissão do vírus Zika, da Organização Mundial da Saúde (OMS).⁴ Nenhuma criança apresentou qualquer sinal clínico de infecção pós-natal pelo ZIKV, como exantema ou febre, nos primeiros 3 meses após o nascimento, incluindo aqueles que foram amamentados por mães que apresentaram ZIKV infectante no leite materno (Tabela 3). Na avaliação de acompanhamento, após 3 meses do nascimento (mediana 2,9 [2,4 - 4,8] meses), todas as crianças apresentaram perímetro cefálico normal para idade e sexo, com base nos Padrões de Crescimento Infantil da OMS, exceto aquele com microcefalia congênita (Tabela 3).⁵

DISCUSSÃO

Dentre as amostras maternas do parto testadas, apenas o leite materno foi positivo para ZIKV, o que sugere que a glândula mamária possui uma participação na persistência e replicação viral durante a infecção pelo ZIKV. Neste estudo, mostramos que 3 (37,5%) das 8 mães com infecção pelo ZIKV durante a gestação apresentavam ZIKV infectante no leite materno, expressado entre 1 e 14 dias após o parto, e em até quase 4 meses após a infecção sintomática ocorrida na gestação. Aqui, consistente com outros estudos, demonstramos que a presença de ZIKV no leite materno do

periparto parece mais frequente quando a infecção ocorreu após o segundo trimestre de gestação, ^{6,7} entretanto, devido ao pequeno número de indivíduos estudados, não foi possível comparar a taxa de detecção de ZIKV no leite materno entre os trimestres em que ocorreu a infecção. A persistência de vírus Zika, após uma infecção ocorrida durante a gestação, foi descrita anteriormente ^{8,9} e pode ser atribuída ao perfil imunológico mais tolerante na gestação, o que pode retardar a eliminação de vírus dos compartimentos corporais maternos.¹⁰ Recentemente, foi demonstrado em animais e em experimentos *in vitro*, que o ZIKV pode se disseminar do sangue para as glândulas mamárias, infectando células epiteliais mamárias de forma produtiva. ¹¹ Nossos achados sobre a persistência de partículas virais infectantes do ZIKV no leite materno, quando o vírus não é detectado em outras amostras biológicas, reforça que as glândulas mamárias podem ser um nicho para a replicação do ZIKV e facilitar a eliminação viral.

A detecção do ZIKV em amostras do momento do parto (como na placenta) oferece a oportunidade de diagnóstico quando os resultados da testagem materna para ZIKV não foram conclusivas, ou quando o teste não pode ser realizado no momento ideal de infecção aguda. ¹² No entanto, considerando a baixa taxa de detecção de ZIKV em tecidos placentários (~ 10%), ¹² e a longa persistência do ZIKV no leite materno observada aqui, também trazemos a possibilidade de utilizar o leite materno do periparto, um espécime acessível, como uma amostra adicional para o diagnóstico materno de ZIKV. Isso pode ser particularmente valioso para aquelas mães que apresentaram sintomas suspeitos de ZIKV a partir do segundo trimestre gestacional.

Além disso, a presença de vírus infectante no leite materno do periparto sugere a amamentação como uma potencial rota de transmissão perinatal, no caso de mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gravidez. De fato, a amamentação pode ser via de transmissão de alguns patógenos, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus linfotrópico de células T humano (HTLV) e o citomegalovírus (CMV),¹³ dependendo da carga viral e da presença e magnitude de anticorpos neutralizantes.^{14,15} De acordo com os dados atualmente disponíveis, e as orientações da OMS, as mães com infecção confirmada pelo ZIKV devem manter a amamentação porque seus benefícios superam o potencial risco de transmissão desse vírus 4.7. Neste estudo, nenhuma das crianças amamentadas apresentou sinais clínicos de infecção por ZIKV após o nascimento, nem microcefalia pós-natal, como sugerido por um relato de caso recente.¹⁶

Conforme estudado nesta coorte anteriormente, as crianças nascidas de mães que apresentaram infecção pelo ZIKV durante a gestação recebem anticorpos IgG neutralizantes da mãe, transferidos passivamente pela placenta.¹⁷ Portanto, apesar da presença de vírus Zika no leite materno, os anticorpos maternos específicos, transferidos por via transplacentária, poderiam limitar o risco de infecção causado pela exposição ao ZIKV presente na amamentação. No entanto, dada a persistência de partículas infectantes no leite materno, não podemos ignorá-lo como uma potencial via de transmissão. Sendo assim, a prática de aleitamento cruzado (na qual uma lactante amamenta a criança de outra mãe) ainda presente no Brasil e em outras partes do mundo, embora não seja recomendada, pode, neste caso, representar um risco de infecção para aquelas crianças que não receberam previamente os anticorpos neutralizantes maternos.^{18,19}

CONCLUSÃO

Este trabalho fornece conhecimento sobre a persistência do ZIKV durante a gestação e chama a atenção para o papel das glândulas mamárias humanas na sustentação da replicação do ZIKV. Encontramos vírus Zika infectante no leite materno do pós-parto de mães que apresentaram a infecção ainda na gestação, entre 20 dias e 4 meses antes do parto, e na ausência de ZIKV detectável em outras amostras biológicas. Embora isso suscite uma preocupação sobre a transmissão da amamentação, não observamos nenhuma evidência que contraste com as recomendações atuais da OMS para a amamentação. Outros estudos são necessários para avaliar e comparar o potencial da transmissão de ZIKV através do leite materno em infecções ocorridas em mulheres não gestantes mas em lactação.

Tabela 1. Características clínicas das 8 gestantes incluídas no estudo.

(#) Mãe	Idade (anos)	Idade gestacional no início dos sintomas. (semana/trimestre)	Sinais e sintomas	Duração do exantema (dias)	Duração dos sintomas (dias)	Idade gestacional no parto (semanas)
1	26	4,4 / 1º	Exantema e prurido	7	7	40,1
2	38	10,4 / 1º	Exantema, prurido, artralgia, conjuntivite, mialgia, edema em mãos.	7	14	37,1
3	22	13,6 / 2º	Exantema	3	3	40,0
4	29	13,9 / 2º	Exantema	3	3	39,1
5	21	13,4 / 2º	Exantema, prurido, artralgia, mialgia, cefaleia, dor retro-orbital, edema em mãos e pés, linfadenopatia.	6	14	37,1
6	19	22,7 / 2º	Exantema, prurido, artralgia, febre, conjuntivite, cefaleia, náusea, edema em mãos, joelhos e rosto.	4	7	38,6
7	20	29,0 / 3º	Exantema, prurido, artralgia, conjuntivite, mialgia, náusea, edema leve em mãos.	3	4	39,9
8	39	36,7 / 3º	Exantema, prurido, artralgia, febre, conjuntivite, cefaleia, mialgia, edema em mãos, joelhos e pés.	6	15	39,6

Tabela 2. Detecção do vírus Zika infectante no leite materno do pós-parto de 8 mulheres que apresentaram infecção por Zika durante a gestação.

Mãe #	Leite materno				
	Coleta da amostra		Resultado do RT-PCR da amostra (Ct)	Inoculação da amostra em cultura de células Vero	
	DPS	DPP		CPE	Resultado do RT-PCR do sobrenadante (Ct)
	1	252	2	Negativo	NR
2	191	4	Negativo	NR	
3	187	1	Negativo	NR	
4	179	2	Negativo	NR	
5	168	2	Negativo	NR	
6	114	3	Positivo (36,4)	Positivo	Positivo (33,8)
7	90	14	Positivo (35,5)	Positivo	Positivo (34,4)
8	20	2	Positivo (32,3)	Positivo	Positivo (33,6)

Ct = Cycle threshold, CPE = Efeito citopático, DPS = Dias pós início dos sintomas,

DPP = Dias pós parto, NR = Não realizado, ZIKV= vírus Zika.

Tabela 3. Avaliação das crianças ao nascimento e em visita de acompanhamento aproximadamente 3 meses após o nascimento.

Criança #	Avaliação ao nascimento						Avaliação em visita de acompanhamento após o nascimento				
	PC	ZIKV RT-PCR						Idade (meses)	RT-PCR do leite materno	Sinais clínicos de infecção por ZIKV desde o nascimento?	PC
		Urina			Saliva						
		RT-PCR do leite materno	Idade na coleta da amostra (dias)	Res.	Idade na coleta da amostra (dias)	Res.					
1	Normal	NEG	15	NEG	1	NEG	LTFU	NEG	LTFU	LTFU	
2	MIC	NEG	4	NEG	4	NEG	2,9	NEG	Não	MIC	
3	Normal	NEG	1	NEG	2	NEG	4,8	NEG	Não	Normal	
4	Normal	NEG	2	NEG	1	NEG	3,1	NEG	Não	Normal	
5	Normal	NEG	2	NEG	1	NEG	2,8	NEG	Não	Normal	
6	Normal	POS	3	NEG	3	NEG	2,6	NEG	Não	Normal	
7	Normal	POS	14	NEG	14	NEG	3,4	NEG	Não	Normal	
8	Normal	POS	2	NEG	2	NEG	2,4	NEG	Não	Normal	

PC = perímetro cefálico, Res.= Resultado, LTFU = Perda de seguimento, MIC = Microcefalia, NEG = Negativo, POS = Positivo, RT-PCR = Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa, ZIKV= vírus Zika.

REFERÊNCIAS

1. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, Horovitz DDG, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJR, Neri JI, Neto JM de P, Wanderley HYC, Cernach M, El-Husny AS, Pone MVS, Seroa CLC, Sanseverino MT V, 2016. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65: 59-62.
2. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR, 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 14: 1232-1239.
3. Villar et al, 2015. International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21(st) Century (INTERGROWTH-21(st)). Postnatal growth standards for preterm infants: The Preterm Postnatal Follow-up Study of the INTERGROWTH-21(st) Project. *Lancet Glob Health* 3: e681-691.
4. World Health Organization, 2016. Guideline: Infant Feeding in Areas of Zika Virus Transmission. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549660>. Accessed October 3, 2020.
5. World Health Organization. Child Growth Standards. Head circumference for age. Available at: https://www.who.int/childgrowth/standards/hc_for_age/en/ . Accessed October 3, 2020.
6. De Quental OB, França EL, Honório-França AC, Morais TC, Daboin BEG, Bezerra IMP, Komninakis S V, De Abreu LC, 2019. Zika Virus Alters the Viscosity and Cytokines Profile in Human Colostrum. *J Immunol Res*. 2019:

9020519.

7. Sampieri CL, Montero H, 2019. Breastfeeding in the time of Zika: a systematic literature review. *PeerJ* 7: e6452.
8. Paz-Bailey G et al, 2017. Persistence of Zika virus in body fluids - Final Report. *N Engl J Med* 379: 1234-1243.
9. Meaney-Delman D et al, 2016. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. *Obstet Gynecol* 128: 724-730.
10. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and infection, 2014. *N Engl J Med* 370: 2211-18.
11. Hubert M, Chiche A, Legros V, Jeannin P, Montange T, Gessain A, Ceccaldi PE, Vidy A, 2019. Productive Infection of Mouse Mammary Glands and Human Mammary Epithelial Cells by Zika Virus. *Viruses* 11: 950.
12. Reagan-Steiner S et al, 2017. U.S. Zika Pregnancy Registry Collaboration; Zika Virus Response Epidemiology and Surveillance Task Force Pathology Team. Evaluation of Placental and Fetal Tissue Specimens for Zika Virus Infection - 50 States and District of Columbia, January-December, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 66: 636-643.
13. Lawrence RM, Lawrence RA, 2004. Breast milk and infection. *Clin Perinatol* 31: 501-28.
14. Rousseau CM, Nduati RW, Richardson BA, Steele MS, John-Stewart GC, Mbori-Ngacha DA, Kreiss JK, Overbaugh J, 2003. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 RNA in breast milk and of its relationship to infant infection and maternal disease. *J Infect Dis* 187: 741-747.
15. Ballard O, Morrow AL, 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 60: 49-74.

16. Siqueira Mello A et al, 2019. Development of Secondary Microcephaly After Delivery: Possible Consequence of Mother-Baby Transmission of Zika Virus in Breast Milk. *Am J Case Rep* 20: 723-725.
17. Singh T et al, 2019. Efficient transplacental IgG transfer in women infected with Zika virus during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e0007648.
18. Reyes-Foster BM, Carter SK, Hinojosa MS, 2015. Milk sharing in practice: a descriptive analysis of peer breastmilk sharing. *Breastfeed Med* 5: 263-269.
19. Seehausen MPV, Oliveira MIC, Boccolini CS, Leal MDC, 2017. Factors associated with cross-nursing in two cities in Southeast Brazil. *Cad Saude Publica* 33: e00038516.

CAPÍTULO III: Avaliação do desenvolvimento neurológico, até os 2 anos e meio de idade, de crianças não-microcefálicas expostas ao Zika no período pré-natal

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO NEUROLÓGICO, ATÉ OS 2 ANOS E MEIO DE IDADE, DE CRIANÇAS NÃO-MICROCEFÁLICAS EXPOSTAS AO ZIKA NO PERÍODO PRÉ-NATAL

Durante a epidemia de ZIKV em 2015 e 2016 ocorrida nas Américas, e após o reconhecimento do risco aumentado de desfechos fetais desfavoráveis relacionados à exposição congênita ao vírus, fomos também desafiados com a necessidade de responder a perguntas em relação ao impacto da infecção congênita pelo ZIKV em crianças que aparentemente não apresentavam qualquer anormalidade ao nascimento. O desenvolvimento neurológico de crianças expostas ao ZIKV durante o período pré-natal, mas com perímetro cefálico normal ao nascimento, seria o mesmo de crianças não-expostas? Sendo assim, nessa parte do estudo, objetivamos obter informações que contribuíssem para o entendimento da infecção congênita pelo ZIKV e seu impacto nos primeiros anos de vida da criança, sobretudo naquelas que não apresentaram microcefalia ou qualquer sinal evidente de Síndrome Congênita do Zika (SCZ) ao nascimento. Os resultados dessa parte do trabalho ainda estão sendo analisados para a confecção do manuscrito final, que será em breve submetido para apreciação de uma revista científica. Uma versão prévia dos resultados, no modelo de manuscrito será apresentada a seguir.

Prevalência de achados radiológicos no encéfalo e avaliação do desenvolvimento cognitivo, até os 2 anos e meio de idade, em crianças não-microcefálicas expostas ao Zika no período pré-natal.

INTRODUÇÃO

Após o relato de aumento de casos de microcefalia congênita em estados do Nordeste do Brasil, em 2015, estudos confirmaram que a exposição ao vírus Zika (ZIKV) durante a gestação estava relacionada à um risco aumentado de desfechos fetais desfavoráveis, como abortos, restrição de crescimento fetal, e um espectro de anormalidades congênitas do sistema nervoso central, incluindo a microcefalia^{1,2}. O ZIKV é um *Flavivirus* que possui tropismo por células neuronais jovens e pode afetar o desenvolvimento do sistema nervoso em formação do feto^{3,4}. Entre as gestações nas quais houve a infecção materna pelo ZIKV, alguns fetos apresentarão alterações neurológicas com microcefalia, outros apresentarão alterações neurológicas, porém com perímetro cefálico normal, e, presuntivamente, outros não serão afetados⁵. Embora a microcefalia tenha sido inicialmente a característica mais evidente da Síndrome Congênita do Zika (SCZ), estudos mais recentes sugerem que a microcefalia pode ser apenas a ponta do iceberg no que diz respeito ao desenvolvimento neurológico e a outros aspectos clínicos.^{6,7} Sabe-se que crianças microcefálicas apresentarão anormalidades cerebrais importantes e, portanto, comprometimento neuropsicomotor grave,^{8,9} no entanto, ainda não está claro, especificamente em relação o neurodesenvolvimento das crianças expostas ao ZIKV no período pré-

natal, que não apresentaram qualquer anormalidade congênitas aparente. Dessa forma, este estudo visa contribuir para a compreensão do espectro da SCZ e do impacto a longo prazo da exposição congênita ao ZIKV em crianças não-microcefálicas ao nascimento.

OBJETIVO

Avaliar a prevalência de achados radiológicos do encéfalo e avaliar o desenvolvimento cognitivo e motor, até os 2 anos e meio ano de vida (30 meses), de crianças expostas ao ZIKV no período pré-natal e não-microcefálicas ao nascimento.

MATERIAIS E MÉTODO

População

A coorte original acompanhada incluía 55 nascidos vivos cujas mães apresentaram sintomas de infecção pelo ZIKV durante a gestação. Essas crianças foram classificadas em dois grupos de acordo com o status materno da confirmação laboratorial da infecção pelo ZIKV, realizada através de RT-PCR e/ou métodos sorológicos (ELISA IgM e teste de detecção de anticorpos neutralizantes específicos). As crianças nascidas de mães com confirmação laboratorial positiva para a infecção pelo ZIKV na gestação, foram chamadas de “grupo exposto” ao ZIKV no período pré-natal, e as crianças nascidas de mães negativas para a infecção pelo ZIKV, foram denominadas “grupo não-exposto” ao ZIKV no período pré-natal. Três crianças da coorte original apresentaram microcefalia ao nascimento e, portanto, não foram consideradas para este do estudo. Sendo assim, para o presente trabalho, um total de 52 crianças foi

estudado: 20 expostas ao ZIKV no período pré-natal e 32 não-expostas, sendo acompanhadas até 2,5 anos (30 meses) de idade. Das 52 crianças não-microcefálicas da coorte original, foi possível obter exames de imagem em 34 e, portanto, estas foram avaliadas em relação à prevalência de achados radiológicos no encéfalo (20 expostas e 14 não-expostas ao ZIKV). A avaliação do desenvolvimento cognitivo até os 2 anos e meio de idade foi realizada em 38 crianças (17 crianças expostas e 21 não-expostas ao ZIKV).

Avaliação do perímetro cefálico e definição de não-microcefalia ao nascimento.

Para avaliação do perímetro cefálico e classificação quanto à microcefalia, utilizou-se a medida em centímetros do perímetro cefálico de cada criança ao nascimento, convertida para os escores-z correspondentes com à idade e sexo, conforme preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O critério para definição de casos de não-microcefalia ao nascimento foi definido como escore-z da circunferência cefálica maior que -2 desvios padrão para a idade e sexo.^{10,11}

Achados radiológicos no encéfalo.

Achados radiológicos anormais foram definidos como qualquer alteração anatômica no encéfalo observado através de exame de ultrassonografia transfontanela (USTF) ou tomografia computadorizada (TC) de crânio. O risco relativo para ocorrência desses achados anormais foi também calculado e a diferença entre os grupos de crianças expostas e não-expostos ao ZIKV foi determinada se $p > 0,05$.

Avaliação do desenvolvimento cognitivo

A avaliação do desenvolvimento cognitivo das crianças foi realizada através das Escalas Capute, executada por um profissional médico treinado¹². Esse método foi desenvolvido pelo neuropediatra Dr. Arnold J. Capute e é utilizado na avaliação da presença de disfunções em duas áreas do desenvolvimento cognitivo: o do funcionamento visual-motor e da linguagem expressiva e receptiva. A bateria de Testes de Marcos de Linguagem e Recepção - CLAMS (*Clinical Linguistic & Auditory Milestone Scale*) - foi originalmente desenvolvida para fornecer aos pediatras uma escala de parâmetros lingüísticos e auditivos que podem ser utilizados facilmente na rotina médica. A bateria de resolução de problemas visual-motora - CAT (*Cognitive Adaptive Test*) - requer observação direta de uma criança realizando testes específicos durante a avaliação. O CAT proporciona aos médicos um meio de distinguir atrasos de linguagem isolados ou distúrbios de comunicação de deficiências cognitivas mais globais.¹² O kit para aplicação das Escalas Capute é composto de instrumentos simples e um formulário para registro.

Para a avaliação dos resultados obtidos na avaliação cognitiva, calculamos a mediana das pontuações obtidas pelas crianças, de acordo com a idade (0-6 meses, 7-12 meses, 13-18 meses, 19-24 meses, 25-30 meses), em cada uma das baterias de testes da Escala Capute (CAT e CLAMS). Atraso no desenvolvimento neurológico foi definido como pontuação menor que 70. As medianas dos grupos de crianças expostas e não-expostas ao ZIKV no período pré-natal foram comparadas utilizando teste não-paramétrico Mann-Whitney. Diferença entre os grupos foi determinada se $p > 0,05$.

RESULTADOS

No geral, a prevalência de anormalidades cerebrais foi de 13,5% (7/34), 30,0% no grupo exposto (6/20; IC 95% [0,1455 - 0,5190]) e 7,1% (1/14; IC 95% [0,0127 - 0,3147]) no grupo não exposto. Os seguintes achados foram observados: cistos no plexo coróide, adelgaçamento do corpo caloso, disgenesia de corpo caloso e colpocefalia (dilatação assimétrica dos ventrículos laterais). A ocorrência de anormalidades neurológicas em exame de imagem foi 5,6 vezes mais provável no grupo de recém-nascidos expostos ao ZIKV do que no grupo de não-expostos. [CI 95% 0,589 – 52,732].

Todas as 38 crianças não-microcefálicas avaliadas apresentaram resultados de desenvolvimento cognitivo considerados normais para a idade, sem atrasos (escores CAT e CLAMS >70), nos primeiros 2 anos e meio de vida. Não houve diferença no desenvolvimento cognitivo entre o grupo de crianças não-microcefálicas expostas e não-expostas ao ZIKV no período pré-natal (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Este estudo adiciona informações importantes para a compreensão do impacto da infecção congênita pelo ZIKV em crianças que não apresentam microcefalia ao nascimento. Aqui, embora não tenhamos encontrado diferença estatística entre a ocorrência de anormalidades cerebrais nas crianças expostas nas não-expostas ao ZIKV, podemos observar uma diferença notável entre os grupos. O pequeno tamanho da amostra analisada (34 participantes) foi uma limitação, o que pode ter influenciado no amplo intervalo de confiança e na não observação

de diferença significativa, considerando $\alpha = 5\%$. No entanto, por se tratar de um estudo exploratório, acreditamos que não devemos ignorar esse achado.

O Protocolo local de assistência à gestante com suspeita de infecção pelo ZIKV ¹³ recomenda a realização de exame de imagem por USTF ou TC para as crianças nascidas de mães com confirmação da infecção na gestação, mesmo na ausência de microcefalia ao nascimento. Na prática observamos que isso falha, visto que apenas (34/52 65,4%) das crianças aqui acompanhadas realizaram esse tipo de exame. Dessa forma, considerando o potencial prejuízo neurológico associado à infecção pelo ZIKV no desenvolvimento do feto, acreditamos que existe a necessidade reforçar a realização desses exames, mesmo quando as crianças não se apresentam microcefálicas ao nascimento. Exames de imagem complementam o acompanhamento neurológico e podem auxiliar a elucidar aspectos clínicos observados ao longo do crescimento dessas crianças e assim direcionar intervenções.

Em relação ao desenvolvimento cognitivo, as crianças não-microcefálicas do grupo exposto ao ZIKV apresentaram desenvolvimento cognitivo normal, sem atrasos para a idade até os dois anos e meio. Nesse caso, o tamanho da amostra, afetado também pelos acompanhamentos perdidos, impactou no poder da análise. Apesar dos esforços da equipe do estudo para manter a adesão dos participantes às visitas, uma vez que as crianças estavam se desenvolvendo normalmente, sem qualquer atraso, muitas mães não compareceram às consultas com seus filhos. Nossos resultados são diferentes de dois estudos brasileiros que avaliaram crianças não-microcefálicas, com exposição pré-natal

ao ZIKV ^{14,15}. Os dois estudos relatam atrasos em pelo menos um domínio (cognitivo, linguagem ou motor), sendo a linguagem o mais afetado. Faiçal e colaboradores relatam uma prevalência de 35% de atraso no desenvolvimento, enquanto Peçanha e colaboradores relatam 50% de crianças com atrasos no desenvolvimento cognitivo. É importante mencionar que nesses dois trabalhos citados foi utilizada outra escala como ferramenta de avaliação de desenvolvimento neurológico (Escala de avaliação infantil Bayley III) ¹⁶. Além disso, nos dois estudos mencionados não foram utilizados grupos controle, com crianças não-expostas ao ZIKV, para a comparação dos desempenhos. Aqui, além de avaliar o desempenho das crianças expostas, comparamos seus resultados com um grupo de crianças não-expostas ao ZIKV, o que reduz o impacto de outras variáveis nos resultados. Semelhante ao nosso estudo, Gerzson e colaboradores (2020) mostraram que crianças não-microcefálicas expostas ao vírus Zika no período pré-natal apresentavam desenvolvimento cognitivo normal quando avaliadas pelas escalas de Bayley. ¹⁷ Esses dados juntos refletem que uma grande proporção de crianças expostas ao ZIKV no período pré-natal, e que não apresentam microcefalia, pode se desenvolver normalmente, mas alguns não. Por isso, uma avaliação mais longa e padronizada ainda é necessária para melhor avaliar e monitorar a ocorrência de qualquer prejuízo no futuro.

CONCLUSÃO

Este estudo adiciona informações relevantes ao entendimento do espectro clínico da infecção congênita pelo ZIKV, sobretudo a respeito de crianças que não apresentam microcefalia ao nascimento. Nosso estudo sugere maior

prevalência de anomalias cerebrais, em exames de imagem ao nascimento, de crianças expostas ao ZIKV no período pré-natal. Isso justifica a realização desses exames e acompanhamento em longo prazo, mesmo quando a criança não apresenta microcefalia, como complementação para um adequado acompanhamento neurológico desses casos. Não observamos atrasos no desenvolvimento cognitivo, até os 2 anos e meio de idade, no entanto, devido à divergência na literatura e aos achados de imagem aqui apresentados, acreditamos que um acompanhamento detalhado e padronizado em longo prazo ainda seja essencial para elucidar adequadamente o espectro do Zika congênito e suas consequências ao longo da vida.

Tabela 1 - Pontuação nas Escalas Capute (CAT e CLAMS) de crianças não-microcefálicas expostas e não-expostas ao ZIKV no período pré-natal.

Intervalo de Idade (meses)	Status de exposição ao ZIKV no período pré-natal (n crianças avaliadas)		Valor de p	Pontuação (mediana)		Valor de p
	exposto	não-exposto		CAT	CLAMS	
0-6	exposto (4)		p = 0,59	109	120	p = 1,00
	não-exposto (17)			100	131	
7-12	exposto (7)		p = 0,07	114	113	p = 0,80
	não-exposto (8)			106	102	
13-18	exposto (4)		p = 0,52	111	111	p = 0,52
	não-exposto (9)			112	112	
19-24	exposto (5)		p = 1,00	100	115	p = 1,00
	não-exposto (7)			105	102	
25-30	exposto (6)		p = 0,56	91	92	p = 1,00
	não-exposto (7)			96	89	

CAT: bateria de Testes Cognitivo-Adaptativo (parâmetro visual-motor); CLAMS: bateria de testes de Marcos de Linguagem e Recepção (parâmetro linguagem-recepção).

REFERÊNCIAS

1. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, Rabello RS, Valderramos SG, Halai U-A, Salles TS, Zin AA, Horovitz D, Daltro P, Boechat M, Raja Gabaglia C, Carvalho de Sequeira P, Pilotto JH, Medialdea-Carrera R, Cotrim da Cunha D, Abreu de Carvalho LM, Pone M, Machado Siqueira A, Calvet GA, Rodrigues Baião AE, Neves ES, Nassar de Carvalho PR, Hasue RH, Marschik PB, Einspieler C, Janzen C, Cherry JD, Bispo de Filippis AM, Nielsen-Saines K. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2321-2334. doi:10.1056/NEJMoa1602412
2. Dudley DM, Van Rompay KK, Coffey LL, Ardeshir A, Keesler RI, Bliss-Moreau E, Grigsby PL, Steinbach RJ, Hirsch AJ, MacAllister RP, Pecoraro HL, Colgin LM, Hodge T, Streblow DN, Tardif S, Patterson JL, Tamhankar M, Seferovic M, Aagaard KM, Martín CSS, Chiu CY, Panganiban AT, Veazey RS, Wang X, Maness NJ, Gilbert MH, Bohm RP, Adams Waldorf KM, Gale M, Rajagopal L, Hotchkiss CE, Mohr EL, Capuano S V., Simmons HA, Mejia A, Friedrich TC, Golos TG, O'Connor DH. Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates. *Nat Med*. 2018;24(8):1104-1107. doi:10.1038/s41591-018-0088-5
3. Garcez P, Loiola E, Madeiro da Costa R, Higa L, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento J, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen S. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *WOS*. Published online 2016. doi:10.7287/peerj.preprints.1817
4. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha

- I, Freitas CL, Brandaõ WN, Rossato C, Andrade DG, Faria DDP, Garcez AT, Buchpigel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PMDA, Peron JPS, Muotri AR, Beltrao-Braga PCBB. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. Published online 2016. doi:10.1038/nature18296
5. Soriano-Arandes A, Rivero-Calle I, Nastouli E, Espiau M, Frick M, Alarcon A, Martínón-Torres F. What we know and what we don't know about perinatal Zika virus infection: A systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;0(0):14787210.2018.1438265. doi:10.1080/14787210.2018.1438265
 6. Saad T, PennaeCosta AA, de Góes FV, de Freitas M, de Almeida JV, de Santa Ignêz LJ, Amancio AP, Alvim RJ, Antunes Kramberger LA. Neurological manifestations of congenital Zika virus infection. *Child's Nerv Syst*. Published online 2018. doi:10.1007/s00381-017-3634-4
 7. Wheeler AC. Development of infants with congenital zika syndrome: What do we know and what can we expect? *Pediatrics*. Published online 2018. doi:10.1542/peds.2017-2038D
 8. Alves L V., Paredes CE, Silva GC, Mello JG, Alves JG. Neurodevelopment of 24 children born in Brazil with congenital Zika syndrome in 2015: A case series study. *BMJ Open*. Published online 2018. doi:10.1136/bmjopen-2017-021304
 9. del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DDG, Pessoa ALS, França GVA, García-Alix A, Doriqui MJR, Wanderley HYC, Sanseverino MVT, Neri JICF, Pina-Neto JM, Santos ES, Verçosa I, Cernach MCSP, Medeiros PFV, Kerbage SC, Silva AA, van der Linden V, Martelli CMT,

- Cordeiro MT, Dhalia R, Vianna FSL, Victora CG, Cavalcanti DP, Schuler-Faccini L. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet Part A*. Published online 2017. doi:10.1002/ajmg.a.38170
10. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, Lambert A, Papageorgiou AT, Carvalho M, Jaffer YA, Gravett MG, Purwar M, Frederick IO, Noble AJ, Pang R, Barros FC, Chumlea C, Bhutta ZA, Kennedy SH, International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (INTERGROWTH-21st). International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet (London, England)*. 2014;384(9946):857-868. doi:10.1016/S0140-6736(14)60932-6
 11. World Health Organization. Child Growth Standards. Head circumference-for-age.
 12. Capute AJ, Accardo PJ. The infant neurodevelopmental assessment: A clinical interpretive manual for CAT-CLAMS in the first two years of life, part 1. *Curr Probl Pediatr*. 1996;26(7):238-257. doi:10.1016/S0045-9380(06)80061-7
 13. ESPÍRITO SANTO. Protocolo de Assistência a Gestantes Com Suspeita de Zika Vírus e Bebês com Microcefalia 2015-2016. *Secr Saúde do Estado Gov do Estado do Espírito St*. Published online 2016:98.
 14. Faiçal AV, De Oliveira JC, Oliveira JVV, De Almeida BL, Agra IA, Alcantara LCJ, Acosta AX, De Siqueira IC. Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus. *BMJ Paediatr Open*. Published online 2019. doi:10.1136/bmjpo-2019-000486

15. Peçanha PM, Gomes Junior SC, Pone SM, Pone MV da S, Vasconcelos Z, Zin A, Vilibor RHH, Costa RP, Meio MDBB, Nielsen-Saines K, Brasil P, Brickley E, Lopes Moreira ME. Neurodevelopment of children exposed intra-uterus by Zika virus: A case series. *PLoS One*. Published online 2020. doi:10.1371/journal.pone.0229434
16. Bayley N. *Bayley Scales of Infant and Toddler Development-Third Edition, Screening Test*. Pearson; 2006.
17. Gerzson LR, de Almeida CS, Silva JH da, Feitosa MMA, de Oliveira LN, Schuler-Faccini L. Neurodevelopment of Nonmicrocephalic Children, After 18 Months of Life, Exposed Prenatally to Zika Virus. *J Child Neurol*. Published online 2020. doi:10.1177/0883073819892128

CAPÍTULO IV: Desenvolvimento de antígenos de proteína do envelope para diferenciar sorologicamente a infecção pelo vírus Zika da infecção pelo vírus Dengue

CAPÍTULO IV: DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS DE PROTEÍNA DO ENVELOPE PARA DIFERENCIAR SOROLOGICAMENTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA DA INFECÇÃO PELO VIRUS DENGUE

Os anticorpos elicitados pelas infecções pelos vírus do gênero *Flavivirus* podem apresentar reações cruzadas em diversos testes diagnósticos, principalmente entre os DENV e ZIKV. Dessa forma, os testes sorológicos para o ZIKV são sensíveis, mas podem frequentemente apresentar reações cruzadas, o que torna pouco útil a sua utilização em cenários onde há circulação simultânea de múltiplos flavivírus, como DENV, ZIKV e FA. Mesmo os Testes de Neutralização, que detectam anticorpos neutralizantes e são mais específicos, possuem limitações e podem ainda não esclarecer o diagnóstico do agente responsável pela infecção recente. Além disso, devido à complexidade de execução, essa metodologia não se encontra disponível na rotina laboratorial. Sendo assim, com o objetivo de auxiliar o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas para o ZIKV, aplicáveis ao nosso cenário, foi criado um banco de amostras clínicas, bem caracterizadas, da nossa coorte durante todo o acompanhamento do estudo. Utilizando essas amostras colaboramos com nossos parceiros da Universidade da Carolina do Norte (UNC) e Duke University, para o desenvolvimento de proteínas antigênicas, com potencial para serem utilizadas em plataformas diagnósticas sorológicas para ZIKV, capazes de discernir entre a infecção pelo ZIKV e DENV, e minimizando assim a ocorrência de reações cruzadas. Esse trabalho detalhado se encontra publicado na revista científica *Journal of Clinical Microbiology* (PREMKUMAR et al., 2018) e pode ser visualizada a seguir.



Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection

Lakshmanane Premkumar,^a Matthew Collins,^a Stephen Graham,^a Guei-Jiun Alice Liou,^a Cesar A. Lopez,^a Ramesh Jadi,^a Angel Balmaseda,^b James A. Brackbill,^c Reynaldo Dietze,^d Erwin Camacho,^e Aruna D. De Silva,^{f,g*} Camila Giuberti,^d Helena Lucia dos Reis,^d Tulika Singh,^h Holly Heimsath,^h Daniela Weiskopf,^g Alessandro Sette,^g Jorge E. Osorio,ⁱ Sallie R. Permar,^h Michel J. Miley,^c Helen M. Lazear,^a Eva Harris,^j Aravinda M. de Silva^a

^aDepartment of Microbiology and Immunology, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina, USA

^bLaboratorio Nacional de Virología, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Ministry of Health, Managua, Nicaragua

^cDepartment of Pharmacology, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina, USA

^dNúcleo de Doenças Infecciosas, Centro de Ciências da Saúde, UFES, Vitoria, Brazil

^eUniversidad de Sucre, Sincelejo, Sucre, Colombia

^fGenetech Research Institute, Colombo, Sri Lanka

^gDivision of Vaccine Discovery, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, California, USA

^hDepartment of Pediatrics and Human Vaccine Institute, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA

ⁱDepartment of Pathobiological Sciences, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA

^jDivision of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley, Berkeley, California, USA

ABSTRACT Zika virus (ZIKV) is an emerging flavivirus that can cause birth defects and neurologic complications. Molecular tests are effective for diagnosing acute ZIKV infection, although the majority of infections produce no symptoms at all or present after the narrow window in which molecular diagnostics are dependable. Serology is a reliable method for detecting infections after the viremic period; however, most serological assays have limited specificity due to cross-reactive antibodies elicited by flavivirus infections. Since ZIKV and dengue virus (DENV) widely cocirculate, distinguishing ZIKV infection from DENV infection is particularly important for diagnosing individual cases or for surveillance to coordinate public health responses. Flaviviruses also elicit type-specific antibodies directed to non-cross-reactive epitopes of the infecting virus; such epitopes are attractive targets for the design of antigens for development of serological tests with greater specificity. Guided by comparative epitope modeling of the ZIKV envelope protein, we designed two recombinant antigens displaying unique antigenic regions on domain I (Z-EDI) and domain III (Z-EDIII) of the ZIKV envelope protein. Both the Z-EDI and Z-EDIII antigens consistently detected ZIKV-specific IgG in ZIKV-immune sera but not cross-reactive IgG in DENV-immune sera in late convalescence (>12 weeks postinfection). In contrast, during early convalescence (2 to 12 weeks postinfection), secondary DENV-immune sera and some primary DENV-immune sera cross-reacted with the Z-EDI and Z-EDIII antigens. Analysis of sequential samples from DENV-immune individuals demonstrated that Z-EDIII cross-reactivity peaked in early convalescence and declined steeply over time. The Z-EDIII antigen has much potential as a diagnostic antigen for population-level surveillance and for detecting past infections in patients.

KEYWORDS comparative epitope mapping, computational prediction, ELISA, Zika virus, antibody-binding region, cross-reactivity, dengue virus, flavivirus, serological diagnosis, surveillance

Received 15 September 2017 **Returned for modification** 12 October 2017 **Accepted** 11 December 2017

Accepted manuscript posted online 20 December 2017

Citation Premkumar L, Collins M, Graham S, Liou G-JA, Lopez CA, Jadi R, Balmaseda A, Brackbill JA, Dietze R, Camacho E, De Silva AD, Giuberti C, dos Reis HL, Singh T, Heimsath H, Weiskopf D, Sette A, Osorio JE, Permar SR, Miley MJ, Lazear HM, Harris E, de Silva AM. 2018. Development of envelope protein antigens to serologically differentiate Zika virus infection from dengue virus infection. *J Clin Microbiol* 56:e01504-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01504-17>.

Editor Alexander J. McAdam, Boston Children's Hospital

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Lakshmanane Premkumar, prem@med.unc.edu, or Aravinda M. de Silva, aravinda_desilva@med.unc.edu.

* Present address: Aruna D. De Silva, Department of Paraclinical Sciences, Faculty of Medicine, Kotelawala Defense University, Ratmalana, Sri Lanka.

Zika virus (ZIKV) is an enveloped, positive-sense, single-stranded RNA virus in the *Flavivirus* genus, which includes other medically important viruses, such as dengue virus (DENV), West Nile virus, and yellow fever virus (1). ZIKV infection has become a major global health concern because it can disseminate rapidly in naive populations and lead to neurologic sequelae, such as a Guillain-Barré-like syndrome, in otherwise healthy individuals. ZIKV also has the unusual ability among human flaviviruses to be transmitted through sexual contact and from mother to fetus during pregnancy (2). Congenital ZIKV infection can cause developmental abnormalities, including ocular damage, microcephaly, and fetal death (2–5). People at risk of DENV infection are also at risk of ZIKV infection, as both viruses are transmitted by *Aedes* mosquitoes (3).

Accurate diagnosis is critical to many aspects of the public health response to the Zika disease epidemic (6) but is complicated by multiple factors. Clinically, it is impossible to discern among myriad causes of acute fever and/or rash. Molecular tests are useful for detecting symptomatic flavivirus infections during the brief period immediately following infection (7). However, most individuals with ZIKV infection never seek medical attention because they are asymptomatic or experience only a mild, self-limited illness (8, 9). Beyond this acute period, serological tests are necessary to detect ZIKV infections and to support public health efforts, such as prenatal evaluation and management, risk reduction counseling, and surveillance and outbreak investigations.

Unfortunately, most serological tests lack specificity due to cross-reactive antibodies elicited by flavivirus infections. Neutralization assays, which are more specific but less widely available due to their resource-intensive nature, may or may not clarify IgM results that suggest ZIKV or DENV infection, leaving many weeks of waiting for a diagnosis or giving the ambiguous designation “recent flavivirus infection” (10, 11). Patient serum collected 5 or more days after the onset of symptoms contains a complex mixture of antibody populations against the viral envelope (E) protein, directed to epitopes that are unique to the infecting virus as well as to epitopes that are conserved among flaviviruses (12, 13). Consequently, assays that employ the whole virus or E as antigen do not reliably distinguish infections caused by ZIKV from those caused by DENV (14). Recombinant ZIKV antigens containing epitopes recognized by type-specific but not cross-reactive antibody are needed for the development of serological diagnostic assays with greater specificity for ZIKV infection.

The surface of the ZIKV virion is decorated by 180 copies of E with icosahedral symmetry (12, 15–19). Each E protein monomer is composed of an amino-terminal ectodomain (E80; amino acids [aa] 1 to 403), two amphipathic α -helices, and two carboxy-terminal membrane-spanning α -helices (17–19). The surface-exposed E80 region comprises three distinct domains (EDI, EDII, and EDIII), with EDI in the center. EDI (aa 1 to 49, 136 to 195, and 286 to 302) and EDII are noncontiguous in sequence and are connected by a flexible hinge region (EDI/II hinge), whereas EDIII (aa 303 to 403) is a continuous domain extending from EDI (Fig. 1).

Here we present the design, production, and evaluation of ZIKV EDI and EDIII antigens (referred to here as Z-EDI and Z-EDIII, respectively) for serological diagnosis of ZIKV by use of well-characterized early- and late-convalescent-phase immune sera from individuals infected by ZIKV, DENV, or both.

MATERIALS AND METHODS

Human subjects and clinical specimens. (i) Samples from North Carolina (15 samples). Sera were collected from North Carolina residents or visitors with possible or confirmed DENV or ZIKV infection based on self-reported symptoms and travel to or prior residence in areas where flaviviruses are endemic. All specimens were deidentified. All University of North Carolina (UNC) donations were collected in compliance with the Institutional Review Board (IRB) of UNC-Chapel Hill (protocol 08-0895).

(ii) Samples from Nicaragua (24 samples). Five children from the Nicaraguan Pediatric Dengue Cohort Study (PDCS) who were reverse transcription-PCR (RT-PCR) positive for ZIKV and who experienced onset of signs and symptoms of ZIKV infection between 18 January and 16 February 2016 were included. The PDCS is a community-based prospective study of children of 2 to 14 years of age that has been ongoing since August 2004 in Managua, Nicaragua (20). Participants present at the first sign of illness to the Health Center Sócrates Flores Vivas are monitored daily during the acute phase of illness. Acute-phase and convalescent-phase (~14 to 21 days after onset of symptoms) blood samples are drawn for DENV, chikungunya virus (CHIKV), and ZIKV diagnostic testing from patients meeting the case definition

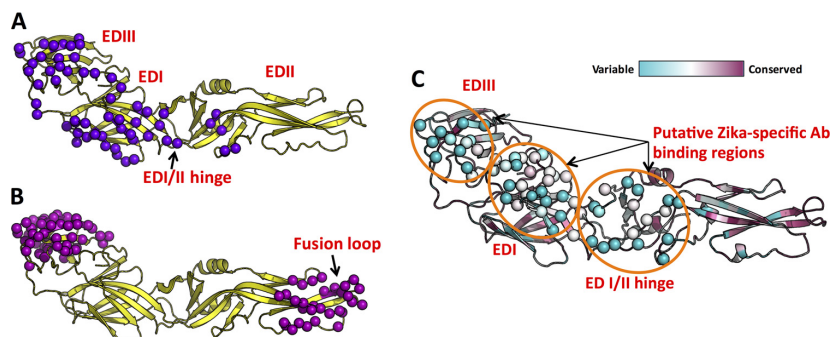


FIG 1 Identification of putative virus-specific antigenic regions on ZIKV E protein. We performed mapping of type-specific (A) and cross-reactive (B) epitopes on E protein by using experimentally determined antibody complex structures available in the Protein Data Bank. Contact residues observed at the interface between E protein and antibody in the complexes are shown as spheres (purple or magenta). (C) Mapping of the degrees of conservation of amino acid positions among eight clinically relevant flaviviruses. The color scale (cyan, variable region; and maroon, conserved region), as described in ConSurf (33, 51), is shown at the top. Three highly variable regions that overlap type-specific antibody-binding regions in panel A were identified as putative ZIKV-specific antibody-binding regions (orange circles), and the corresponding amino acid residues within this region are shown as spheres.

for DENV or ZIKV infection or presenting with undifferentiated febrile illness. All suspected Zika disease cases were confirmed by RT-PCR analysis of serum and/or urine, using triplex assays that simultaneously screen for ZIKV, DENV, and CHIKV infections (ZCD assay [21] or CDC Triplex assay) or, in some cases, the CDC ZIKV monoplex assay (22) in parallel with a DENV-CHIKV multiplex assay (23). A second set of 19 specimens was obtained from a prospective, hospital-based study of DENV (1998 to present; Nicaraguan Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera). Children of 6 months to 14 years of age with suspected flavivirus infection (<7 days of illness) were enrolled (24) and diagnosed by RT-PCR, and blood was obtained at the acute (days 1 to 6) and convalescent (days 14 to 28) phases as well as 3, 6, 12, and 18 months following infection. Only samples obtained prior to the introduction of ZIKV into Nicaragua were used. All studies were approved by the IRBs of the Nicaraguan Ministry of Health and the University of California, Berkeley. Parents or legal guardians of all subjects provided written informed consent, and subjects who were ≥ 6 years old provided assent.

(iii) Samples from Colombia (6 samples). Sera were collected in Sincelejo, Colombia, between December 2015 and March 2016, as part of a field investigation of the ZIKV outbreak and an arbovirus surveillance program conducted by the University of Sucre. All participants provided informed consent prior to blood collection, as described in the University of Sucre Bioethics Committee-approved protocol. Samples were collected during the convalescent phase (3 months after symptom onset) from participants who reported ZIKV-related symptoms.

(iv) Samples from Brazil (9 samples). A cohort of pregnant women with confirmed or suspected ZIKV infection during pregnancy in Vitoria, Espírito Santo State, Brazil, were enrolled in 2016 in a clinical study to follow ZIKV and other related viruses by RT-PCR, serology, and clinical outcomes for the mother-infant pair, under a protocol approved by the national and local IRBs.

(v) Samples from Sri Lanka (13 samples). Sera were collected in the convalescent phase from patients with confirmed DENV infection. Acute infection was confirmed by detection of DENV RNA and/or the presence of DENV-specific IgM and IgG in the serum. Samples were collected 2 to 12 weeks after infection, as previously described (25). The IRBs of both the La Jolla Institute for Allergy and Immunology and the Medical Faculty, University of Colombo (serving as an NIH-approved IRB for Genentech), approved all protocols described for this study.

Sera were heat inactivated at 56°C for 30 min. The serostatuses of specimens were categorized as primary or secondary infection by use of neutralization assays (see Tables S1 and S4 in the supplemental material) as previously described (26). Fivefold-diluted sera were mixed with 50 to 100 focus-forming units of DENV1, DENV2, DENV3, DENV4, or ZIKV per well in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS). Virus-antibody mixtures were incubated for 1 h at 37°C, transferred to a confluent monolayer of Vero cells, and then overlaid with medium containing 1% methylcellulose. Infected cell foci were detected 48 h after infection, following fixation with 4% paraformaldehyde and incubation with 500 ng/ml of flavivirus-cross-reactive mouse monoclonal antibody E60 (27) for 2 h at room temperature. After incubation for 1 h with a 1:5,000 dilution of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma), foci were detected by addition of TrueBlue substrate (KPL). Foci were analyzed with a CTL Immunospot instrument. Fifty percent inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated using the sigmoidal dose-response (variable slope) equation in Prism 7 (GraphPad Software). Reported values were required to have an R^2 value of >0.75 , a hill slope of >0.5 , and an IC_{50} within the range of the assay.

Flavivirus infection status was determined by considering the profile of neutralizing activity of each specimen toward each of five flaviviruses (ZIKV and DENV1 to -4) in the epidemiologic context

of the donor. Specimens with neutralizing antibodies to any one serotype of DENV or to ZIKV, with minimal cross-neutralizing antibodies, were defined as having primary flavivirus infections (meaning that the IC_{50} for a single DENV serotype or ZIKV was >4-fold higher than that for any other virus tested). In most cases, the person's travel history corroborated the immune status. Sera that had high levels of neutralizing antibody to >2 flaviviruses were defined as having secondary flavivirus infections. Most secondary infection samples were from persons who had resided in countries where DENV or ZIKV is endemic. The characteristics of all the samples used in the study are presented in Tables S1 to S4 and S6.

Protein production. A codon-optimized gene encoding Z-EDI or Z-EDIII from ZIKV strain H/PF/2013 (28) was cloned into the pET PPL His6 MBP expression vector (2K-T) by use of a ligation-independent cloning method (29). The 2K-T plasmid was a gift from Scott Gradia (Addgene plasmid 37183). Maltose binding protein (MBP) fused to Z-EDI or Z-EDIII was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS and purified using amylose affinity resin. The ZIKV E80 antigen (aa 1 to 404) was expressed in the Expi293 transient expression system and purified by use of Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) affinity resin as previously described (30, 31).

IgG ELISA. Human serum IgG binding was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described (32). Recombinant ZIKV E80 antigen (500 ng/well) was used to coat the plate, blocked with 3% milk, and incubated with human serum at the indicated dilution at 37°C for 1 h. Z-EDIII and Z-EDI sandwich ELISAs were the same as described above, except that the antigens (200 ng/well) were captured by use of a murine anti-MBP monoclonal antibody (New England BioLabs). Bound IgG was detected with an alkaline phosphatase-conjugated anti-human secondary antibody by incubation with a *p*-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma), and absorbance at 405 nm was measured on an Epoch plate reader (BioTek). The mean binding signal for each serum was calculated from duplicates by subtracting the mean absorbance of the background signal obtained from positive serum with no antigen (for ZIKV E80) or MBP (for Z-EDIII and Z-EDI). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test in Prism 7.0b for nonparametric comparison of recombinant antigen reactivities between sera from ZIKV and DENV patients.

Molecular modeling and structural analysis. For amino acid conservation analysis by ConSurf (33), eight flavivirus E protein sequences (from ZIKV, four serotypes of DENV, St. Louis encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, and yellow fever virus) were used. The ConSurf algorithm assigns a relative conservation score to each residue and normalizes the score such that the average is zero and negative and positive deviations denote the degrees of conservation and variation, respectively. The relative conservation scores were then converted to values ranging from 1 to 9 (1 for most variable [cyan], 5 for average [white], and 9 for most conserved [purple]) to generate a heat map that was used to color the molecular surface of the ZIKV E protein structure.

For type-specific epitope mapping, structures of monoclonal antibody complexes with E or E fragments (Protein Data Bank [PDB] IDs 4UIF [34], 5A1Z [34], 4UIH [34], 3IYW [35], 4C2I [36], 3J05 [37], 3J6U [36], 3UAJ [38], 3UCO [38], and 1ZTX [39]) were aligned to the reference E protein structure by use of PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.8; Schrödinger, LLC). For cross-reactive epitope mapping, antibody structure complexes with E or E fragments (PDB IDs 4UT9 [40], 4UT6 [40], 4UTA [40], 3I50 [41], 2R29 [42], 3UZQ [43], 4FFY [44], 5AAM [45], 4LSF, 4BZ2, 4AL8 [46], 3UYP [43], 3UZE [43], and 3UZV [43]) were aligned to the reference E protein structure by use of PyMOL. Contact residues in the E protein-antibody interface were then identified by a 5.0-Å cutoff distance between any atoms in E and any atom in the antibody. All molecular figures were drawn with PyMOL.

RESULTS

Computational prediction of ZIKV-specific antibody-binding regions. ZIKV E protein shares 55 to 58% sequence identity with DENV E proteins and contains highly conserved epitopes that are responsible for extensive cross-reactivity with polyclonal serum antibodies (47). However, people infected with ZIKV develop some antibodies that neutralize ZIKV but not DENV, demonstrating the presence of epitopes that are unique to ZIKV (26, 48, 49). To identify E protein antigenic regions that may be targets for ZIKV-specific antibodies, we generated and compared surface maps of known DENV antibody epitopes and a map of surface amino acid conservation between different flaviviruses, including ZIKV and the 4 DENV serotypes (Fig. 1). Surface amino acid sequence conservation analysis has been used to identify conserved and variable regions between proteins (50). Our rationale is that such conservation analysis combined with the knowledge of conformational epitopes of E protein can guide prediction of ZIKV-specific antigenic regions.

To perform comparative epitope mapping of E protein, we superimposed experimentally determined structures for type-specific and cross-reactive antibody-E protein complexes onto a reference E structure. Analyzing the residues at the interface between the E protein and the antibody showed that there are two possible cross-reactive antibody-binding sites on the surface of E protein: one site is at the tip of EDII, which contains the fusion loop, and the other is located on the EDIII surface formed by

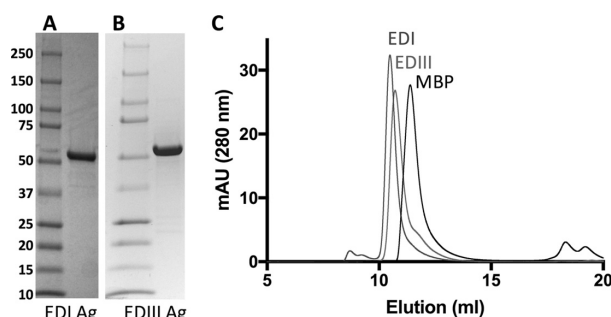


FIG 2 Analysis of purified recombinant antigens by SDS-PAGE and size exclusion chromatography (SEC). Purified Z-EDI (A) and Z-EDIII (B) antigens (6 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and then stained with Coomassie brilliant blue. Molecular size markers and their apparent masses are shown on the left. (C) SEC overlays of purified EDI, EDIII, and MBP antigens. Protein samples in PBS were subjected to SEC on a Superdex75 10/300GL column. mAU, milli-absorbance units.

β -strands A, B, E, and G (Fig. 1B). Next, we used the ConSurf algorithm (33, 51) to obtain a conservation score for each amino acid position across 8 different E proteins from clinically relevant flaviviruses (Fig. 1C). Projecting the ConSurf conservation scores onto the molecular surface of the ZIKV E structure showed that most of the solvent-exposed outer surface is variable between flaviviruses, whereas the surface adjacent to the stem region, the transmembrane helices, and the regions contributing to intermolecular assembly are largely conserved. The correlations between cross-reactive epitopes and the conserved regions and between virus-specific epitopes and variable regions were evident across the maps. Accordingly, we identified three regions that we predicted would be recognized by ZIKV type-specific antibodies: a region around the solvent-exposed “glycosylation loop” on EDI and the edge of EDI, a region on the outer surface of the flexible hinge region formed between EDI and EDII, and a region on the “lateral ridge” of EDIII (Fig. 1C).

Expression of ZIKV recombinant antigens. Following our prediction that epitopes recognized by ZIKV type-specific antibodies are located mainly on EDI and EDIII, we designed two constructs of Z-EDI and Z-EDIII fused to maltose binding protein (MBP) for periplasmic expression in *E. coli*. Soluble recombinant Z-EDI and Z-EDIII were readily purified by amylose affinity chromatography, with yields of \sim 3 mg of purified protein from 1 liter of bacterial culture (Fig. 2A and B). Size exclusion chromatography (SEC) analysis showed that the recombinant antigens behaved as monomeric proteins in solution (Fig. 2C), and the Ellman assay (52) confirmed the presence of intact intramolecular disulfide bonds in the Z-EDI and Z-EDIII antigens. Moreover, Z-EDIII was able to bind to the mouse monoclonal antibodies ZV-2, ZV-48, and ZV-67, which recognize conformational epitopes (48). We also expressed the entire ectodomain of ZIKV E protein (Z-E80) to use as a reference antigen to evaluate the performances of Z-EDI and Z-EDIII.

Immune sera from people exposed to DENV and ZIKV. To evaluate recombinant antigens for serological detection of ZIKV infection, we assembled panels of 22 late-convalescent-phase samples (collected $>$ 12 weeks after infection) and 43 early-convalescent-phase samples (collected 2 to 12 weeks after infection) from individuals who were exposed to ZIKV, DENV, or both through travel or residence in areas of endemicity (see Tables S1 to S4 in the supplemental material). We categorized the serostatus of each sample in the panels as primary flavivirus immune (evidence of only one serotype of DENV or ZIKV), secondary flavivirus immune (evidence of more than one serotype of DENV or both ZIKV and DENV), or naive (no evidence of DENV or ZIKV) by using a combination of neutralizing activity, RT-PCR, and/or IgG seroconversion as described in Materials and Methods.

Evaluation of ZIKV E80, EDI, and EDIII antigens for serological detection of remote infections ($>$ 12 weeks postinfection). Although ZIKV-immune sera reacted

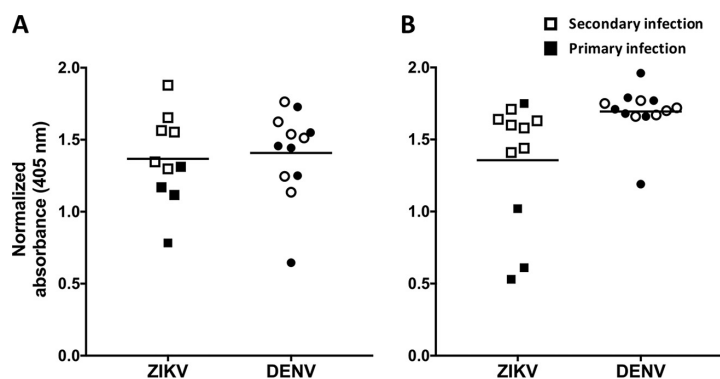


FIG 3 Binding of recombinant E80 antigen to sera from patients with remote (A) and recent (B) ZIKV and/or DENV infection. Sera from primary (filled symbols) and secondary (unfilled symbols) ZIKV- and DENV-infected patients were diluted 1:20, and the IgG antibodies bound to recombinant E80 antigen were measured by ELISA. Sera collected ≥ 12 weeks after infection were defined as remote infections, and sera collected within the first 12 weeks were considered to represent recent infections. The horizontal lines represent the means.

strongly with ZIKV E80, immune sera from individuals infected with DENV consistently showed high levels of cross-reactivity with recombinant ZIKV E80 antigen in a standard IgG ELISA (Fig. 3A). Using an anti-MBP monoclonal antibody to capture MBP fusion proteins, we developed a sandwich ELISA to measure serum IgG levels to Z-EDI and Z-EDIII (Fig. 4A and B). At late convalescence, ZIKV-immune sera recognized Z-EDI and Z-EDI antigens significantly better than DENV-immune sera ($P < 0.0001$ by the Mann-Whitney test). Consequently, the Z-EDI and Z-EDIII antigens may be useful for specific detection of remote (> 12 weeks) ZIKV infections in areas with endemic DENV transmission.

Evaluation of ZIKV E80, EDI, and EDIII antigens for serological detection of recent infections (2 to 12 weeks postinfection). At early convalescence, immune sera collected from ZIKV-infected individuals had high levels of IgG that bound to Z-E80, Z-EDI, and Z-EDIII (Fig. 3B and 4C and D). However, DENV-immune sera collected during the early convalescent phase also reacted strongly with the Z-EDI and Z-EDIII antigens. To dissect Z-EDI and Z-EDIII cross-reactivities during early convalescence, the data were regrouped and the IgG binding activities compared between ZIKV-immune sera and primary or secondary DENV-immune sera (Fig. 4C and D). The IgG reactivities of Z-EDI and Z-EDIII were practically indistinguishable between ZIKV- and DENV-immune sera in secondary cases. While the reactivities to naive and primary DENV2 or -3 sera were mostly at the baseline level, five of the six primary DENV samples collected during the DENV1 epidemic in Sri Lanka showed high reactivity to Z-EDI and Z-EDIII. Recently, individuals with prior DENV1 infection were shown to produce high levels of Z-EDIII-cross-reactive antibodies in early convalescence (53, 54). A conserved lysine residue (K394) on the lateral ridge of ZIKV and DENV1 EDIII was suggested to be responsible for a common mode of binding to DENV1 antibody. However, introducing an alanine at this site (K394A mutation) did not change the reactivity of Z-EDIII against DENV1-immune sera from Sri Lanka (Table S5). As our initial IgG assays were performed using a 1:20 dilution of serum, we further diluted the early-convalescent-phase samples in an attempt to improve specificity. Dilution of early-convalescent-phase serum to dilutions of up to 1:180 was not adequate to improve the specificity of Z-EDI and Z-EDIII against secondary DENV- or DENV1-immune sera (Fig. S1). One major difference in the compositions of antigen-specific antibody populations in early versus late convalescence may be the presence of high levels of IgM. However, depleting total IgM from early-convalescent-phase primary ZIKV samples did not increase IgG binding to Z-EDI or Z-EDIII (data not shown), indicating that IgM does not outcompete IgG for antigen

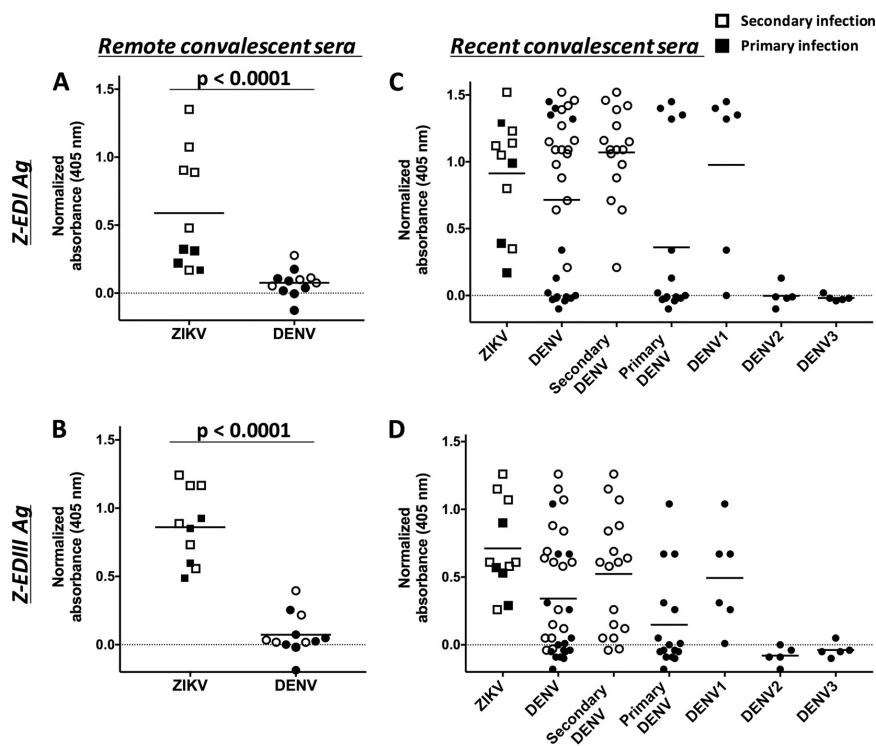


FIG 4 Binding of Z-EDI and Z-EDIII with remote (A and B) and recent (C and D) convalescent-phase sera from patients infected with ZIKV and/or DENV. Primary (filled symbols) and secondary (unfilled symbols) human serum samples were diluted 1:20, and the IgG antibodies bound to Z-EDI (A and C) or Z-EDIII (B and D) were measured using a sandwich ELISA. Sera collected ≥ 12 weeks after infection were defined as remote infections, and sera collected within the first 12 weeks were considered to represent recent infections. Statistical significances are indicated at the top of the graphs (Mann-Whitney U test). P values of < 0.0001 were considered statistically significant. The horizontal lines represent the means.

binding in our assay. Taken together, the results showed that IgG cross-reactivity with the Z-EDI and Z-EDIII antigens in DENV-immune sera was pronounced in early-convalescent-phase samples (< 12 weeks) from secondary DENV and primary DENV1 infections but not at the late convalescent (> 12 weeks) phase.

Longitudinal analysis of ZIKV EDI and EDIII cross-reactivities in DENV-immune samples. Next, we evaluated sequential serum samples collected as part of a hospital-based study in Nicaragua from 24 children with laboratory-confirmed primary and secondary DENV3 infections (collected before the introduction of ZIKV to the region) (Table S6). This study allowed us to define the time course of cross-reactivity with the Z-EDI and Z-EDIII antigens as well as to compare cross-reactivity with Z-EDI and Z-EDIII in primary DENV infections with that in secondary DENV infections in individuals infected with the same serotype of DENV. All eight primary DENV3 cases showed minimal to no cross-reactivity to Z-EDI and Z-EDIII < 1 , 6, and 12 months after DENV infection (Fig. 5A and B). However, most secondary DENV-immune samples showed reactivity to Z-EDI and Z-EDIII 14 to 23 days after DENV3 infection. By 6 months after infection, only 4 of 16 subjects still maintained cross-reactive antibodies to Z-EDIII (Fig. 5A), based on a stringent cutoff of an optical density (OD) of 0.3 (the lowest OD observed for the Z-EDIII antigen with any ZIKV-immune sample used in this study). While a trend of declining cross-reactivity was also observed for Z-EDI antibodies, 7 of 16 subjects exhibited cross-reactivity to the secondary DENV3 cases even at 12 months

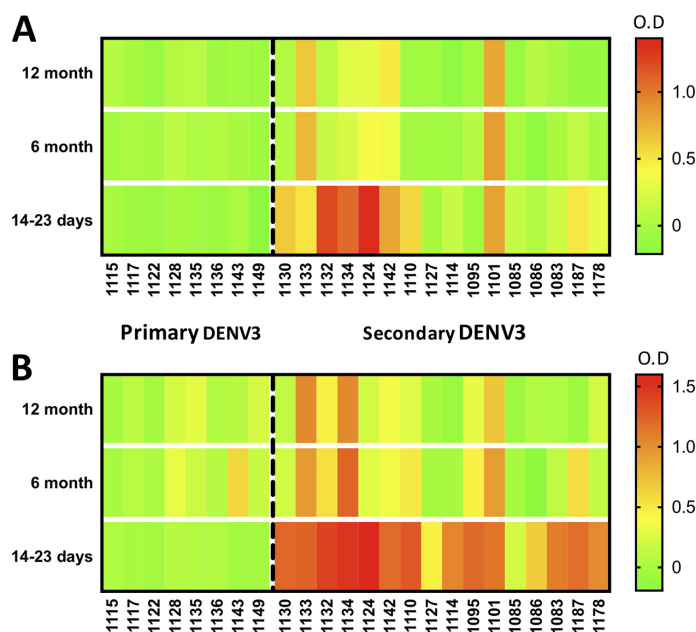


FIG 5 Patterns of cross-reactivity of Z-EDIII (A) and ZED-I (B) antigens with longitudinal DENV samples. Intensities of serum binding in sandwich ELISAs for Z-EDIII and Z-EDI are shown as heat maps. Longitudinal samples (collected 14 to 23 days, 6 months, and 12 months postinfection) from patients with primary (left of the dashed line) or secondary (right of the dashed line) DENV3 infection were diluted 1:20, and the IgG antibodies bound to Z-EDI or Z-EDIII were measured using a sandwich ELISA. The resulting normalized OD values are represented by a color scale (green, lowest values; yellow, middle values; and red, highest values).

postinfection (Fig. 5B). We concluded that among people exposed to secondary DENV infections, cross-reactive Z-EDIII antibodies typically decline to background levels by 6 months postinfection.

DISCUSSION

As ZIKV is emerging in areas with intense DENV transmission and, more recently, clinical trials of DENV vaccines, there is an urgent need for simple serological assays to distinguish ZIKV infections from DENV infections. Our comparative analysis of surface amino acid conservation among flavivirus E proteins and homology epitope mapping pointed to three regions on ZIKV E protein as potential targets of ZIKV type-specific antibodies. Here we evaluated the utility of recombinant Z-EDI and Z-EDIII antigens, which display two of the three predicted ZIKV-specific antigenic regions. Our results demonstrate that Z-EDIII and, to a lesser extent, Z-EDI are strong candidate antigens for serological tests to differentiate ZIKV infections from DENV infections when samples are collected >12 weeks after infection. The recombinant antigens performed equally well for both primary and secondary infection samples, indicating that specificity was not reduced by high levels of cross-reactive antibodies characteristic of secondary flavivirus infection.

In contrast to that in late convalescence, we observed a high level of cross-reactivity in early-convalescent-phase DENV samples (2 to 12 weeks after infection). Early-convalescent-phase cross-reactivity was more pronounced in secondary than in primary DENV cases. Among individuals exposed to primary DENV infections, we observed low to undetectable levels of antibodies that cross-reacted with Z-EDI and Z-EDIII, except in the case of primary DENV1 infections. Recent studies defined an epitope on EDIII that is conserved between DENV1 and ZIKV (55). A single point mutation at this epitope

failed to eliminate the cross-reactivity, indicating the need for additional mutations to ablate the epitope as well as the possibility of other conserved epitopes between ZIKV and DENV1. In secondary DENV cases, we consistently observed high levels of cross-reactivity at early convalescence, irrespective of serotype or geographic location of sample collection.

Our longitudinal analysis of Z-EDI and Z-EDIII reactivities, spanning from early to late convalescent phase, showed that flavivirus-cross-reactive IgG antibodies comprise a transient population that is produced early after infection and declines thereafter, whereas ZIKV-specific responses are more stable over time (26). While the cellular mechanisms responsible for the differential decline of cross-reactive and type-specific serum antibodies are not known, one possible explanation is that many of the cross-reactive antibodies are derived from early plasmablasts or extrafollicular B cells that are not maintained as long-lived plasma cells or memory B cells.

Development of serological tests for diagnosing ZIKV infection in the context of prior flavivirus infection is a challenging and complex problem that remains a major unmet need. To date, there are only three serological assays for ZIKV approved by the U.S. Food and Drug Administration, under an emergency use authorization (56), and a few other commercial tests are available in countries outside the United States or for research purposes. These assays use either NS1, recombinant E, or another, unspecified ZIKV antigen (57). The Centers for Disease Control and Prevention MAC (IgM) ELISA exhibits well-publicized limitations, including false-negative results (58), false-positive results due to cross-reactive antibody from DENV infection (59), and persistence of ZIKV IgM beyond the previously presumed 12-week window (60). Our findings of cross-reactive IgG binding in early convalescence indicate that this period will be the most challenging for optimization of assay specificity. Thus, there is roughly a 10-week period (weeks 2 to 12) following infection when current and next-generation serodiagnostic results may remain ambiguous. One important step forward is found in a recent report evaluating an NS1-based blockade-of-binding assay for ZIKV diagnosis (61). This assay leverages a ZIKV type-specific monoclonal antibody recognizing a nonconserved epitope on ZIKV NS1 (62). Again, a certain secondary DENV group displayed reduced specificity in this NS1-based assay during early convalescence. It may be that a combination of antigens is required to achieve optimal sensitivity and specificity for serum antibody detection, particularly during early convalescence.

Additional issues preclude optimal implementation of many currently available serological assays. First, the serum panels used to evaluate these assays come from remnant clinical specimens or archived sera not collected systematically and specifically for analysis of clinical performance in diagnosing individuals with multiple flavivirus exposures. Second, sera from individuals with a single flavivirus infection history and residing in regions where flavivirus infection is not endemic are not representative of the populations for whom improved diagnostics are most critical, namely, those residing in the tropics, where individuals experience multiple and frequent flavivirus exposures. We are involved with ongoing studies designed to address this shortcoming. Third, sensitivity in different IgM assays can be less than 80%, particularly outside the range of 6 to 60 days, when IgM assays perform best. Lastly, not only have false-positive ZIKV test results been reported due to current or previous DENV infection, but DENV tests may also be positive following confirmed ZIKV infections. The cumulative experience with ZIKV serodiagnosis, to date, clearly indicates that novel approaches will be required.

There are a few notable limitations to our study. Our goal was to explore recombinant ZIKV E antigens for development of improved serodiagnostics. The moderate sample size to which we had access allowed us to achieve that goal; however, a larger sample size will be necessary to define more precise cutoff values and to fully evaluate sensitivity and specificity. Ideally, a candidate diagnostic test would be evaluated in a large cohort of patients with PCR-confirmed infection status, representing multiple serotypes of DENV and other flavivirus exposures, and with availability of longitudinal specimens collected at early and late times after infection.

Diversity in infecting strains of ZIKV may elicit antibodies that target different epitopes or different permutations of the same antigenic region of E protein. While we evaluated only a single construct for each of the Z-EDI and Z-EDIII antigens, we believe that these antigens (from a ZIKV isolate from French Polynesia) are likely to be representative of the vast majority of ZIKV strains in circulation. In fact, E protein amino acid sequences from ZIKV isolates from several different times and places vary by only $\leq 1\%$, and both African and Asian lineage strains perform similarly in binding and neutralization assays, suggesting that ZIKV exists as a single serotype (26, 63).

While the present work provides the platform for incorporating Z-EDI and Z-EDIII into a suitable antigen-antibody binding assay for the purposes of surveillance, vaccine efficacy studies, and risk reduction counseling, further modification of Z-EDI and Z-EDIII may improve their utility in the early convalescent phase of ZIKV infection. Cross-reactive antibodies may be depleted using recombinant DENV antigens, but depletion techniques are tedious and time-consuming (26). Introducing amino acid variation through protein engineering is an attractive strategy to eliminate cross-reactive antibody-binding sites while preserving unique epitopes within Z-EDIII and Z-EDI antigens. The high signal we observed for IgG binding to Z-EDIII with a simple ELISA format is encouraging, although a combination of Z-EDI and Z-EDIII as well as fusion of antigens to protein scaffolds may also be tested for improvement of the sensitivity of the assay. Finally, we observed that some individuals are strongly IgG seropositive for only one of the Z-EDI or Z-EDIII antigen, raising the possibility that a multiplex platform employing a panel of antigens may improve sensitivity (64). This approach also has the advantage of allowing the design of expanded antigen panels to detect antibodies specific for additional pathogens that cause clinical presentations similar to those for DENV and ZIKV.

In conclusion, we have demonstrated that Z-EDI and Z-EDIII contain important epitopes that can be used to resolve current serodiagnostic limitations. Ultimately, this work can lead to development of crucial point-of-care ZIKV diagnostics amenable to field use in resource-limited settings. In the process, much can be learned about the epitopes targeted by durable type-specific and cross-reactive human antibodies generated upon ZIKV exposure, which is important for the design of highly efficacious DENV and ZIKV vaccines.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JCM.01504-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

These studies were supported by NIAID, NIH, grants R01AI107731 (A.M.D.S.), R21AI134073 (A.M.D.S. and L.P.), R01AI099631 (A.B.), R21/R33AI100186 (A.B.), P01AI106695 (E.H.), and U19AI118610 (E.H.) and by CDC contract 200-2017-93142 (A.M.D.S.). Further support was provided by ZIKAPLAN, which received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement 734584. The Brazil pregnancy cohort was funded by FAPES grant 306/2016-74910132/16 (S.R.P.). The Sri Lankan cohort study was funded by NIH contracts HHSN272200900042C and HHSN27220140045C (A.S.).

The content of this study is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

We thank Gabriel Hoesktra for his technical assistance with protein expression and purification. We also thank Magelda Montoya for assistance with this study, as well as past and present members of the study teams based at the Centro de Salud Sócrates Flores Vivas, the Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera, the National Virology Laboratory in the Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, and the Sustainable Sciences

Institute in Nicaragua for their dedication and high-quality work, and we are grateful to the study participants and their families.

REFERENCES

- Musso D, Baud D, Gubler DJ. 2016. Zika virus: what do we know? *Clin Microbiol Infect* 22:494–496. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.032>.
- Lazear HM, Diamond MS. 2016. Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the Western Hemisphere. *J Virol* 90:4864–4875. <https://doi.org/10.1128/JVI.00252-16>.
- Lazear HM, Stringer EM, de Silva AM. 2016. The emerging Zika virus epidemic in the Americas: research priorities. *JAMA* 315:1945–1946. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.2899>.
- Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimaraes KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandao WN, Rossato C, Andrade DG, Faria DP, Garcez AT, Buchpiguel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PM, Peron JP, Muotri AR, Beltrao-Braga PC. 2016. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534:267–271. <https://doi.org/10.1038/nature18296>.
- Garcez PP, Loliola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen SK. 2016. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* 352:816–818. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6116>.
- The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2016. Potential research priorities to inform public health and medical practice for domestic Zika virus: workshop in brief. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/23404>.
- Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-Larson L, Stanek D, Blackmore C, Likos A. 2016. Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated Zika virus disease—Florida, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:475–478. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6518e2>.
- Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>.
- Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Brout J. 2014. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill* 19:20761. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761>.
- Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, Hummel KB, Johnson JA, Rose L, MTS, Hills S, Wasley A, Fischer M, Powers AM. 2016. Interim guidance for interpretation of Zika virus antibody test results. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:543–546. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6521e1>.
- Granger D, Hilgart H, Misner L, Christensen J, Bistodeau S, Palm J, Strain AK, Konstantinovski M, Liu D, Tran A, Theel ES. 2017. Serologic testing for Zika virus: comparison of three Zika virus IgM-screening enzyme-linked immunosorbent assays and initial laboratory experiences. *J Clin Microbiol* 55:2127–2136. <https://doi.org/10.1128/JCM.00580-17>.
- Wahala WM, Silva AM. 2011. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses* 3:2374–2395. <https://doi.org/10.3390/v3122374>.
- Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, Pattanapanyasat K, Choekphaibulkit K, Mulligan MJ, Wilson PC, Ahmed R, Suthar MS, Wrammert J. 2016. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:7852–7857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607931113>.
- Morrison AC, Minnick SL, Rocha C, Forshey BM, Stoddard ST, Getis A, Focks DA, Russell KL, Olson JG, Blair PJ, Watts DM, Sihuinchu M, Scott TW, Kochel TJ. 2010. Epidemiology of dengue virus in Iquitos, Peru 1999 to 2005: interepidemic and epidemic patterns of transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e670. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000670>.
- Crill WD, Chang GJ. 2004. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J Virol* 78:13975–13986. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13975-13986.2004>.
- Rothman AL. 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 11:532–543. <https://doi.org/10.1038/nri3014>.
- Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H, Zhang Y, Yuan Y, Song H, Haywood J, Xiao H, Yan J, Shi Y, Qin CF, Qi J, Gao GF. 2016. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe* 19:696–704. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013>.
- Kostyuchenko VA, Lim EX, Zhang S, Fibriansah G, Ng TS, Ooi JS, Shi J, Lok SM. 2016. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* 533:425–428. <https://doi.org/10.1038/nature17994>.
- Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, Kuhn RJ. 2016. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* 352:467–470. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5316>.
- Kuan G, Gordon A, Aviles W, Ortega O, Hammond SN, Elizondo D, Nunez A, Coloma J, Balmaseda A, Harris E. 2009. The Nicaraguan pediatric dengue cohort study: study design, methods, use of information technology, and extension to other infectious diseases. *Am J Epidemiol* 170:120–129. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp092>.
- Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Davila MJ, Tellez Y, Sahoo MK, Balmaseda A, Harris E, Pinsky BA. 2016. Single-reaction multiplex reverse transcription PCR for detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Emerg Infect Dis* 22:1295–1297. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160326>.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 14:1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>.
- Waggoner JJ, Ballesteros G, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Tellez Y, Sahoo MK, Abeynayake J, Balmaseda A, Harris E, Pinsky BA. 2016. Clinical evaluation of a single-reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and chikungunya virus detection. *J Clin Virol* 78:57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.01.007>.
- Narvaez F, Gutierrez G, Perez MA, Elizondo D, Nunez A, Balmaseda A, Harris E. 2011. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1397. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001397>.
- Weiskopf D, Angelo MA, Grifoni A, O'Rourke PH, Sidney J, Paul S, De Silva AD, Phillips E, Mallal S, Premawansa S, Premawansa G, Wijewickrama A, Peters B, Sette A. 2016. HLA-DRB1 alleles are associated with different magnitudes of dengue virus-specific CD4+ T-cell responses. *J Infect Dis* 214:1117–1124. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw309>.
- Collins MH, McGowan E, Jodi R, Young E, Lopez CA, Baric RS, Lazear HM, de Silva AM. 2017. Lack of durable cross-neutralizing antibodies against Zika virus from dengue virus infection. *Emerg Infect Dis* 23:773–781. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161630>.
- Oliphant T, Nybakken GE, Engle M, Xu Q, Nelson CA, Sukupolvi-Petty S, Marri A, Lachmi BE, Olshevsky U, Fremont DH, Pierson TC, Diamond MS. 2006. Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile virus envelope protein. *J Virol* 80:12149–12159. <https://doi.org/10.1128/JVI.01732-06>.
- Baronti C, Piorowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparco-Goffart I, de Lamballerie X. 2014. Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. *Genome Announc* 2:e00500-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00500-14>.
- Aslanidis C, de Jong PJ. 1990. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* 18:6069–6074. <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6069>.
- Metz SW, Gallichotte EN, Brackbill A, Premkumar L, Miley MJ, Baric R, de Silva AM. 2017. In vitro assembly and stabilization of dengue and Zika virus envelope protein homo-dimers. *Sci Rep* 7:4524. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04767-6>.
- Metz SW, Tian S, Hoekstra G, Yi X, Stone M, Horvath K, Miley MJ, DeSimone J, Luft CJ, de Silva AM. 2016. Precisely molded nanoparticle displaying DENV-E proteins induces robust serotype-specific neutralizing antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0005071. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005071>.
- de Alwis R, Smith SA, Olivarez NP, Messer WB, Huynh JP, Wahala WM, White LJ, Diamond MS, Baric RS, Crowe JE, Jr, de Silva AM. 2012. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex

- epitopes on dengue virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7439–7444. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200566109>.
33. Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. 2016. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res* 44:W344–W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>.
 34. Fibriansah G, Ibarra KD, Ng TS, Smith SA, Tan JL, Lim XN, Ooi JS, Kostyuchenko VA, Wang J, de Silva AM, Harris E, Crowe JE, Jr, Lok SM. 2015. Dengue virus. Cryo-EM structure of an antibody that neutralizes dengue virus type 2 by locking E protein dimers. *Science* 349:88–91. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8651>.
 35. Kaufmann B, Vogt MR, Goudsmit J, Holdaway HA, Aksyuk AA, Chipman PR, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG. 2010. Neutralization of West Nile virus by cross-linking of its surface proteins with Fab fragments of the human monoclonal antibody CR4354. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18950–18955. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011036107>.
 36. Fibriansah G, Tan JL, Smith SA, de Alwis AR, Ng TS, Kostyuchenko VA, Ibarra KD, Wang J, Harris E, de Silva A, Crowe JE, Jr, Lok SM. 2014. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Mol Med* 6:358–371. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303404>.
 37. Teoh EP, Kukkaro P, Teo EW, Lim AP, Tan TT, Yip A, Schul W, Aung M, Kostyuchenko VA, Leo YS, Chan SH, Smith KG, Chan AH, Zou G, Ooi EE, Kemeny DM, Tan GK, Ng JK, Ng ML, Alonso S, Fisher D, Shi PY, Hanson BJ, Lok SM, MacAry PA. 2012. The structural basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. *Sci Transl Med* 4:139ra83. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003888>.
 38. Cockburn JJ, Navarro Sanchez ME, Goncalvez AP, Zaitseva E, Stura EA, Kikuti CM, Duquerroy S, Dussart P, Chernomordik LV, Lai CJ, Rey FA. 2012. Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus. *EMBO J* 31:767–779. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.439>.
 39. Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond MS, Fremont DH. 2005. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* 437:764–769. <https://doi.org/10.1038/nature03956>.
 40. Rouvinski A, Guardado-Calvo P, Barba-Spaeth G, Duquerroy S, Vaney MC, Kikuti CM, Navarro Sanchez ME, Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Haouz A, Girard-Blanc C, Petres S, Shepard WE, Despres P, Arenzana-Seisdedos F, Dussart P, Mongkolsapaya J, Screaton GR, Rey FA. 2015. Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature* 520:109–113. <https://doi.org/10.1038/nature14130>.
 41. Cherrier MV, Kaufmann B, Nybakken GE, Lok SM, Warren JT, Chen BR, Nelson CA, Kostyuchenko VA, Holdaway HA, Chipman PR, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG, Fremont DH. 2009. Structural basis for the preferential recognition of immature flaviviruses by a fusion-loop antibody. *EMBO J* 28:3269–3276. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.245>.
 42. Lok SM, Kostyuchenko V, Nybakken GE, Holdaway HA, Battisti AJ, Sukupolvi-Petty S, Sedlak D, Fremont DH, Chipman PR, Roehrig JT, Diamond MS, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2008. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. *Nat Struct Mol Biol* 15:312–317. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1382>.
 43. Cockburn JJ, Navarro Sanchez ME, Fretes N, Urvoas A, Staropoli I, Kikuti CM, Coffey LL, Arenzana Seisdedos F, Bedouelle H, Rey FA. 2012. Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody. *Structure* 20:303–314. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.001>.
 44. Austin SK, Dowd KA, Shrestha B, Nelson CA, Edeling MA, Johnson S, Pierson TC, Diamond MS, Fremont DH. 2012. Structural basis of differential neutralization of DENV-1 genotypes by an antibody that recognizes a cryptic epitope. *PLoS Pathog* 8:e1002930. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002930>.
 45. Robinson LN, Tharakaraman K, Rowley KJ, Costa VV, Chan KR, Wong YH, Ong LC, Tan HC, Koch T, Cain D, Kirloskar R, Viswanathan K, Liew CW, Tissire H, Ramakrishnan B, Myette JR, Babcock GJ, Sasisekharan R, Alonso S, Chen J, Lescar J, Shriver Z, Ooi EE, Sasisekharan R. 2015. Structure-guided design of an anti-dengue antibody directed to a non-immunodominant epitope. *Cell* 162:493–504. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.057>.
 46. Midgley CM, Flanagan A, Tran HB, Dejnirattisai W, Chawansuntati K, Jumnainsong A, Wongwiwat W, Duangchinda T, Mongkolsapaya J, Grimes JG, Screaton GR. 2012. Structural analysis of a dengue cross-reactive antibody complexed with envelope domain III reveals the molecular basis of cross-reactivity. *J Immunol* 188:4971–4979. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200227>.
 47. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Haouz A, England P, Stiasny K, Mongkolsapaya J, Heinz FX, Screaton GR, Rey FA. 2016. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature* 536:48–53. <https://doi.org/10.1038/nature18938>.
 48. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ, Gorman MJ, Govero J, Nelson CA, Pierson TC, Diamond MS, Fremont DH. 2016. Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. *Cell* 166:1016–1027. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.020>.
 49. Wahala WM, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM. 2009. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* 392:103–113. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.037>.
 50. Lichtarge O, Bourne HR, Cohen FE. 1996. An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol* 257:342–358. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0167>.
 51. Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. 2010. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 38:W529–W533. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq399>.
 52. Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
 53. Rogers TF, Goodwin EC, Briney B, Sok D, Beutler N, Strubel A, Nedellec R, Le K, Brown ME, Burton DR, Walker LM. 2017. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. *Sci Immunol* 2:eaan6809. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan6809>.
 54. Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, Schaefer-Babajew D, Avila-Rios S, Nogueira L, Patel R, Azzopardi SA, Uhl LFK, Saeed M, Sevilla-Reyes EE, Agudelo M, Yao KH, Golijanin J, Gristick HB, Lee YE, Hurley A, Caskey M, Pai J, Oliveira T, Wunder EA, Jr, Sacramento G, Nery N, Jr, Orge C, Costa F, Reis MG, Thomas NM, Eisenreich T, Weinberger DM, de Almeida ARP, West AP, Jr, Rice CM, Bjorkman PJ, Reyes-Teran G, Ko AI, MacDonald MR, Nussenzweig MC. 2017. Recurrent potent human neutralizing antibodies to Zika virus in Brazil and Mexico. *Cell* 169:597.e11–609.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.024>.
 55. Bolze A, Byun M, McDonald D, Morgan NV, Abhyankar A, Premkumar L, Puel A, Bacon CM, Rieux-Laucat F, Pang K, Britland A, Abel L, Cant A, Maher ER, Riedl SJ, Hambleton S, Casanova J-L. 2010. Whole-exome-sequencing-based discovery of human FADD deficiency. *Am J Hum Genet* 87:873–881. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.10.028>.
 56. US FDA. 2016. Zika virus emergency use authorization. <https://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/ucm161496.htm#zika>.
 57. Safronetz D, Sloan A, Stein DR, Mendoza E, Barairo N, Ranadheera C, Scharikow L, Holloway K, Robinson A, Traykova-Andonova M, Makowski K, Dimitrova K, Giles E, Hiebert J, Mogk R, Beddome S, Drebot M. 2017. Evaluation of 5 commercially available Zika virus immunoassays. *Emerg Infect Dis* 23:1577–1580. <https://doi.org/10.3201/eid2309.162043>.
 58. Davis AC. 2017. D.C.'s botched Zika testing leaves dozens of families monitoring for symptoms. https://www.washingtonpost.com/local/dc-politics/dcs-botched-zika-testing-leaves-dozens-of-families-monitoring-for-symptoms/2017/05/09/3ab24958-34db-11e7-b373-418f6849a004_story.html?utm_term=.fcd651095232.
 59. Education CsDoIca. 2016. FDA warns health care providers against relying solely on Zika virus serological IgM assay results; reminds them to wait for confirmatory test results before making patient management decisions: FDA safety communication. <http://www.firstwordmedtech.com/node/992281>.
 60. Oduyebo T, Polen KD, Walke HT, Reagan-Steiner S, Lathrop E, Rabe IB, Kuhnert-Tallman WL, Martin SW, Walker AT, Gregory CJ, Ades EW, Carroll DS, Rivera M, Perez-Padilla J, Gould C, Nemhauser JB, Ben Beard C, Harcourt JL, Viens L, Johansson M, Ellington SR, Petersen E, Smith LA, Reichard J, Munoz-Jordan J, Beach MJ, Rose DA, Barzilay E, Noonan-Smith M, Jamieson DJ, Zaki SR, Petersen LR, Honein MA, Meaney-Delman D. 2017. Update: interim guidance for health care providers caring for pregnant women with possible Zika virus exposure—United States (including U.S. territories), July 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 66:781–793. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6629e1>.
 61. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, Jaconi S, Cameroni E, Saborio S, Rovida F, Percivalle E, Ijaz S, Dicks S, Ushiro-Lumb I, Barzon L, Siqueira P, Brown DWG, Baldanti F, Tedder R, Zambon M, de Filippis AMB, Harris E, Corti D. 2017. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other

- flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:8384–8389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704984114>.
62. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Jaconi S, Mele F, Foglierini M, Pedotti M, Simonelli L, Dowall S, Atkinson B, Percivalle E, Simmons CP, Varani L, Blum J, Baldanti F, Camerini E, Hewson R, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F, Corti D. 2016. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* 353:823–826. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505>.
63. Dowd KA, DeMaso CR, Pelc RS, Speer SD, Smith AR, Goo L, Platt DJ, Mascola JR, Graham BS, Mulligan MJ, Diamond MS, Ledgerwood JE, Pierson TC. 2016. Broadly neutralizing activity of Zika virus-immune sera identifies a single viral serotype. *Cell Rep* 16:1485–1491. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.049>.
64. Fonseca BP, Marques CF, Nascimento LD, Mello MB, Silva LB, Rubim NM, Foti L, Silva ED, Ferreira AG, Krieger MA. 2011. Development of a multiplex bead-based assay for detection of hepatitis C virus. *Clin Vaccine Immunol* 18:802–806. <https://doi.org/10.1128/CVI.00265-10>.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que:

- A infecção pelo ZIKV na gestação não prejudica a transferência materno-fetal de anticorpos IgG. Anticorpos IgG maternos, contra ZIKV e DENV, e aqueles elicitados por vacinas, como a de Hepatite B, Rubéola, *Haemophilus Influenzae* tipo B, difteria, coqueluche e tétano, são eficientemente transferidos ao feto na gestação, mesmo após uma infecção pelo ZIKV.
- O ZIKV pode estar presente no leite materno do pós parto, até 4 meses após uma infecção ocorrida na gestação. Apesar desse achado, não observamos evidências de transmissão aos recém nascidos, através da amamentação, e, portanto, nada que contrarie as recomendações da OMS. Devido a persistência do vírus nesse espécime clínico chamamos a atenção para o potencial papel da mama na manutenção e excreção de vírus. Além disso, levantamos a plausibilidade de testar o leite materno, coletado nos dias seguintes ao parto, como espécime adicional para o diagnóstico de ZIKV, principalmente nos casos em que a infecção ocorreu a partir do segundo trimestre de gestação.
- Crianças expostas ao ZIKV no período pré-natal, que não apresentaram microcefalia ao nascimento, apresentam maior prevalência de anormalidades no encéfalo, detectados através de exames de imagem como TC e USTF. Apesar disso, as crianças expostas ao ZIKV no período pré-natal, demonstraram desenvolvimento cognitivo normal nos primeiros 2 anos e meio de vida, sem atrasos, em relação às crianças não-expostas ao ZIKV.
- Antígenos recombinantes da proteína de envelope do ZIKV Z-EDIII e EDI, apresentam potencial para utilização no diagnóstico sorológico tardio de ZIKV, em plataformas simples, e conferindo especificidade suficiente para sobrepor as limitações dos testes sorológicos atuais, que são as reações cruzadas com outros flavivírus como o Dengue.

8 ASPECTOS ÉTICOS E SUPORTE FINANCEIRO

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUCAM e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob número 52841716.0.0000.5071. As participantes só foram incluídas no estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todas as amostras coletadas foram identificadas com um código específico do estudo, de forma a garantir a confidencialidade dos dados dos participantes. Além disso, durante toda a execução desse estudo, foi proporcionado aos voluntários da pesquisa, assistência médica e laboratorial de qualidade.

O projeto foi financiado de julho de 2016 a junho de 2018 pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - FAPES (306/2016 - 74910132/16) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, através da concessão da bolsa de doutorado (Código de Financiamento 001). Também, obtivemos apoio técnico e envio de reagentes pelo Instituto de Vacinas da Universidade Duke (Duke Human Vaccine Institute - DHVI) através da colaboração estabelecida entre o NDI e a Duke University. Além das instituições mencionadas, ainda contamos com a colaboração da Unidade de Pesquisa Médica Naval dos Estados Unidos da América, no Peru (NAMRU-6), através do apoio para realização das técnicas de isolamento viral em cultura de células.

9 REFERÊNCIAS

AYLLÓN, T. et al. **Early evidence for zika virus circulation among aedes aegypti mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil** *Emerging Infectious Diseases*, 2017.

BARBEITO-ANDRÉS, J. et al. Congenital Zika Syndrome is associated with maternal protein malnutrition. v. 6, n. January, p. 1–12, 2020.

BARBI, L. et al. **Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2018.

BARDINA, S. V. et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. **Science**, 2017.

BEARCROFT, W. G. . Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 5, p. 438–441, 1956.

BLOHM, G. M. et al. Complete genome sequences of identical Zika virus isolates in a nursing mother and her infant. **Genome Announcements**, 2017.

BRADY, O. J. et al. The association between zika virus infection and microcephaly in brazil 2015–2017: An observational analysis of over 4 million births. **PLoS Medicine**, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde **Ministério divulga boletim epidemiológico sobre microcefalia**. 2015a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/20929-ministerio-divulga-boletim-epidemiologico-sobre-microcefalia>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia**. 2015b . Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>>. Acesso em: 1 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico nº36 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45, 2015**. v. 46, p. 1–9, 2015c.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC)**. [s.l: s.n.].

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.

CAGNO, V. et al. Growth of Zika virus in human reconstituted respiratory, intestinal, vaginal and neural tissues. **Clinical Microbiology and Infection**, 2019.

CALISHER, C. H. et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 1, p. 37–43, 1989.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.

CAPUTE, A. J.; ACCARDO, P. J. The infant neurodevelopmental assessment: A clinical interpretive manual for CAT-CLAMS in the first two years of life, part 1. **Current Problems in Pediatrics**, v. 26, n. 7, p. 238–

257, 1996.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. **The Lancet**, 2016.

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. **Zika Virus**. 2020a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/index.html>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. **Zika Virus. Clinical Evaluation & Disease**. 2020b Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/preparing-for-zika/clinicalevaluationdisease.html>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. **Zika Virus. Prevention and Transmission**. 2020c. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/prevention/index.html>>.

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. **Testing for Zika Virus Infections**. 2020d Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/laboratories/types-of-tests.html>>. Acesso em: 12 abr. 2020.

CDC. **Congenital Zika Syndrome & Other Birth Defects**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html>>. Acesso em: 26 abr. 2020.

CHANG, H.-H. et al. Systematic analysis of protein identity between Zika virus and other arthropod-borne viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, 2017.

CHARLES, A. S.; CHRISTOFFERSON, R. C. Utility of a Dengue-Derived Monoclonal Antibody to Enhance Zika Infection In Vitro. **PLoS Currents**, 2016.

COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. **Zika virus-reigniting the TORCH***Nature Reviews Microbiology*, 2016.

DE ARAÚJO, T. V. B. et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. March, 2017.

DE M. CAMPOS, R. et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 77, p. 69–70, 1 abr. 2016.

DE PAULA FREITAS, B. et al. **Zika virus and the eye***Current Opinion in Ophthalmology*, 2017.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DOS SANTOS, A. P. B. **Notificações por Zika nos anos de 2016 a 2018**. Comunicação pessoal. em 03 out. 2018.

DUDLEY, D. M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature Communications**, 2016.

DUDLEY, D. M. et al. Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates. **Nature Medicine**, v. 24, n. 8, p. 1104–1107, 2018.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. **Infectious Zika viral particles in breastmilk***The Lancet*, 2016.

ESPÍRITO SANTO. **SESA - Saúde divulga dados de zika e microcefalia (25/11/2015)**. Disponível em: <<https://saude.es.gov.br/Notícia/secretaria-de-estado-da-saude-divulga-numero-de-casos-de-zika>>. Acesso em: 10 out. 2020.

ESPÍRITO SANTO. **Boletim Epidemiológico – no. 1 - 2016 Dengue, Chikungunya e Zika - Semana 13 - 2016**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://mosquito.saude.es.gov.br/Media/dengue/BoletimEpidemiologico/BoletimEpidDengue_01_2016_Final.pdf>.

ESPÍRITO SANTO. **Sesa divulga boletim de casos de zika (SE 1 a SE 52, 2018)**. [s.l: s.n.].

ESPÍRITO SANTO. **Sesa divulga 52 boletim de casos de zika (SE 01 a SE 52, 2019)**. [s.l: s.n.].

FAIZAN, M. I. et al. **Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism***Intervirology*, 2017.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FELIX, A. C. et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. **Journal of Medical Virology**, 2017.

FONSECA, K. et al. Case report: First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2014.

FONTAINE, A. et al. **Duration of Zika Viremia in Serum***Clinical Infectious Diseases*, 2018.

FOUDA, G. G. et al. The Impact of IgG Transplacental Transfer on Early Life Immunity. **ImmunoHorizons**, 2018.

FURTADO, J. M. et al. **Uveitis associated with zika virus infection** **New England Journal of Medicine**, 2016.

GARCEZ, P. et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **WOS**, 2016.

GIOVANETTI, M. et al. Genetic evidence of Zika virus in mother's breast milk and body fluids of a newborn with severe congenital defects. **Clinical Microbiology and Infection**, 2018.

GOURINAT, A.-C. et al. Detection of Zika virus in urine. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–6, jan. 2015.

GOVERO, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, 2016.

GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. et al. **Vector-borne transmission and evolution of Zika virus** **Nature Ecology and Evolution**, 2019.

HABY, M. M. et al. **Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: A systematic review** **Bulletin of the World Health Organization**, 2018.

HADLOCK, F. Ultrasound evaluation of fetal growth. In: CALLEN, P. W. (Ed.). . **Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology**. Philadelphia: W.B Saunders, 1994. p. 129–143.

HALSTEAD, S. B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–18, 2014.

HALSTEAD, S. B.; ROHANASUPHOT, S.; SANGKAWIBHA, N. Original antigenic sin in dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 1, p. 154–156, 1983.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells.

Journal of Virology, 2015.

HARRISON, S. C. **Immunogenic cross-talk between dengue and Zika viruses***Nature Immunology*, 2016.

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

HONEIN, M. A. et al. Birth Defects Among Fetuses and Infants of US Women With Evidence of Possible Zika Virus Infection During Pregnancy. **JAMA**, v. 317, n. 1, p. 59, 2017.

HUBERT, M. et al. Productive infection of mouse mammary glands and human mammary epithelial cells by Zika Virus. **Viruses**, 2019.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Espírito Santo**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/panorama>>. Acesso em: 19 out. 2020.

JOGUET, G. et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, 2017.

JOHANSSON, M. A. et al. **Zika and the risk of microcephaly***New England Journal of Medicine*, 2016.

JOHNSON, B. W. et al. West Nile Virus Infection and Serologic Response Among Persons Previously Vaccinated Against Yellow Fever and Japanese Encephalitis Viruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 2, p. 137–145, 2005.

KATZELNICK, L. C. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, 2017.

KLIKS, S. C. et al. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1988.

KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, 2016.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–9, ago. 2008.

LANGERAK, T. et al. **The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis** **PLoS Pathogens**, 2019.

MACHADO, C. R. et al. Is Pregnancy Associated with Severe Dengue? A Review of Data from the Rio de Janeiro Surveillance Information System. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2013.

MARTINES, R. B. et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 898–904, 2016.

MASSAD, E. et al. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 11, p. 2303–2312, 2017.

MEAD, P. S. et al. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 15, p. 1377–1385, 2018.

MEANEY-DELMAN, D. et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. **Obstetrics and Gynecology**, v. 128, n. 4, p. 724–730, 2016.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. **Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism** **Cell Host and Microbe**, 2017.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The New**

England journal of medicine, n. 374, p. 951–958, 10 fev. 2016.

MOORE, C. A. et al. **Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians***JAMA Pediatrics*, 2017.

MORO, L. et al. Malaria and HIV infection in mozambican pregnant women are associated with reduced transfer of antimalarial antibodies to their newborns. **Journal of Infectious Diseases**, 2015.

MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887, 2015.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 68, p. 53–5, 1 jul. 2015.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. **Clinical Microbiology and Infection**, 2017.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O595–O596, 2014.

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

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 9, p. 7–9, 2014.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, 5 jan. 2016.

PASSEMARD, S.; KAINDL, A. M.; VERLOES, A. Microcephaly. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 111p. 129–141.

PASSOS, S. R. L. et al. Detection of Zika virus in April 2013 patient samples, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 2017.

PAZ-BAILEY, G. et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 13, p. 1234–1243, 2017.

PETERSEN, L. R. et al. **Zika Virus** **New England Journal of Medicine**, 2016.

PIPER, M. C. et al. Construction and validation of the Alberta Infant Motor Scale (AIMS). **Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique**, v. 83 Suppl 2, p. S46-50, 1992.

PLATT, D. J.; MINER, J. J. Consequences of congenital Zika virus infection. **Current Opinion in Virology**, p. 1–7, 2017.

PREMKUMAR, L. et al. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 3, p. e01504-17, 2018.

PRISANT, N. et al. **Zika virus genital tract shedding in infected women of childbearing age** **Clinical Infectious Diseases**, 2017.

PRIYAMVADA, L. et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2016.

RABE, I. B. et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 21, p. 543–546, 2016.

REY, F. A. et al. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. **EMBO reports**, 2018.

RICE, M. E. et al. Vital Signs: Zika-Associated Birth Defects and Neurodevelopmental Abnormalities Possibly Associated with Congenital Zika Virus Infection — U.S. Territories and Freely Associated States, 2018. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, n. 31, p. 858–867, 2018.

ROSENBERG, A. Z. et al. Placental pathology of zika virus: Viral infection of the placenta induces villous stromal macrophage (Hofbauer Cell) proliferation and hyperplasia. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 2017.

ROZÉ, B. et al. Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barré syndrome on Martinique, January 2016. **Eurosurveillance**, 2016.

RUNGE-RANZINGER, S. et al. **Zika transmission patterns: a meta-review** **Tropical Medicine and International Health**, 2019.

SATTERFIELD-NASH, A. et al. Health and Development at Age 19–24 Months of 19 Children Who Were Born with Microcephaly and Laboratory Evidence of Congenital Zika Virus Infection During the 2015 Zika Virus Outbreak — Brazil, 2017. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 49, p. 1347–1351, 2017.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 339–348, 1964.

SLON CAMPOS, J. L.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. R. **The immune response against flaviviruses** **Nature Immunology**, 2018.

SOTELO, J. R. et al. Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 5,

p. 856–857, 2017.

STASSEN, L. et al. **Zika virus in the male reproductive tract***Viruses*, 2018.

SUN, J. et al. **Presence of Zika virus in conjunctival fluid.** *JAMA Ophthalmology*, 2016.

TABATA, T. et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host and Microbe**, 2016.

TAN, J. J. L. et al. Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. **Scientific Reports**, 2017.

TANG, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, 2016.

VALENTINE, M. J.; MURDOCK, C. C.; KELLY, P. J. **Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates.** *Parasites and Vectors*, 2019.

VAN DER EIJK, A. A. et al. **Miscarriage associated with Zika virus infection***New England Journal of Medicine*, 2016.

VILLAR, J. et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9946, p. 857–68, 6 set. 2014.

WANG, L. et al. **From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus***Cell Host and Microbe*, 2016.

WEAVER, S. C. et al. **Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control***Antiviral Research*, 2016.

WHO. **Guideline: Infant Feeding in Areas of Zika Virus Transmission.** [s.l.] WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2016.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. First published report of Zika virus infection in people: Simpson, not MacNamara. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 15–17, 2017.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.