



PROJETO DE PESQUISA

COORTE CLÍNICA DE CRIANÇAS COM MICROCEFALIA EM PERNAMBUCO

MICROCEPHALY EPIDEMIC RESEARCH GROUP – MERG

RECIFE - 2015

Contexto do estudo: Entre agosto e outubro de 2015 o Ministério da Saúde do Brasil identificou um aumento notável de casos de microcefalia inicialmente no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil. Até o dia 28 de novembro de 2015, já haviam sido notificados 1.248 casos suspeitos de microcefalia em 311 municípios de 14 unidades federais brasileiras. O maior número de casos foi registrado em Pernambuco com identificação de 646 casos suspeitos de microcefalia a partir de do início de 2015, seguido dos estados de Paraíba (248 casos) e Rio Grande do Norte (79 casos). No dia 10 de novembro 2015 o Ministério da Saúde decretou Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional para dar maior agilidade às investigações. No final de novembro um grupo de pesquisadores da Universidade de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco e do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz-PE formou o grupo MERG (Microcephaly Epidemic Research Group), para, juntamente com pesquisadores e profissionais da assistência de diversas unidades hospitalares e com apoio do Ministério da Saúde e de Secretarias do Estado de Pernambuco e do Município de Recife, formular e desenvolver projetos de pesquisa relacionados a este tema.

Objetivo primário: caracterizar o quadro clínico e descrever o crescimento e desenvolvimento geral, odontológico e neurocognitivo nos primeiros dois anos de vida de uma coorte de crianças identificadas com microcefalia na epidemia observada em Pernambuco a partir de agosto de 2015. **Objetivo secundário:** caracterizar o quadro clínico e descrever o crescimento e desenvolvimento geral, odontológico e neurocognitivo nos primeiros dois anos de vida de uma coorte de crianças consideradas “borderline”: com perímetro cefálico (PC) entre 32 e 33cm sem alterações no sistema nervoso central (SNC) na ultrassonografia transfontanela (USG-TF) basal e cujas mães tiveram história de rash ou crianças com PC entre 32 e 33 com calcificações no SNC detectados pela ultrassonografia transfontanela (USG-TF) basal.

Métodos

Desenho de estudo e definições de expostos e não expostos (controles): Estudo de **coorte clínica**. O **grupo de expostos** será composto por crianças nascidas com microcefalia definida como: perímetro cefálico (PC) ≤ 32 cm para aqueles nascidos com 37 a 42 semanas de idade gestacional (IG) ou PC \leq percentil 3 (2 desvios padrão) na curva de crescimento de Fenton e com alterações tomográficas compatíveis com infecção congênita do SNC. O **grupo controle** será composto por crianças nascidas com perímetro cefálico normal para a IG e sem alterações USG-TF realizado após o nascimento. O grupo de crianças consideradas borderline será composto por aquelas com PC entre 32 e 33cm sem alterações no SNC na USG-TF basal e cujas mães tiveram história de rash ou crianças com PC entre 32 e 33 com calcificações no SNC detectados pela USG-TF basal. Este grupo será considerado à parte, para fins de análise.

Para avaliação da microcefalia, a idade gestacional do RN será obtida a partir de USG, realizada no primeiro trimestre (de preferência entre a 8^a e 14^a semana); como segunda opção a data do início da última menstruação (DUM) registrada no cartão da gestante ou

informada pela mulher e, finalmente, a partir de USG realizada em qualquer outro momento da gravidez.

População, local do estudo e coleta de informação e amostras: As crianças serão acompanhadas no Serviço Pediátrico de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (DIP Infantil/HUOC-UPE). Os recém-nascidos considerados casos (com microcefalia) no estudo caso controle, que está sendo desenvolvido em Pernambuco pelo MERG e já tem financiamento garantido pela OPAS/MS-Brasil, serão incorporados para a coorte de seguimento e assim os mesmos exames serão considerados para avaliação basal. Desta forma, as seguintes informações obtidas a partir de exame clínico, laboratorial e de imagem farão parte da avaliação basal: exame clínico, incluindo exame ao nascer e dados do parto, avaliação do neuropediatra, exames laboratoriais para investigar anemia e outras alterações hematológicas, função renal e comprometimento hepático: Hemograma, TGO, TGP, ureia, creatinina. Exames para detectar outras infecções congênicas (coinfecção) e/ou afastar a hipótese de outras possíveis causas de microcefalia: VDRL, sorologias para TORCHES (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus-CMV, herpes vírus e sífilis) e Zikavírus-ZikV, Chikungunya-ChikV, Dengue-DenV, Parvovírus B19. As sorologias devem ser pareadas com exames maternos, coletados no mesmo momento. PCR no sangue do cordão umbilical para ZikV, ChikV, DenV, toxoplasmose e CMV; PCR no LCR para ZikV, ChikV, DenV e PCR na urina para CMV. Tomografia computadorizada (TC) de crânio para identificar calcificações e avaliação dos possíveis danos neurológicos. Ecocardiograma transtorácico (ECO-TT) e USG de abdome total, para investigar outras malformações congênicas. No final do segundo ano de seguimento os casos farão ressonância nuclear magnética (RM), para uma avaliação final do SNC no momento em que, nas crianças normais, ocorre o final do processo de mielinização.

Outros exames que serão acrescidos à investigação basal e que não constam no estudo caso controle: Eletroencefalograma (EEG) para avaliar a atividade elétrica cerebral basal do RN e investigar a presença de focos epileptogênicos. Avaliação oftalmológica com exames complementares (retcan, OCT e USG ocular). Avaliação otológica será feita numa subamostra de 90 crianças com o teste BERA.

Coleta de material biológico e exames de imagem serão realizados para expostos e controles ou grupos de comparação seguindo os respectivos procedimentos operacionais padrões (POP) incluindo armazenamento de materiais biológicos para testes posteriores.

Seguimento da coorte: Para os casos em que houver positividade de exames sorológicos na avaliação basal – VDRL e toxoplasmose - pode ser necessário o acompanhamento seriado de sorologia na criança, para esclarecer o diagnóstico de coinfecção ou para indicar tratamento específico. Em caso de positividade para CMV na criança, o exame deve ser repetido a cada 2 meses até sua negatificação. O EEG será repetido em mais duas ocasiões ao longo do acompanhamento. As crianças farão também uma avaliação diagnóstica e acompanhamento odontológico nos primeiros meses de vida.

Retornos de acompanhamento para reavaliação para casos e controles saudáveis:

Depois da avaliação basal ao nascer, as crianças serão revistas aos 3, 6, 12, 18 e 24 meses de idade para coleta de diversas informações de interesse para seu seguimento, que estão detalhadas na Figura 1.

Figura 1. Intervalos entre as reavaliações e atividades/exames programados para serem feitos a cada momento.

3m	6m	12m
consulta com infectopediatra e neuropediatra. Avaliar o crescimento (medidas antropométricas) e desenvolvimento geral e das funções neurológicas e investigar o surgimento de convulsões e outras complicações. EEG. Hemograma, TGO, TGP, uréia e creatinina. Avaliação oftalmológica: Retcan, USG ocular, OCT. Avaliação otológica: teste de EOA e BERA	consulta com odontopediatra, infectopediatra e neuropediatra. Avaliar crescimento (medidas antropométricas) e desenvolvimento geral, odontológico e das funções neurológicas e investigar surgimento de convulsões e outras complicações. Avaliação do desenvolvimento neurocognitivo.	consulta com infectopediatra e neuropediatra: avaliar crescimento (medidas antropométricas) e desenvolvimento geral e das funções neurológicas e investigar surgimento de convulsões e outras complicações. Avaliação do desenvolvimento neurocognitivo. EEG. Hemograma, TGO, TGP, uréia e creatinina. Ecocardiograma transtorácico.
18m	24m	
consulta com infectopediatra, odontopediatra e neuropediatra: avaliar crescimento (medidas antropométricas) e desenvolvimento geral e das funções neurológicas e surgimento de convulsões e outras complicações. Sorologias para ChikV, ZikV, DenV nos casos de sorologia positiva ao nascimento*.	consulta com infectopediatra, odontopediatra e neuropediatra: avaliar crescimento (medidas antropométricas) e desenvolvimento e das funções neurológicas e surgimento de convulsões e outras complicações. Avaliação do desenvolvimento neurocognitivo. EEG. Hemograma, TGO, TGP, uréia e creatinina. RNM.	

*A repetição de exames sorológicos só estará indicada para as crianças que tiverem exames positivos na avaliação basal, para definição diagnóstica pelo acompanhamento seriado.

A coorte de casos será útil para descrever a dinâmica evolutiva da síndrome clínica recém-diagnosticada e o surgimento de novos sintomas e complicações, considerando diversos possíveis desfechos. Para fins de comparação de grupos serão considerados como desfechos principais: o perímetro cefálico, comprometimento visual, comprometimento auditivo, epilepsia e número de hospitalizações e letalidade.

Tamanho de amostra: Para calcular a amostra e estimar a frequência de desfechos entre casos com significância de 5%, considerou-se as proporções esperadas dos seguintes os desfechos: letalidade (4%), microcefalia (97%), retardo do desenvolvimento neuropsicomotor (70%), comprometimento visual (60%), comprometimento auditivo (40%), epilepsia (80%), admitindo-se um erro que variou de 3 a 10%. O maior tamanho de amostra foi de 124 casos para a variável microcefalia. Assumimos uma amostra total de 150 casos.

Um **grupo controle** de 60 crianças será recrutado para verificação da frequência desses desfechos em crianças sem microcefalia. Para fins de análise comparativa serão excluídos da coorte as crianças com diagnóstico de infecção para as causas conhecidas de microcefalia. Para permitir que a avaliação do desenvolvimento neuropsicomotor

leve em conta diferenças nas intervenções eventualmente adotadas para a coorte de casos, serão registradas em questionário todas as intervenções voltadas para a estimulação precoce ou tardia, com fisioterapia, fonoaudiologia, etc. O grupo controle será avaliado quanto aos seguintes desfechos: crescimento, avaliado pelas medidas antropométricas e desenvolvimento neurocognitivo, avaliado por testes específicos.

Entrada de dados: a entrada de dados será feita em uma plataforma que incluirá um banco de dados estruturado; máscara para coleta de dados em tablete, quando possível, mecanismos para entrada automática de dados, e para acompanhamento do campo, incluindo recrutamento de expostos, controles e grupo de comparação; fluxo dos questionários e materiais coletados e exames e entrada de resultados.

Estratégia de análise: inicialmente será feita uma caracterização clínica detalhada dos casos de microcefalia com descrição do fenótipo característico da síndrome clínica de infecção congênita sob investigação: perímetro cefálico, proporção crânio-facial, presença e evolução da paquigiria, proeminência da protuberância occipital, alterações das funções neurológicas: presença ou não de irritabilidade, como se comportam os reflexos, tônus muscular, função auditiva e visual (reflexo cócleo-palpebral, fixação do olhar, seguir com o olhar), presença ou não de nistagmo. Será feita uma descrição do exame físico geral, focando também a descrição de outras malformações. Para a investigação de outras malformações internas serão utilizadas USG e Ecocardiografia. Esta caracterização também incluirá uma descrição das alterações encontradas nos exames de EEG e de imagem do SNC e de abdômen e tórax. Serão descritos também os padrões laboratoriais encontrados para diagnóstico de infecção congênita para todos os agentes etiológicos investigados no estudo, incluindo os padrões de coinfeção. Esses parâmetros serão acompanhados em reavaliações periódicas para o estabelecimento e caracterização do quadro evolutivo dessa síndrome. No final do período de acompanhamento será realizada a RNM dos casos para avaliar a conformação do SNC das crianças com microcefalia congênita no momento em que, nas crianças normais, ocorre o final do processo de mielinização. Alguns desfechos terão suas frequências comparadas no grupo de casos e de controles.

Considerações éticas: O projeto será submetido ao CONEP para avaliação em caráter emergencial tendo-se em vista a gravidade e necessidade de respostas rápidas para a epidemia de Microcefalia congênita e a transcendência social do agravo. Apesar deste caráter emergencial, o projeto seguirá todos os procedimentos éticos recomendados para este tipo de estudo pela Resolução MS/CNS 466/2012. Será solicitado consentimento livre e esclarecido para todas as mães ou para os responsáveis legais das crianças. A maioria dos exames e procedimentos de investigação está em alinhamento com o Protocolo Clínico e Epidemiológico Microcefalia da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES), elaborado em conjunto com os especialistas principais hospitalares de referência para atendimento de microcefalia e instituído na rotina de atendimento de rotina das crianças. Procedimentos invasivos nos recém-nascidos (RN) e crianças serão evitados ou minimizados pela adoção de estratégias como coleta de sangue de cordão umbilical no momento do parto. Na investigação das alterações do SNC será utilizado o

método que exponha o RN ao menor risco possível, considerando a indicação clínica como prioridade. Assim, para a escolha do método exame de imagem do sistema nervoso central, a equipe de pesquisa, juntamente com os especialistas, optou pela TC por ser mais rápida e de mais fácil execução, em relação à RNM e esta indicação não é por motivo de pesquisa e sim para a assistência aos casos. Para os casos, assumiu-se que o risco de exposição à radiação inerente a este exame é suplantado pelos potenciais benefícios advindos da correta avaliação inicial dos RN, considerando o fato de tratar-se de uma nova síndrome clínica e a necessidade de um exame de imagem para diagnosticar as malformações, avaliar o grau de comprometimento e a ocorrência de suposta infecção do SNC, geralmente sinalizada pela presença de calcificações. Para não expor os controles ao exame de TC, a imagem do SNC para esta população será obtida com USG-TF, que embora não seja o método de escolha para investigar calcificações no SNC de RN, é considerada uma alternativa adequada, de baixo risco e sem exposição à radiação. No final do período de acompanhamento dos casos será realizada uma RNM, considerando a necessidade de avaliar a conformação do SNC das crianças com microcefalia congênita no momento em que, nas crianças normais, ocorre o final do processo de mielinização. Mesmo considerando os potenciais riscos do procedimento e a necessidade de sedação dessas crianças para sua realização, este risco é inferior àquele observado entre RNs e está justificado pelo potencial benefício que as informações advindas do exame de imagem possam trazer para a avaliação do prognóstico e para o acompanhamento dessas crianças. O exame do líquido cefalorraquidiano tem sido também indicado pelos médicos que acompanham os RN com microcefalia e está no protocolo da SES-PE para assistência aos casos, como parte da investigação diagnóstica e o mesmo procedimento de coleta laboratorial atenderá as necessidades de obtenção de material para pesquisa. Trata-se de um procedimento com potencial risco de acidente com lesão de estruturas no SNC, embora este risco seja baixo, quando o procedimento é executado por especialista experiente. O protocolo de pesquisa prevê a contratação de profissional habilitado e experiente para todas as coletas de líquido cefalorraquidiano, que atenderão também as demandas da equipe assistencial. O eletroencefalograma (EEG) foi acrescentado ao protocolo de investigação basal do RN pela equipe de pesquisa, por sugestão dos neuropediatras envolvidos na assistência aos casos, para avaliar a atividade elétrica do cérebro, e para investigar a presença de focos epileptogênicos em outros momentos do seguimento da coorte. O exame será realizado com a criança preferencialmente naturalmente adormecida e, apenas excepcionalmente, com sedação, caso necessário. Nessas situações haverá assistência especializada a fim de minimizar os riscos de depressão inerentes ao procedimento, embora estes sejam baixos.

Considerações sobre o orçamento: O orçamento apresentado nesta proposta de projeto contempla o seguimento dos casos de microcefalia nos meses 3, 6, 12, 18, e 24. A maior parte da avaliação basal já tem financiamento garantido, uma vez que os casos serão os mesmos do estudo caso controle, conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa. Um financiamento internacional parcial, para parte dos exames de seguimento da coorte, correspondente a £38.400,00 já foi obtido junto à Wellcome Trust. Alguns exames apresentados na tabela de acompanhamento não correspondem ao número total de

pacientes previsto na amostra, uma vez que só serão feitos em casos especiais (sorologias e biologia molecular). Como contrapartida, os exames como Hemograma, TGO, TGP, uréia e creatinina, serão de responsabilidade do serviço aonde as crianças serão acompanhadas. As avaliações pediátricas e dos especialistas também serão feitas nas unidades de referências por profissionais habilitados e pertencentes ao quadro dos hospitais envolvidos no estudo. Os testes sorológicos serão feitos no Laboratório Central da Secretaria Estadual de Saúde (LACEN) e no Laboratório de Virologia do Centro de pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE, referência para pesquisa em Dengue e Zika. Será solicitado financiamento adicional para os custos com a avaliação dos controles.

Equipe responsável pela elaboração do projeto:

Celina Maria Turchi Martelli - PhD, MD, Pesquisadora Visitante CPqAM/Fiocruz-PE, Bolsa PQ CNPq Nível 1C, Epidemiologia de Doenças Infecciosas.

Laura Cunha Rodrigues - PhD, pesquisadora convidada do CPqAM/Fiocruz-PE e professora de Epidemiologia de Doenças Infecciosas - University of London/NP.

Demócrito de Barros Miranda Filho - PhD, professor de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Bolsa PQ CNPq Nível 2. FCM/UPE.

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes - PhD, professora de Epidemiologia de Doenças Infecciosas, Bolsa PQ CNPq Nível 1B. UFPE.

Thália Velho Barreto de Araújo - PhD, professora de Epidemiologia. Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva, UFPE. Pesquisadora na área de saúde reprodutiva.

Maria Cynthia Braga - PhD, MD, Bolsa PQ CNPq Nível 1C, Pediatra e Epidemiologia de Doenças Infecciosas. CPqAM/Fiocruz-PE

Maria de Fatima P. Militão de Albuquerque - PhD, pesquisadora, Epidemiologia de Doenças Infecciosas, Bolsa PQ CNPq Nível 1D. CPqAM/Fiocruz-PE

Wayner Vieira Souza - PhD, pesquisador, Bolsa PQ CNPq Nível 1C. CPqAM/Fiocruz-PE.

Ernesto Torres Marques - PhD, pesquisador sênior e professor Universidade Pittsburg/USA. Vacinologia, Biologia molecular, Imunologia Molecular. CPqAM/Fiocruz-PE

Maria Angela Wanderley Rocha Mestre em Medicina Tropical UFPE, Médica infectologista pediátrica, professora. Chefe do setor de infectologia pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz FCM/UPE.

Regina Coeli Ferreira Ramos - Mestrado em Ciências da Saúde UPE, Médica infectologista pediátrica. Coordenadora do ambulatório de referência de microcefalia HUOC/UPE.

Com a participação de representantes da Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco – e do prof. Sinval Pinto Brandão Filho PhD, diretor do CPqAM/Fiocruz-PE, Bolsista de Produtividade em Pesquisa (PQ) CNPq Nível 2.

Referências Bibliográficas:

1. John CC, Carabin H, Montano SM, Bangirana P, Zunt JR, Peterson PK. Global research priorities for infections that affect the nervous system. *Nature*. 2015;527:S178-86.
2. Brazilian Ministry of Health. Epidemiological bulletin with zikaV data [in Portuguese]. 2015. Available in <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-zika>>.
3. Zanluca C, de Melo VCA, Mosimann ALP, dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:569-572.
4. Brazilian Ministry of Health. Ministry of Health confirms relationship between Zika virus and microcephaly [in Portuguese]. 2015. Available in <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/21016-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>>.
5. Brazilian Ministry of Health. Protocol for monitoring and response to microcephaly occurrence relating to ZikaV infection [in Portuguese]. 2015. Available in <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/09/Microcefalia---Protocolo-de-vigil--ncia-e-resposta---vers--o-1----09dez2015-8h.pdf>>.
6. Pan American Health Organization. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. *Epidemiological Alert*. 2015. Available in <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32405&lang=en>.
7. Brazilian Ministry of Health. Epidemiological Bulletin. Ministry of Health updated microcephaly numbers related to ZikaV [in Portuguese]. 2015. Available in <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21254-ministerio-da-saude-atualiza-numeros-de-microcefalia-relacionados-ao-zika>>.
8. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastère S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*. 2014;19(9):pii=20720.
9. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*. 2014;19(13):pii=20751.
10. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Microcephaly in Brazil potentially linked to the Zika virus epidemic. 2015. Available in <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-microcephaly-Brazil-rapid-risk-assessment-Nov-2015.pdf>>.

11. Besnard M, Mallet HR. Increase of cerebral congenital malformations among newborns and fetus in French Polynesia, 2014-2015, following a Zika virus outbreak. 2015. Available in <https://app.box.com/s/ptvqdagwr10m3ag849rv59c5iditco7>.
12. Fenton TR. A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda's chart updated with recent data and a new format. *BMC Pediatr.* 2003;3:13.
13. Fenton TR, Kim JH. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatrics.* 2013;13:59.
14. Pereira AP, Leal MC, da Gama SG, Domingues RM, Schilithz AO, Bastos MH. Determining gestational age based on information from the Birth in Brazil study. *Cad Saude Publica.* 2014;30:S1-12.
15. Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH Infections. *Clin Perinatol.* 2015;42:77-103.
16. Stutterd CA, Leventer RJ. Polymicrogyria: A common and heterogeneous malformation of cortical development. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2014;166:227-239.
17. Fenton and Kim: A systematic review and metaanalysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatrics* 2013 13:59. doi:10.1186/1471-2431-13-59.
18. Snijders RJ, Nicolaides KH. Fetal biometry at 14-40 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1994;4: 34-48.
19. ECLAMC - Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênicas. Manual Operacional, Rio de Janeiro, 2009.
20. Wacholder S, Silverman DT, Mclaughlin JK, Mandel JS. Selection of Controls in Case-Control Studies II: Types of Controls. *American Journal of Epidemiology* 1982; 135 (9): 1029-1041.