

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM
PACIENTES COM A SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ EM
RIBEIRÃO PRETO – SP**

TALINE MONTEIRO KLEIN

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM PACIENTES COM A
SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ EM RIBEIRÃO PRETO – SP**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada para
obtenção do Título de Doutora em Ciências
Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada
Orientada: Taline Monteiro Klein
Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto

2019

Klein, Taline Monteiro.

CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM
PACIENTES COM A SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ EM
RIBEIRÃO PRETO – SP.

Ribeirão Preto, 2019.

80p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia Básica
e Aplicada.

Orientador: Fonseca, Benedito Antonio Lopes

1. Síndrome de Guillain-Barré; 2. Infecção pelo ZIKV; 3.
PIDA; 4. Dissociação albuminocitológica; 5. Isolamento do
ZIKV no LCR

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Taline Monteiro Klein

INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM PACIENTES COM A SÍNDROME DE
GUILLAIN-BARRÉ

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
Básica e Aplicada para obtenção do Título de
Doutora em Ciências

Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes
da Fonseca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de Doutorado aos pacientes com a Síndrome de Guillain-Barré, para que as informações dessa pesquisa possam se unir a outras mais e formar bases mais sólidas que direcionem a etiologia da síndrome, o manejo e a melhor qualidade de vida desses pacientes.

AGRADECIMENTOS

Sempre e em primeiro lugar agradeço a Deus pela oportunidade de trilhar este caminho até o fim. Por ser suporte nos momentos onde não enxerguei chão, por ser luz quando me senti no escuro, por ser força quando me senti exausta. Por me fazer crer que juntos somos mais, e que pequenas contribuições se somam e formam uma rede que pode atuar na vida de muitos.

Agradeço eternamente aos meus pais que sempre me apoiaram em meus sonhos, projetos e me deram suporte para finalizar essa etapa da minha vida. Que acreditam em mim, do jeito que sou, e que me ensinaram a importância de se preocupar com o outro, e o que você pode fazer hoje, com o que você tem nas mãos para melhorar o mundo de alguma forma.

Meu agradecimento muito especial ao meu noivo Thales, pelo companheirismo, cumplicidade, por acreditar em minha capacidade, ser meu apoio nos momentos complicados, pela amizade fiel e por sempre dar leveza nesses momentos finais da trajetória do meu doutoramento.

Agradeço ao meu orientador, Benedito Fonseca, pela oportunidade de estar sob sua orientação, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, e pelo conhecimento transmitido ao longo dos 7 anos que permaneci no Laboratório de Virologia Molecular. Obrigada Chefe!

Agradeço enormemente a Luiza, minha coorientadora de coração, que me auxiliou cientificamente em vários momentos da minha vida acadêmica, e neste trabalho, e em tantos momentos incontáveis dessa caminhada! Sempre com disponibilidade para transmitir conhecimento, ajudar a todos, com paciência, bondade e amizade. Você foi essencial para mim nesse processo Lu! Muito obrigada.

Agradeço também ao Daniel que prontamente me auxiliou nos momentos importantes como processo de seleção, qualificação e agora com a análise de resultados importantes desta tese.

Agradeço aos meus queridos amigos do Laboratório de Virologia Molecular, Flávia, Beatriz, Mayara, Vitor, Márcio e Danillo por tornarem esses sete anos da minha vida momentos que guardarei sempre em meu coração. Agradeço a amizade de cada um, pelas experiências trocadas, aprendizados, que de fato também me fizeram chegar até o fim.

Agradeço ao Centro de Pesquisa em Virologia e todos os seus funcionários pelo acolhimento, pelo suporte científico, acadêmico e amistoso.

Agradeço a minha banca avaliadora por ter aceitado contribuir com o meu trabalho, partilhar seus conhecimentos e informações e agregar mais em minha vida científica.

EPÍGRAFE

“Construímos muros demais e pontes de menos.”

Isaac Newton

Então proponho eu, a construção de mais pontes que possam unir conhecimentos, boas ideias e ações efetivas.

RESUMO

Klein, T. M. **Caracterização da Infecção pelo Vírus Zika em Pacientes com a Síndrome de Guillain-Barré em Ribeirão Preto – SP.** 2019. 80f. Tese. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A Síndrome de Guillain-Barré é uma doença neurológica caracterizada como uma polirradiculoneuropatia inflamatória aguda imunomediada, que é desencadeada por uma infecção prévia. As manifestações clínicas geralmente se apresentam com formigamento, fraqueza progressiva, paralisia ascendente geralmente simétrica, arreflexia, disfunção autonômica e dor. Manifestações mais graves como o acometimento da musculatura respiratória podem ocorrer, e cerca de 3% dos pacientes vem a óbito. A incidência a SGB teve um aumento de 20 vezes na Polinésia Francesa durante a epidemia de ZIKV relatada em 2013-2014. Em Ribeirão Preto observou-se um aumento de 3,5 vezes dessa incidência em 2016, comparado aos três anos anteriores. Dessa forma, objetivo do presente trabalho foi investigar e caracterizar a infecção pelo ZIKV em pacientes diagnosticados com a SGB tratados no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – SP. A pesquisa contou com a participação de 75 pacientes, e 42 casos apresentaram manifestações neurológicas, sendo que 31 foram diagnosticados com a SGB. Amostras clínicas de plasma, soro, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR) foram coletadas e testadas quanto a presença do ZIKV por qRT-PCR em tempo real. Os resultados demonstraram a detecção do ZIKV em 22 dos 31 pacientes com a SGB (70,9%), revelando uma alta incidência da infecção nos casos da síndrome em Ribeirão Preto, e a média de tempo de detecção do ZIKV nesses pacientes foi de 55 dias, sendo que em um dos pacientes o vírus foi detectado até 186 dias após a primeira detecção. A maior porcentagem de detecção do ZIKV foi na urina com cerca de 56% dos resultados positivos dentre todos os materiais coletados, corroborando com dados da literatura. O LCR também apresentou uma alta porcentagem de detecção (53%). A detecção do ZIKV foi obtida em todas as amostras coletadas do único caso de óbito relacionado a SGB registrado. Dentre os 22 casos de infecção pelo ZIKV, a maior parte deles teve o diagnóstico de PIDA com quadro de dissociação albuminocitológica. Dos 22 pacientes infectados, oito apresentaram anticorpos neutralizantes anti-ZIKV pelo ensaio de PRNT50. Um paciente negativo para a detecção do ZIKV foi positivo para anticorpos neutralizantes. Além da caracterização da cinética do vírus em cada paciente, foi possível obter dois isolados virais, do soro e do LCR de dois pacientes diferentes, demonstrando a presença do ZIKV no SNC dos pacientes com a SGB e sua viabilidade. Os isolados foram submetidos ao sequenciamento completo de seu genoma viral. O presente trabalho é de grande relevância para a contribuição de maior conhecimento científico sobre o ZIKV como possível gatilho para o desenvolvimento da SGB, como o ZIKV se comporta nesses pacientes, por quanto tempo persistem nesse caso de uma neuropatia inflamatória aguda imunomediada, e como se comportam esses pacientes frente a uma manifestação neurológica rara, possivelmente induzida pela infecção pelo ZIKV.

Palavras-chave: 1. Síndrome de Guillain-Barré; 2. ZIKV; 3. PIDA; 4. Dissociação albuminocitológica; 5. Isolamento do ZIKV no LCR

ABSTRACT

Klein, T. M. **Investigation of Zika Virus Infection in Patients with Guillain-Barré Syndrome.** 2019. 80f. Tesis. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Guillain-Barré Syndrome is a neurologic disease that is characterized as an immunomediated acute inflammatory polyradiculoneuropathy, that is triggered by a previous infection. The clinical manifestations usually present with tingling, progressive weakness, ascending paralysis frequently simetric, arreflexia, autonomic disfunction and pain. More serious manifestations as the respiratory muscle involvement can occur, and about 3% of the patients come to death. GBS incidence increased 20 times in French Polynesia during ZIKV epidemic in 2013-2014. In Ribeirão Preto, it was observed an increase of 3,5 times of this incidence in 2016, when compared with the last three years. Thus, the aim of this study was to investigate and characterize ZIKV infection in patients diagnosed with GBS followed up at the Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto – SP. The research had the participation of 75 patients, and 42 presented neurologic manifestations, 31 of whom were diagnosed with GBS. Clinical samples of plasm, serum, urine and CSF were collected and tested for the presence of ZIKV by real time qRT-PCR. Our results demonstrated ZIKV detection in 22 of 31 GBS patients (70,9%), revealing a high incidence of this infection in this syndrome at Ribeirão Preto, and the mean detection time of ZIKV in these patients was 55 days, and in one of the patients the virus was detected up to 186 days after the first detection. The highest percentage of ZIKV detection was in urine with about 56% of the positive results among all the materials collected, corroborating with data from the literature. CSF also presented a high percentage of detection (53%). Among the 22 cases of ZIKV infection, most of them had the diagnosis of PIDA with albumin-cytologic dissociation, and eight presented anti-ZIKV neutralizing antibodies using PRNT50 assay. A negative patient for ZIKV detection was positive for anti-ZIKV neutralizing antibodies. In addition to the characterization of virus kinetics in each patient, it was possible to obtain two viral isolates, from the serum and CSF of two different patients, demonstrating the presence of ZIKV in the CNS of patients with GBS and its viability. The isolates were submitted to complete genome sequencing. Our study is of great relevance for the contribution of greater scientific knowledge about ZIKV as a possible trigger for the development of GBS, as ZIKV behaves in these patients, for how long they persist in this case of acute immune-mediated inflammatory neuropathy, and how such patients are confronted with a rare neurological manifestation, possibly induced by ZIKV infection.

Keywords: 1. Guillain-Barré Syndrome; 2. ZIKV; 3. PIDA; 4. Albumin-citologic dissociation; 5. ZIKV isolation from CSF

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** PAÍSES ONDE A INFECÇÃO PELO ZIKV FOI DETECTADA EM HUMANOS E A CRONOLOGIA DOS SURTOS OCORRIDOS (12)..... 3
- FIGURA 2.** CASOS REPORTADOS SEMANALMENTE DE INFECÇÃO PELO ZIKV E DE SGB EM SEIS PAÍSES DIFERENTES, E NO BRASIL NO ESTADO DA BAHIA. MODIFICADO DE SANTOS T., ET AL, 2016 (15).
..... 4
- FIGURA 3.** ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO ZIKV. O ZIKV POSSUI COMO MATERIAL GENÉTICO UMA FITA DE RNA DE POLARIDADE POSITIVA QUE CODIFICA PARA UMA ÚNICA POLIPROTEÍNA, A QUAL É CLIVADA EM TRÊS ESTRUTURAIS E SETE NÃO ESTRUTURAIS. FIGURA MODIFICADA DA REF. 5
- FIGURA 4.** MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS. A MAIORIA DAS INFECÇÕES POR ZIKV É ASSINTOMÁTICA. ENTRE OS CASOS SINTOMÁTICOS, A MAIORIA DOS PACIENTES DESENVOLVE UMA DOENÇA CARACTERIZADA POR FEBRE, ERUPÇÃO CUTÂNEA, CONJUNTIVITE, DORES DE CABEÇA E DORES MUSCULARES E/OU ARTICULARES. DURANTE A GRAVIDEZ, A INFECÇÃO POR ZIKV PODE RESULTAR EM MICROCEFALIA, SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKV (CZS) E MORTE FETAL. EM UM SUBGRUPO DE ADULTOS, A INFECÇÃO ESTÁ LIGADA À SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ, QUE PODE RESULTAR EM FRAQUEZA MUSCULAR E PARALISIA. MODIFICADO DE PIERSON T. C., ET AL, 2018 (39)..... 7
- FIGURA 5.** PADRÕES DE FRAQUEZA NA SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ (GBS) E SÍNDROME DE MILLER FISHER E SEUS SUBTIPOS. A GBS E SMF E SUBTIPOS FORMAM UM CONTINUUM DE SÍNDROMES DISCRETAS E SOBREPOSTAS. ÁREAS SOMBREADAS INDICAM PADRÕES DE FRAQUEZA. O CONTOURO DUPLO (DESFOQUE DAS FIGURAS) INDICA A PRESENÇA DE ATAXIA. 'ZZZZ' INDICA HIPERSOMNOLÊNCIA. O PADRÃO DE FRAQUEZA PARA CADA SUBTIPO É O SEGUINTE: GBS CLÁSSICO: TETRAPARESIA COM OU SEM ENVOLVIMENTO DO NERVO MOTOR CRANIANO; SGB PARAPARÉTICO: MEMBROS INFERIORES; FRAQUEZA FARÍNGEO-CERVICAL-BRAQUIAL: BULBAR, PESCOÇO E MEMBROS SUPERIORES; FRAQUEZA BIFACIAL COM PARESTESIAS: FACIAL; SÍNDROME DE MILLER FISHER: OFTALMOPLÉGIA EXTERNA; ENCEFALITE DO TRONCO ENCEFÁLICO DE BICKERSTAFF: OFTALMOPLÉGIA EXTERNA. A FRAQUEZA FACIAL E O ENVOLVIMENTO DOS NERVOS CRANIANOS MOTORES SÃO MAIS FREQUENTES NA SGB CLÁSSICA DO TIPO DESMIELINIZANTE (POLIRRADICULONEUROPATIA DESMIELINIZANTE INFLAMATÓRIA AGUDA) DO QUE NO TIPO AXONAL (NEUROPATIA AXONAL MOTORA). NA SÍNDROME DE MILLER FISHER, HÁ ATAXIA E, EM SEU SUBTIPO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, A ENCEFALITE DO TRONCO ENCEFÁLICO DE BICKERSTAFF, HÁ HIPERSOMNOLÊNCIA ADICIONAL. MODIFICADO DE WAKERLEY B., ET AL, 2014 (64)..... 9

FIGURA 6. COMPREENSÃO ATUAL DA PATOGÊNESE DA SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ E VARIANTES CLÍNICAS. NA SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ DESMIELINIZANTE, ANTÍGENOS INEQUÍVOCOS AINDA PRECISAM SER IDENTIFICADOS, MAS SÃO INFERIDOS PELA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO, DESTRUÇÃO DA MIELINA E LIMPEZA POR MACRÓFAGOS. NAS VARIANTES AXONAL E DE MILLER FISHER, OS GANGLIOSÍDIOS ESPECÍFICOS (GM1, GD1A, GQ1B) SÃO ALVOS DE IMUNOGLOBULINAS E PARTILHAM EPÍTOPOS ANTIGÊNICOS COM VÁRIOS ANTÍGENOS BACTERIANOS E VIRAIS. ESSES ALVOS ANTIGÊNICOS ESTÃO NAS ESTRUTURAS NODAIS, NAS RAÍZES E LOCALIZADOS NOS ÓRGÃOS FINAIS. NA SÍNDROME DE MILLER FISHER, O ANTÍGENO GQ1B TAMBÉM EXISTE DENTRO DO TRONCO CEREBRAL. NESTA VARIANTE, OS MACRÓFAGOS FAGOCITAM OS DETRITOS DO AXÔNIO E ENTRAM PELOS NÓS. MODIFICADO DE WIJCKS E. F. M., ET AL, 2017 (62)..... 12

FIGURA 7. GRÁFICO REPRESENTATIVO DA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB COLETADAS, E A PORCENTAGEM DA POSITIVIDADE PARA A DETECÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV DENTRE ELAS. O CÍRCULO TOTAL REPRESENTA A TOTALIDADE DE 219 AMOSTRAS DENTRE PLASMA (VERMELHO), SORO (ALARANJADO), URINA (AMARELO), LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (AZUL) E NEGATIVAS (CINZA). AS PORCENTAGENS E NÚMEROS REPRESENTAM A QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS PARA O ZIKV. 35

FIGURA 8. GRÁFICO DEMONSTRANDO A QUANTIFICAÇÃO DO RNA DO ZIKV NAS AMOSTRAS TOTAIS DE PLASMA, SORO, URINA E LCR DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB. O ONE-WAY ANOVA KRUSKAL WALLIS FOI APLICADO PARA AVALIAR A SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS DIFERENÇAS DAS MEDIANAS DAS CARGAS VIRAIS EM CADA MATERIAL COLETADO. NÃO SE OBSERVOU DIFERENÇA ESTATÍSTICA ($P > 0,05$). A CARGA VIRAL FOI QUANTIFICADA UTILIZANDO-SE UMA CURVA PADRÃO DE PFU, OS RESULTADOS FORAM TRANSFORMADOS PARA EQUIVALENTE DE PFU E ESTÃO REPRESENTADOS EM LOG_{10} 37

FIGURA 9. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS COLETADAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB. A). QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB AVALIADOS PELOS SINTOMAS PRÉVIOS RELATADOS. B). QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB AVALIADOS PELA CLASSIFICAÇÃO DA SGB. O TESTE ANOVA ONE WAY KRUSKAL WALLIS FOI APLICADO PARA AVALIAR A SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS MEDIANAS DAS CARGAS VIRAIS ENTRE OS GRUPOS. A CARGA VIRAL FOI QUANTIFICADA UTILIZANDO-SE UMA CURVA PADRÃO DE PFU, E DESSA FORMA OS RESULTADOS FORAM TRANSFORMADOS PARA EQUIVALENTE DE PFU E ESTÃO REPRESENTADOS EM LOG_{10} . $P \leq 0,05$ *, $P \leq 0,001$ **. 37

FIGURA 10. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES SUBDIVIDIDOS DE ACORDO COM OS SINTOMAS PRÉVIOS A

SGB A) NO PLASMA, B) NO SORO, C) NA URINA E D) NO LCR O TESTE ANOVA ONE WAY KRUSKAL WALLIS E O TESTE T FORAM APLICADOS PARA AVALIAR A SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS MEDIANAS DAS CARGAS VIRAIS ENTRE OS GRUPOS. A CARGA VIRAL FOI QUANTIFICADA UTILIZANDO-SE UMA CURVA PADRÃO DE PFU, E DESSA FORMA OS RESULTADOS FORAM TRANSFORMADOS PARA EQUIVALENTE DE PFU E ESTÃO REPRESENTADOS EM LOG₁₀. P ≤ 0,05 *, P ≤ 0,001 **. 39

FIGURA 11. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES SUBDIVIDIDOS DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DA SGB A) NO PLASMA, B) NO SORO, C) NA URINA E D) NO LCR O TESTE ANOVA ONE WAY KRUSKAL WALLIS E O TESTE T FORAM APLICADOS PARA AVALIAR A SIGNIFICÂNCIA ENTRE AS MEDIANAS DAS CARGAS VIRAIS ENTRE OS GRUPOS. A CARGA VIRAL FOI QUANTIFICADA UTILIZANDO-SE UMA CURVA PADRÃO DE PFU, E DESSA FORMA OS RESULTADOS FORAM TRANSFORMADOS PARA EQUIVALENTE DE PFU E ESTÃO REPRESENTADOS EM LOG₁₀. P ≤ 0,05 *, P ≤ 0,001 **. 40

FIGURA 12. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB QUE OBTIVERAM DOIS PERÍODOS DE COLETAS. EM A) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P1, P11, P44, P47 E P53. EM B) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO SORO DOS PACIENTES P1, P11, P44, P47 E P53. EM C) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NA URINA DOS PACIENTES P1, P11, P44, P47 E P53. EM D) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P1, P11, P44, P47 E P53. CADA PERÍODO DE COLETA É REPRESENTADO POR UM SÍMBOLO..... 42

FIGURA 13. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB QUE OBTIVERAM QUATRO PERÍODOS DE COLETAS. EM A) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P3, P6, P54 E P60. EM B) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO SORO DOS PACIENTES P3, P6, P54 E P60. EM C) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NA URINA DOS PACIENTES P3, P6, P54 E P60. EM D) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P3, P6, P54 E P60. CADA PERÍODO DE COLETA É REPRESENTADO POR UM SÍMBOLO. 43

FIGURA 14. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB QUE OBTIVERAM QUATRO PERÍODOS DE COLETAS. EM A) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P3, P6, P54 E P60. EM B) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO SORO DOS PACIENTES P3, P6, P54 E P60. EM C) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NA URINA DOS PACIENTES P3, P6, P54 E P60. EM D) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P3, P6, P54 E P60. CADA PERÍODO DE COLETA É REPRESENTADO POR UM SÍMBOLO. 43

FIGURA 15. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB QUE OBTIVERAM CINCO

PERÍODOS DE COLETAS. EM A) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P4, P57 E P58. EM B) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO SORO DOS PACIENTES P4, P57 E P58. EM C) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NA URINA DOS PACIENTES P4, P57 E P58. EM D) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P4, P57 E P58. CADA PERÍODO DE COLETA É REPRESENTADO POR UM SÍMBOLO. 44

FIGURA 16. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA GENÔMICO DO ZIKV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB QUE OBTIVERAM SEIS PERÍODOS DE COLETAS. EM A) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P55 E P56. EM B) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO SORO DOS PACIENTES P55 E P56. EM C) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NA URINA DOS PACIENTES P55 E P56. EM D) ENCONTRA-SE A QUANTIFICAÇÃO DO ZIKV NO PLASMA DOS PACIENTES P55 E P56. CADA PERÍODO DE COLETA É REPRESENTADO POR UM SÍMBOLO. 45

FIGURA 17. ENSAIO DE QRT-PCR EM TEMPO REAL DOS INÓCULOS 27S E 44L. A). CURVA-PADRÃO DO ZIKV EM EQUIVALENTE DE PFU UTILIZADA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL. B). PLOT DE AMPLIFICAÇÃO DO INÓCULO 27S APENAS NA 3ª DO ISOLADO EM CULTURA CELULAR. C). PLOT DE AMPLIFICAÇÃO DO INÓCULO 44L NAS 2ª E 3ª PASSAGEM DO ISOLADO EM CULTURA CELULAR. CT: CYCLE THRESHOLD; #: N° DE PASSAGENS. 47

FIGURA 18. IMAGENS DOS PFUS REALIZADOS PARA AS TITULAÇÕES DOS ISOLADOS VIRAIS 27S E 44L. C- REPRESENTA O CONTROLE NEGATIVO DO TESTE, NO QUAL NÃO HÁ ADIÇÃO DE AMOSTRA VIRAL. AS DILUIÇÕES REALIZADAS PARA SE OBTIVER O ESGOTAMENTO DO EFEITO CITOPÁTICO PARA POSSIBILITAR A QUANTIFICAÇÃO ESTÃO ACIMA DE CADA POÇO EM QUE HOUVE FORMAÇÃO DE PLACA. 48

FIGURA 19. ARVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS VIRAIS 27S E 44L CONSTRUÍDAS A PARTIR DE SEQUENCIAS DO GENOMA COMPLETO. 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DO RNA DO ZIKV POR RT-PCR EM TEMPO REAL.	16
TABELA 2. RELAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DO ZIKV.	20
TABELA 3. LISTA DAS SEQUÊNCIAS DO ZIKV OBTIDAS NA BASE DE DADOS DO GENBANK.	22
TABELA 4. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES.	26
TABELA 5. EXAMES REALIZADOS PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS INFECCIOSOS NOS PACIENTES. ...	26
TABELA 6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB.	29
TABELA 7. CLASSIFICAÇÃO DO SUBTIPO DA SGB EM 23 PACIENTES.	30
TABELA 8. SINTOMAS E/OU EVENTOS RECENTES ANTERIORES A SGB RELATADOS PELOS PACIENTES.	31
TABELA 9. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS PACIENTES QUE APRESENTARAM DOENÇA FEBRIL EXANTEMÁTICA PRÉVIA - 12 PACIENTES.	32
TABELA 10. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS PACIENTES QUE APRESENTARAM QUADRO DIARREICO PRÉVIO - 8 PACIENTES.	32
TABELA 11. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS PACIENTES QUE APRESENTARAM QUADRO SEMELHANTE A GRIPE - 3 PACIENTES.	33
TABELA 12. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS PACIENTES QUE RELATARAM VACINAÇÃO RECENTE - 3 PACIENTES.	33
TABELA 13. CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS NOS PACIENTES SEM SINTOMAS PRÉVIOS (ASSINTOMÁTICOS) - 6 PACIENTES.	34
TABELA 14. CARACTERÍSTICAS DE TODOS OS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB.	35
TABELA 15. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SGB COM MAIS DE UM PERÍODO DE COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS E COM DETECÇÃO DO RNA DO ZIKV.	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. O vírus Zika	2
1.1.1. Histórico.....	2
1.1.2.1. Aspectos biológicos do ZIKV	4
1.1.2.2. Aspectos clínicos da infecção pelo ZIKV	6
2.1. A Síndrome de Guillain-Barré	8
2.1.1 Epidemiologia.....	9
2.1.2. Mecanismos propostos para a imunopatogenese da SGB	10
2.1.3. Diagnóstico da SGB.....	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Produção do estoque viral e quantificação.....	13
2.2. Pacientes e amostras clínicas	14
2.3. Coleta de dados epidemiológicos dos pacientes	15
2.4. Detecção do material genético do ZIKV em amostras clínicas	16
2.5. Detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV nas amostras clínicas por PRNT (<i>Plaque Reduction Neutralizing Test</i>)	17
2.6. Isolamento do ZIKV a partir das amostras clínicas	18
3.7. Sequenciamento dos isolados virais.....	19
3.10. Análises estatísticas dos resultados obtidos	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Caracterização das amostras clínicas	25
4.2. Detecção do ZIKV nas amostras clínicas	34
4.2. Isolamento do ZIKV em amostras clínicas	46
4.3. Análise das sequencias nucleotídicas dos isolados virais	48
4.4. Detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV	49
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O vírus Zika

1.1.1. Histórico

O vírus Zika (ZIKV) é um membro da família Flaviviridae pertencente ao gênero *Flavivirus*, e foi isolado pela primeira vez no ano de 1947 na floresta de Ziika em Uganda, no leste da África. O isolamento foi feito a partir de um macaco sentinela de um estudo para a febre amarela (1). Subsequentemente as fontes epidemiológicas indicam que o vírus se disseminou pela região da África subsaariana e sudeste da Ásia. O primeiro caso de infecção humana pelo ZIKV foi descrito na Nigéria em 1953 (2). Contudo, a infecção por esse vírus foi bastante subnotificada, ou diagnosticada erroneamente como casos de infecção pelo vírus Dengue, por compartilharem manifestações clínicas bastante similares e sorologia cruzada. Dessa forma, o vírus se disseminou silenciosamente pela África e Ásia com pouco menos de 20 casos confirmados em 60 anos.

O surto causado pelo ZIKV em 2007 na ilha de Yap nos Estados Federados da Micronésia, deu início ao panorama atual dessa arbovirose no mundo. Foram notificados 5000 casos de infecção pelo vírus em um total de 6700 habitantes (3). Seis anos mais tarde uma grande epidemia ocorreu na Polinésia Francesa situada no Pacífico Sul em 2013 e 2014 sendo 32000 casos notificados (4), seguida de pequenos surtos posteriores em outras ilhas vizinhas (1).

O ZIKV foi introduzido no Brasil provavelmente entre os anos de 2013 e 2015 pela rota do Pacífico, e o primeiro surto foi registrado em março de 2015 no estado da Bahia (5,6). Acredita-se que em Salvador a epidemia tenha começado em fevereiro e prolongou-se até meados de julho de 2015 (8). O ZIKV se espalhou por praticamente todo o território nacional, e em dezembro de 2015 o Ministério da Saúde divulgou que havia mais de 1,3 milhões de casos de infecção pelo ZIKV suspeitos no Brasil (7). Em setembro do mesmo ano pesquisadores no Brasil notaram um aumento no número de casos de recém-nascidos apresentando microcefalia e outras malformações nas mesmas regiões onde o vírus foi detectado pela primeira vez, e em fevereiro de 2016 mais de 4300 casos de microcefalia foram notificados (9). Os primeiros isolamentos do ZIKV foram provenientes do líquido amniótico de dois fetos que nasceram com malformações neurológicas graves, confirmando a transmissão do vírus via placenta (35), e logo em seguida a relação do ZIKV às malformações congênicas foi confirmada (36-38).

Em outubro de 2015 a Colômbia notificou a primeira transmissão autóctone do ZIKV fora do Brasil, e em março de 2016 o país registrou cerca de 50.000 casos suspeitos de infecção pelo vírus (10,11,12). O ZIKV se espalhou por pelo menos 33 países e territórios das Américas (11,12).

Apesar da circulação do ZIKV ter sido notificada na África há 60 anos atrás, e na Ásia há 50 anos, casos da infecção relacionados a sintomatologia grave da doença (como a microcefalia e a Síndrome de Guillain-Barré) só foram descritos a partir dos surtos na Polinésia Francesa e no Brasil (1).

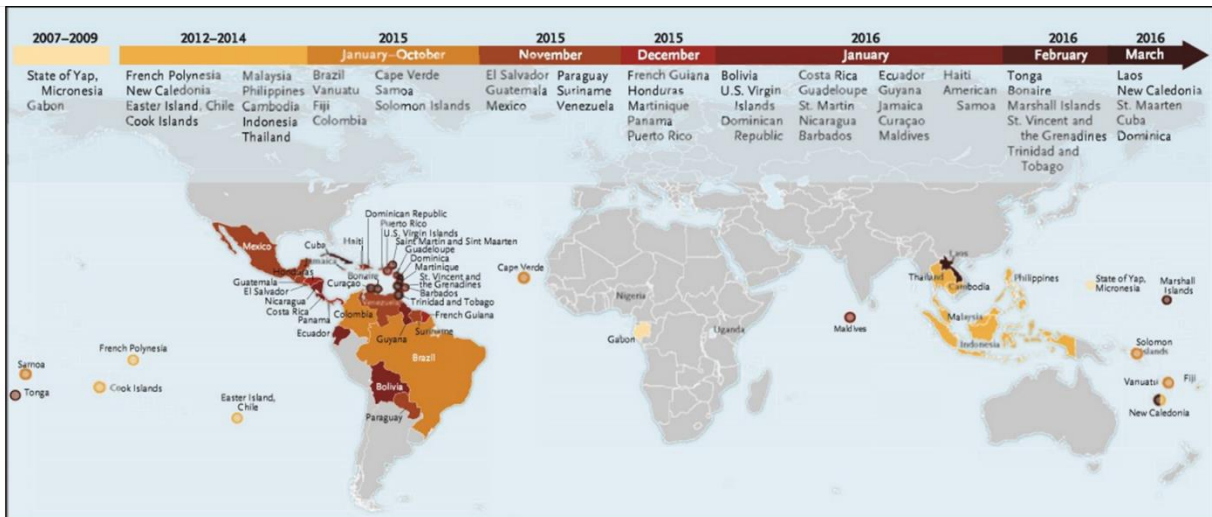


Figura 1. Países onde a infecção pelo ZIKV foi detectada em humanos e a cronologia dos surtos ocorridos (12).

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) associada à infecção pelo ZIKV foi confirmada pela primeira vez através de uma pesquisa de caso-controle realizada na Polinésia Francesa em 2016 (13), que demonstrou um aumento de 20 vezes no número de casos da síndrome no mesmo período da epidemia pelo Zika. No Brasil, um aumento de 80% no número de casos da síndrome foi observado na região Nordeste do país na primeira metade de 2015 coincidindo com a epidemia do ZIKV na mesma época e região (14). Países das Américas como Venezuela e Colômbia também registraram aumento significativo nesses números após registrarem as primeiras epidemias do ZIKV em seus territórios (13,15,16). No período de 1 de abril de 2015 a 31 de março de 2016 foram registrados um total de 1474 casos da SGB na Bahia, Colômbia, República Dominicana, El Salvador, Honduras, Suriname e Venezuela. Um estudo publicado em outubro de 2016 no qual realizou análises multivariadas da incidência do número de casos de infecção pelo ZIKV e da incidência de casos da SGB em diferentes países da América Latina (15), demonstrou que durante as semanas de transmissão do ZIKV, houve um aumento significativo na incidência da síndrome, em comparação à incidência basal pré-ZIKV, no estado da Bahia houve um aumento de 172% da SGB, na Colômbia de 211%, na República Dominicana de 150%, em El Salvador de 100%, em Honduras de 144%, no Suriname de 400% e na Venezuela de 877%. Em todos os países foi possível observar que o pico da infecção pelo ZIKV coincidiu com o pico do aumento do número de casos da SGB.

Número de casos de ZIKV e da SGB reportados semanalmente em 6 países da América Latina e no estado da Bahia no Brasil de 2015-2016

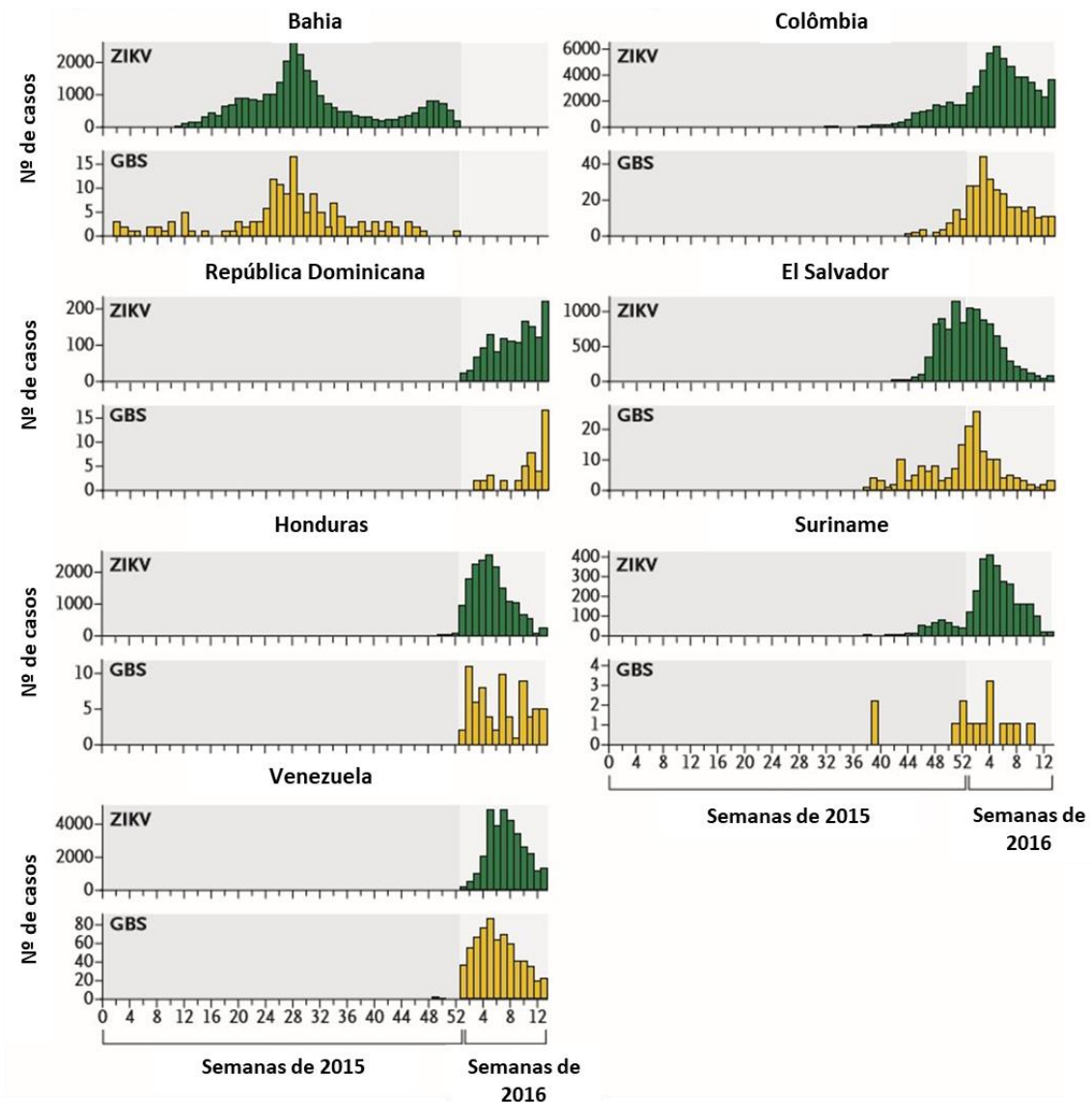


Figura 2. Casos reportados semanalmente de infecção pelo ZIKV e de SGB em seis países diferentes, e no Brasil no estado da Bahia. Modificado de Santos T., et al, 2016 (15).

1.1.2.1. Aspectos biológicos do ZIKV

O vírus Zika pertence ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), e apresenta as características que toda a sua família compartilha: presença de envelope viral e genoma constituído por RNA de fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 10.800 pares de base (10,8 kb). Seu material genético apresenta um único *frame* de leitura e codifica para uma única poliproteína que é então processada posteriormente por proteases virais e do hospedeiro dando origem a três proteínas estruturais (Capsídeo – C; pré-membrana – prM; e envelope – E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (39), sendo que essa última proteína apresenta funções essenciais para a

sobrevivência do ZIKV, como a realização da replicação do RNA viral, processamento da poliproteína viral e ainda a modulação da resposta imunológica do hospedeiro. As proteínas não-estruturais atuam no processo da replicação viral, processamento do material genético, bem como na evasão da resposta imunológica do hospedeiro.

A partícula viral do Zika é composta pelas três proteínas estruturais, o envelope lipídico e o RNA viral. A proteína E tem uma forma alongada e é formada por três ectodomínios. Grande parte dos isolados do ZIKV apresentam uma modificação na proteína E na posição E154 no domínio I (E-DI), e interessantemente, algumas cepas africanas pré-epidêmicas que não apresentavam essa modificação apresentaram menor comportamento neuro invasor (41). A proteína E, por estar bastante exposta na região do envelope viral é a mais antigênica dentre os flavivírus de uma maneira geral, e responsável pela adesão e entrada da partícula viral na célula hospedeira. O dobramento correto dessa proteína é controlado pela proteína prM, que por sua vez é clivada pela Furina, uma proteína da célula hospedeira, para dar origem a proteína de membrana na maturação viral (43).

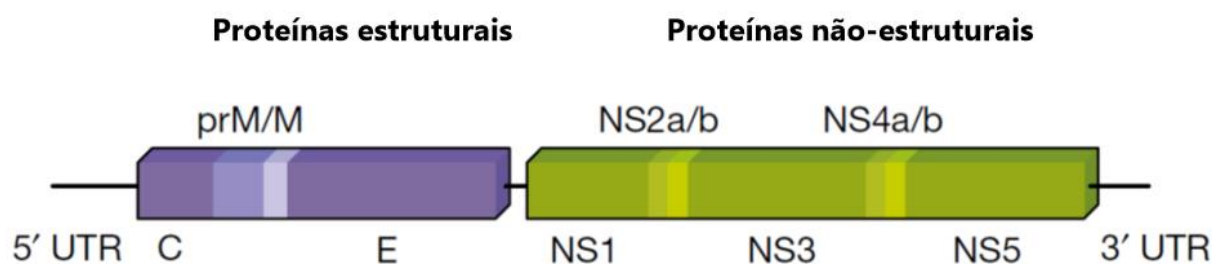


Figura 3. Esquema da organização do genoma do ZIKV. O ZIKV possui como material genético uma fita de RNA de polaridade positiva que codifica para uma única poliproteína, a qual é clivada em três estruturais e sete não estruturais. Figura modificada de Pierson T. C., et al, 2018 (39).

O ZIKV se subdivide em duas linhagens que se diferem a nível nucleotídico cerca de 10% uma da outra (42). A linhagem mais antiga isolada em 1947 é a Africana, e posteriormente surgiu a linhagem Asiática que foi detectada primeiramente nas Ilhas de Yap. Os isolados posteriores causadores dos surtos nas Américas são provenientes da linhagem Asiática.

Como esperado, o ZIKV compartilha sequencias similares com outros flavivírus como o vírus Spondweni com 68% de similaridade de aminoácidos na proteína E, e como o vírus Dengue com 50% similaridade de aminoácidos na mesma proteína (39). Dessa forma, a similaridade entre os vírus dessa família dificulta o desenvolvimento de testes diagnósticos específicos para identificar cada um deles.

A transmissão do ZIKV ocorre geralmente por picada de mosquitos infectados. Os dois principais ciclos de transmissão são o ciclo silvático, que se dá entre primatas não-humanos e mosquitos do gênero *Aedes* presentes nas regiões de floresta, e o ciclo urbano entre humanos tanto como reservatórios como hospedeiros e mosquitos antropofílicos do gênero *Aedes* como vetores. Estudos

demonstraram que o mosquito *Aedes aegypti* é o vetor mais eficiente na transmissão do ZIKV (44). Esse mesmo mosquito também transmite o vírus dengue, o vírus Chikungunya e o vírus da febre amarela. Outros trabalhos sugerem que mosquitos pertencentes a outros gêneros, principalmente o *Culex*, sabidamente transmissor do JEV (*Japanese Encephalitis Virus*) e o WNV (*West Nile Virus*), poderiam estar envolvidos também na transmissão do ZIKV (45,46), já que no período de 2007 a 2017 cerca de 84 países no mundo todo reportaram casos de infecção pelo Zika, não se restringindo apenas às regiões tropicais.

Além dessa via clássica de transmissão descrita para o ZIKV, outras vias têm sido reportadas. A transmissão sexual tem sido documentada desde 2008, quando pessoas morando em regiões não endêmicas tornaram-se infectadas após relação sexual com parceiros retornando recentemente dessas áreas (47,48). O ZIKV também pode ser transmitido pela via parenteral por transfusão sanguínea, com os primeiros casos documentados em 2014 na Polinésia Francesa (47), e no Brasil em 2016 (49). A transmissão materno-fetal do ZIKV também pode ocorrer e teve seu primeiro caso de transmissão perinatal reportado na Polinésia Francesa no ano de 2013 (50). O primeiro caso de transmissão intrauterina foi subsequentemente confirmado no Brasil durante o período de surto de 2016 (35,51).

O ZIKV já foi isolado de sangue total, sêmen, urina, líquido amniótico e leite materno (52-55), e geralmente pode ser detectado no sangue num período curto de 3 a 5 dias após o início dos sintomas, mas pode persistir por períodos mais longos na urina e no sêmen, sendo que no sêmen há registro de detecção do RNA viral por até 62 dias após a infecção (56).

1.1.2.2. Aspectos clínicos da infecção pelo ZIKV

Os sinais e sintomas mais comuns ou frequentes descritos na infecção pelo ZIKV nos países da América Latina e na Polinésia Francesa ocorreram em média dentro de 3 a 7 dias após a picada do mosquito transmissor, e incluíram febre em 72% dos casos, artralgia e mialgia em cerca de 65% dos casos, conjuntivite em 63% dos casos, cefaleia em 46% dos casos, fadiga e *rash* cutâneo (18).

Durante as epidemias mais recentes, como sabemos, a infecção pelo ZIKV também tem sido associada, embora com pouca frequência, a complicações graves em adultos, incluindo falência múltipla de órgãos (19), mielite transversa (40), meningite, encefalite (20), e trombocitopenia (21). Embora geralmente a infecção pelo ZIKV não esteja associada a casos de fatalidade, a mortalidade de pacientes tem sido descrita em indivíduos contendo outras comorbidades como observado em crianças com anemia falciforme, adultos com câncer (19), e em indivíduos que desenvolvem a SGB (22).

Uma característica bastante importante e marcante na infecção pelo ZIKV é o seu amplo tropismo por vários tipos celulares e órgãos e sua persistência no organismo. Dessa forma, novas manifestações clínicas são continuamente descobertas. Sabe-se que o ZIKV pode persistir no sangue total e em regiões conhecidas como santuários imunológicos. Em múltiplos casos foram reportadas a

detecção do RNA do ZIKV no sangue total de adultos num período que variou de 60 a 100 dias após a primeira detecção, apesar do soro e outros fluidos corporais apresentarem negatividade para ele (23,24).

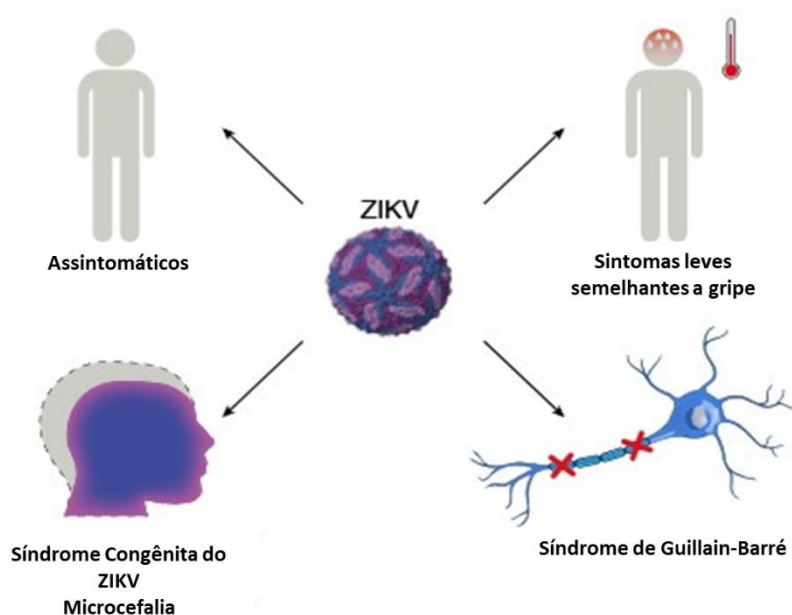


Figura 4. Manifestações clínicas. A maioria das infecções por ZIKV é assintomática. Entre os casos sintomáticos, a maioria dos pacientes desenvolve uma doença caracterizada por febre, erupção cutânea, conjuntivite, dores de cabeça e dores musculares e/ou articulares. Durante a gravidez, a infecção por ZIKV pode resultar em microcefalia, síndrome congênita do ZIKV (CZS) e morte fetal. Em um subgrupo de adultos, a infecção está ligada à síndrome de Guillain-Barré, que pode resultar em fraqueza muscular e paralisia. Modificado de Pierson T. C., et al, 2018 (39).

Estudos demonstraram que o ZIKV infecta principalmente monócitos do sangue na fase aguda da infecção (25), e podem se replicar de maneira persistente nas células que compõem a câmara posterior e anterior dos olhos, o que causa a conjuntivite, uveíte e, em alguns casos até a perda da visão (26,27,28). A persistência do vírus no olho foi detectada em camundongos e humanos por até 30 dias após a primeira detecção, e possivelmente pode ser também esta uma via de transmissão direta através de secreção ocular (28,29). O ZIKV pode ainda infectar e estabelecer persistência no trato reprodutivo masculino, com detecção de RNA viral no esperma e sêmen por até 28 meses, apesar de partículas virais infecciosas serem encontradas por apenas poucas semanas após o início da infecção (30). Casos de oligospermia e hemoespermia tem sido observado em humanos após a infecção pelo ZIKV e há casos de especulações de que o quadro pode afetar a fertilidade (31).

O acometimento do sistema nervoso central de fetos e neonatos na infecção pelo ZIKV é um dos principais fatores de gravidade para a saúde pública e objeto de pesquisas intensivas para a compreensão dos mecanismos que levam a esse quadro. A infecção durante a gravidez pode causar graves anomalias no feto, como calcificações no cérebro, microcefalia, ventriculomegalia, anormalidades no corpo caloso cerebral, hipoplasia cerebelar (32), danos na região ocular posterior (incluindo cicatrizes maculares, e mancha focal pigmentária da retina), artrogripose e hipertonia ou

movimento restrito do corpo logo após o nascimento (33). A esse conjunto de malformações foi dado o nome de Síndrome Congênita do vírus Zika (*Congenital Zika virus Syndrome - CZS*) no ano de 2017 por Alvarado M e Schwartz D. (34).

Além da CZN, ZIKV também tem sido relacionado ao desenvolvimento da SGB em adultos, apesar da relação causal ainda não ter sido comprovada. A SGB é uma polineuropatia inflamatória aguda imunomediada, que se apresenta tipicamente com sintomas como parestesia, fraqueza e dor, mas podendo progredir para casos graves de paralisia, comprometimento do sistema respiratório levando ao óbito (39).

A infecção pelo ZIKV parece induzir respostas inflamatórias sistêmicas no humano. Grande número de pacientes infectados sintomáticos apresentaram leucopenia caracterizada por monocitose, trombocitopenia, indução de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, MIP1 α), quimiocinas (IP-10 e RANTES) e citocinas que promovem ativação de linfócitos T de uma maneira geral (IL-2, IL-4, IL-9 e IL-17) (57). A infecção pelo ZIKV também induz uma produção de anticorpos anti-ZIKV amplamente neutralizantes como resposta humoral contra ambas as linhagens Asiática e Africana (58), sugerindo um único sorotipo. Interessantemente, outros anticorpos anti-flavivirus pré-existentes no indivíduo (como observado para DENV, YFV e WNV), podem reagir cruzadamente com o ZIKV, porém exibindo uma capacidade limitada de neutralização (sub neutralização). Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* sugerem que esses anticorpos sub neutralizantes podem aumentar a infecção pelo ZIKV no paciente, um fenômeno chamado *Antibody Dependent Enhancement (ADE)*, já bastante descrito e conhecido para os sorotipos do DENV (59-61). Um estudo utilizando-se modelo murino, foi realizada a transferência passiva de soro humano de pacientes convalescentes previamente infectados por DENV e WNV nesses animais que foram infectados pelo ZIKV, e observou-se um aumento da infecção e da gravidade da doença (60). Contudo, o impacto exato e o prognóstico dessas reatividades cruzadas de anticorpos anti-flavivírus previamente existentes com o ZIKV em humanos ainda precisa ser esclarecido.

2.1. A Síndrome de Guillain-Barré

A Síndrome de Guillain-Barré é uma doença que se apresenta como uma polirradiculoneuropatia inflamatória aguda imunomediada, tipicamente com formigamento, fraqueza progressiva, paralisia ascendente geralmente simétrica, arreflexia, disfunção autonômica e dor (62,63), e pode se manifestar em um espectro de variações.

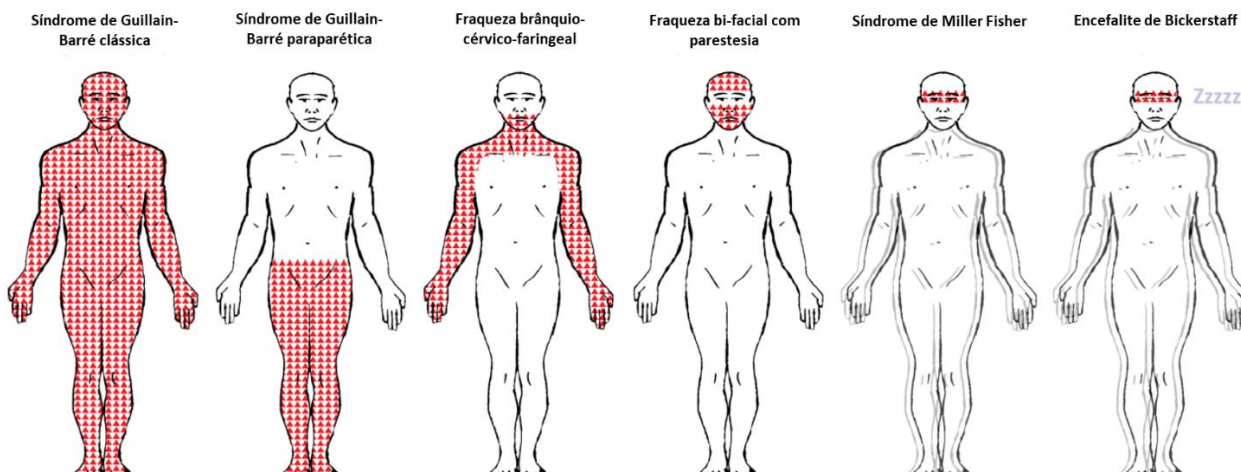


Figura 5. Padrões de fraqueza na síndrome de Guillain-Barré (GBS) e síndrome de Miller Fisher e seus subtipos. A GBS e SMF e subtipos formam um continuum de síndromes discretas e sobrepostas. Áreas sombreadas indicam padrões de fraqueza. O contorno duplo (desfoque das figuras) indica a presença de ataxia. 'Zzzzz' indica hipersonolência. O padrão de fraqueza para cada subtipo é o seguinte: GBS clássico: tetraparesia com ou sem envolvimento do nervo motor craniano; SGB paraparético: membros inferiores; Fraqueza faríngeo-cervical-braquial: bulbar, pescoço e membros superiores; Fraqueza bifacial com parestesias: facial; Síndrome de Miller Fisher: oftalmoplegia externa; Encefalite do tronco encefálico de Bickerstaff: oftalmoplegia externa. A fraqueza facial e o envolvimento dos nervos cranianos motores são mais frequentes na SGB clássica do tipo desmielinizante (polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda) do que no tipo axonal (neuropatia axonal motora). Na síndrome de Miller Fisher, há ataxia e, em seu subtipo do sistema nervoso central, a encefalite do tronco encefálico de Bickerstaff, há hipersonolência adicional. Modificado de Wakerley B., et al, 2014 (64).

Pacientes com a SGB clássica desenvolvem geralmente tetraparesia, apesar de existirem 3 subtipos da doença que a paralisia é localizada. Eles incluem a variante de fraqueza brânquio-cérvico-faríngeal da SGB (definida por fraqueza bulbar, cervical e dos membros superiores), a SGB paraparética (definida pela fraqueza bilateral dos membros inferiores), e a fraqueza bifacial com parestesia (caracterizada pela fraqueza facial bilateral e distúrbio sensorial do membro distal (64). Além dessas variações mais clássicas da SGB a Síndrome de Miller Fisher também é enquadrada dentro desse espectro, porém é caracterizada por oftalmoplegia, ataxia e arreflexia do tipo cerebelar na ausência de fraqueza nos membros. Os pacientes com envolvimento adicional da formação reticular, resultando em distúrbio da consciência, têm o subtipo do sistema nervoso central (SNC), conhecido como encefalite do tronco encefálico de Bickerstaff (65).

A SGB clássica pode ser subdividida ainda pela origem do dano do sistema nervoso. Quando há a presença de lesão na bainha de mielina dos nervos periféricos a doença é classificada como polineuropatia inflamatória aguda desmielinizante (*Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy – PIDA*). Contudo, se a origem da lesão diretamente nas regiões de membranas axonais dos neurônios a síndrome é caracterizada como neuropatia axonal motora aguda (*Acute Motor Axonal Neuropathy – AMAM*) (66).

2.1.1 Epidemiologia

A SGB é uma doença considerada rara, com uma baixa incidência populacional de 0,81-1,89 (mediana de 1,11) por 100.000 pessoas por ano, e apresenta uma ocorrência maior em pacientes do sexo

masculino e em idosos (sua incidência parece aumentar com a idade). Sua incidência mundial apresenta variações em cada região. No ano de 2009 o Brasil apresentava uma baixa incidência da doença com uma taxa de 0,40 para cada 100.000 pessoas por ano, em contraste no mesmo ano taxas altíssimas de 2,5 para cada 100.000 habitante por ano foram registradas para países como Curaçao e Bangladesh (67,68).

A proporção de pacientes com a SGB que desenvolveram a PIDA e a NAMA diferem bastante em diferentes regiões do mundo. A PIDA é o subtipo mais predominante na América do Norte e Europa (cerca de 60-80% dos pacientes), enquanto a NAMA tem maior incidência na Ásia, América Central e América do Sul (cerca de 30-65% dos pacientes) (68). A diversidade geográfica provavelmente ocorre devido a diferença na exposição a certos patógenos, possivelmente em combinação com fatores genéticos de susceptibilidade genética do paciente (69,70). Essas variantes também podem ditar de alguma forma o curso e a gravidade da síndrome, porém esses mecanismos de atuação ainda não foram esclarecidos.

A maioria dos casos de SGB notificados estão relacionados a infecção prévia com uma bactéria chamada *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), e dessa forma, uma grande porcentagem das pesquisas da imunopatologia da síndrome é realizada tendo como foco este patógeno. Contudo, vários outros patógenos, inclusive os virais têm sido relacionados a casos de SGB, como o DENV, o ZIKV e o CHIKV (71-74). Casos da SGB relacionados a infecções prévias por CMV, EBV, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e Vírus Influenza A, e vários outros patógenos também já foram notificados (75,76).

2.1.2. Mecanismos propostos para a imunopatogenese da SGB

A SGB é uma doença imunomediada, pós-infecciosa, que acomete o sistema nervoso periférico do indivíduo. Porém, os mecanismos imunológicos e patogênicos que ocorrem para que se tenha o desenvolvimento do quadro ainda não estão claros. Vários trabalhos vêm demonstrando que diferentes patógenos estão relacionados a diferentes quadros clínicos da SGB.

De uma forma generalizada, acredita-se que a SGB seja principalmente mediada por anticorpos, apesar da participação de outros elementos da resposta imunológica do indivíduo, como os linfócitos T, B e macrófagos (62). No período em que se tem contato com um patógeno, os antígenos do mesmo são capturados por células apresentadoras de antígenos (APCs), que por sua vez os apresentam aos linfócitos T e B. Sendo assim, uma resposta imunológica celular e humoral são desenvolvidas, de maneira que os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos neutralizantes específicos direcionados a esse patógeno. De alguma forma, em certo momento, esses anticorpos produzidos passam a reagir cruzadamente com antígenos presentes na bainha de mielina das células de Schwann e na membrana externa das regiões axonais dos neurônios periféricos. Normalmente esses antígenos

reconhecidos estão presentes em estruturas chamadas de gangliosídeos, que são esfingolipídios constituintes das membranas celulares dos neurônios e estão presentes na parte externa dessas membranas tendo como função básica e sinalização celular. Alguns anticorpos anti-gangliosídeos já foram identificados em diversos pacientes com a SGB e muitos desses anticorpos estão associados a patógenos específicos, que reconhecem tanto estruturas nesses microrganismos quanto nos gangliosídeos. Um exemplo bastante clássico e arquetipo de estudo da SGB como já mencionado é o *C. jejuni*. Pesquisas demonstraram que existe um mimetismo antigênico estrutural entre lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular dessas bactérias e estruturas de gangliosídeos como o GM1 e o GD1a (77-80). Por estarem presentes na membrana celular dos neurônios, os anticorpos reconhecem então essas estruturas se tornando auto anticorpos, ativam proteínas do complemento que formam então o complexo de ataque a membrana (*Membrane Attack Complex* – MAC) induzindo poros nos prolongamentos axonais desses neurônios. Esses eventos levam ao dano de neurônios motores e perda da condução do estímulo nervoso.

Esse mecanismo de ação é aceito para a SGB de subtipo AMAM. Na SGB de subtipo PIDA, o antígeno que sofre o reconhecimento por auto anticorpos ainda permanece desconhecido. Contudo, semelhante ao modelo da imunopatogenese na SGB de dano axonal, acredita-se que na SGB desmielinizante o gatilho para o desenvolvimento da doença também seja uma infecção prévia por um patógeno. Anticorpos são gerados com especificidades para esse microrganismo, porém também passam a reconhecer estruturas específicas da bainha de mielina produzida pelas células Schwann no SNP. Esses anticorpos também ativam as proteínas do complemento e há danos na condução da comunicação do SNP com o sistema motor e sensorial do indivíduo.

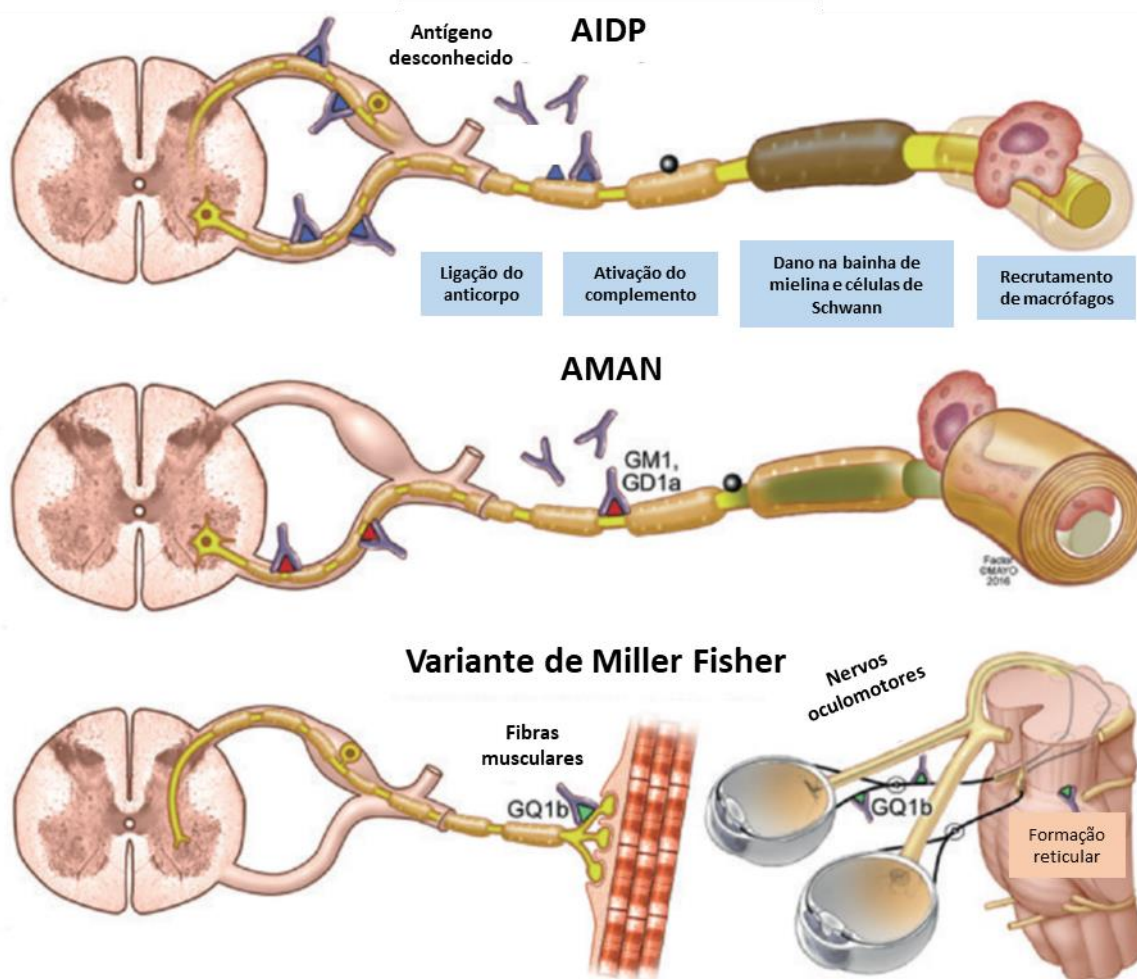


Figura 6. Compreensão atual da patogênese da síndrome de Guillain-Barré e variantes clínicas. Na síndrome de Guillain-Barré desmielinizante, antígenos inequívocos ainda precisam ser identificados, mas são inferidos pela ativação do complemento, destruição da mielina e limpeza por macrófagos. Nas variantes axonal e de Miller Fisher, os gangliosídeos específicos (GM1, GD1a, GQ1b) são alvos de imunoglobulinas e partilham epítomos antigênicos com vários antígenos bacterianos e virais. Esses alvos antigênicos estão nas estruturas nodais, nas raízes e localizados nos órgãos finais. Na síndrome de Miller Fisher, o antígeno GQ1b também existe dentro do tronco cerebral. Nesta variante, os macrófagos fagocitam os detritos do axônio e entram pelos nós. Modificado de Wijdicks E. F. M., et al, 2017 (62).

2.1.3. Diagnóstico da SGB

A SGB pode ser confundida com outras doenças com sintomas semelhantes que acometem o sistema nervoso, dessa forma, a anamnese realizada pelo profissional de saúde é um parâmetro bastante importante para seu diagnóstico. A procura pelo histórico das últimas semanas do paciente, o exame médico minucioso que vão desde os movimentos dos membros, relatos de dores, características das paralisias são informações de extrema importância que podem levar ao diagnóstico da síndrome.

Além disso, exames mais específicos e diferenciais como a análise do LCR dos pacientes, juntamente com o exame médico também podem diagnosticar a SGB. De acordo com o critério de Brighton a contagem de células no LCR deve ser menos que 50 células/ μL (83). A dissociação albumino-citológica é uma combinação de níveis elevados de proteínas no LCR e contagens normais de

células, apesar desses parâmetros serem dependentes do estágio da SGB e do tempo da evolução da doença, e serem observados em apenas dois terços dos pacientes (84).

Os estudos neurofisiológicos são de extrema importância, e são bastante aplicados nos casos em que o diagnóstico clínico não é claro ou a SGB não se apresenta com sintomatologia clássica. O exame neurofisiológico possibilita identificar o subtipo da SGB observando-se a condução do impulso nervoso. Os subtipos da SGB como a PIDA e a NAMA são de difícil diagnóstico meramente clínico, e o teste eletrofisiológico é a ferramenta excelente para tanto.

2. OBJETIVOS

Geral: Caracterizar a infecção do ZIKV em pacientes diagnosticados com a Síndrome de Guillain-Barré que receberam tratamento no Hospital das Clínicas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP no ano de 2016, bem como investigar seu protagonismo no desenvolvimento da doença.

Específicos:

- Coletar, analisar e avaliar informações de caráter clínico-epidemiológicas relevantes na SGB e que possam estar relacionadas a infecção pelo ZIKV;
- Investigar a presença de material genético do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes diagnosticados com a SGB;
- Demonstrar a viabilidade viral através de seu isolamento a partir de amostras clínicas;
- Investigar a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV no soro dos pacientes diagnosticados com a SGB
- Investigar a relação entre a infecção pelo ZIKV e o desenvolvimento da SGB a partir de análises estatísticas correlacionando dados epidemiológicos com os achados clínicos do presente trabalho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção do estoque viral e quantificação

Para a preparação do estoques viral do ZIKV, células Vero foram cultivadas em garrafas de 150 cm² (KASVI Produtos Laboratoriais - Atuba, Curitiba) em meio DMEM High Glucose suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 5% de antibiótico/anti-micótico (Penicilina/Estreptomicina e Anfotericina B – Cultilab, Campinas, São Paulo). Ao atingirem 90% de confluência as células foram infectadas com a cepa (sequência depositada no GenBank com o nº de acesso KU321639.1 – Cunha et

al., 2015) isolada em nosso laboratório, com MOI de 0,1. As células foram incubadas por uma hora a 37°C em leve agitação, e posteriormente lavadas com solução de PBS 1X para retirar as partículas virais residuais. O meio DMEM High Glucose suplementado com 2% de SBF e 5% de antibiótico/antimicótico foram adicionados e as células foram cultivadas num período de 5 a 6 dias (surgimento de efeito citopático) e o sobrenadante foi coletado, submetido à centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C para a retirada dos debris celulares. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,22µm, e alíquotas do estoque foram realizadas para o congelamento em -80°C.

O estoque produzido foi quantificado pelo ensaio de formação de placa (*Plaque Formation Unit* – PFU), considerado padrão ouro. Células Vero foram distribuídas em placas de 24 poços (KASVI) em uma concentração de 3 x 10⁵ células/poço para atingir confluência de 90-100% no dia seguinte. Após lavar as células com solução de PBS 1X, uma alíquota de 50µL de cada estoque viral foi utilizada para a quantificação, e diluída em 450µL para diluições seriadas 1:10. Foram feitas 11 diluições, e 200µL de cada diluição foram adicionados em duplicata na placa. Para que os vírus adsorvessem na monocamada de células, a placa foi incubada por uma hora à 37°C em leve agitação. Após esse período o inóculo foi retirado lavando os poços com PBS 1X e em seguida um meio semissólido constituído de 3% de carboximetilcelulose (CMC) dissolvido em 100mL de água ultrapura homogeneizada em 100mL de meio DMEM 2X suplementado com 1% de SFB e 5% de antibiótico/antimicótico. Esse meio semissólido é de extrema importância para que limite o vírus a infectar apenas um foco celular, gerando um efeito citopático local e dando origem a uma unidade formadora de placa (*plaque-forming units* – PFU). A placa foi mantida por cinco dias em estufa a 37°C. Para a revelação da placa e contagem do título viral o CMC foi retirado e 500µL de uma solução de formaldeído 10X foi adicionada para a fixação das células e mantida por 30 minutos em temperatura ambiente e em movimentação. Em seguida a placa foi lavada com água corrente e 300µL de uma solução de cristal violeta foi adicionada para corar as células fixadas por mais 30 minutos. Em seguida a placa foi lavada novamente em água corrente, o excesso da coloração foi retirado e então foi possível observar pontos sem coloração indicando PFUs.

Cada PFU corresponde a uma partícula viral infecciosa, e para fazer a titulação do vírus, os PFUs foram contados nos poços que apresentaram o menor número de placas, ou seja, a diluição em que havia um número limitante de partículas virais infecciosas. A quantificação foi extrapolada para PFU/mL. O estoque produzido obteve uma titulação de 5 x 10⁶ PFU/mL.

2.2. Pacientes e amostras clínicas

A pesquisa contou com um total de 75 pacientes, e o início da prospecção dos casos se deu em janeiro de 2016, sabendo-se que houve um aumento nacional no número de casos da síndrome após a detecção da epidemia pelo ZIKV no Brasil. Os pacientes foram atendidos ou no Hospital das Clínicas da cidade de Ribeirão Preto – SP, ou nas Unidades de Emergência da cidade apresentando um ou mais

dos seguintes sintomas: paralisia em alguma região corporal, perda de equilíbrio, perda de sensibilidade corporal, dificuldades respiratórias e/ou confusão mental. Na suspeita da SGB, esses pacientes eram então encaminhados ao Hospital das Clínicas para dar seguimento ao atendimento junto a equipe de neurologia. Amostras de sangue, urina e líquido encéfalo-raquidiano foram coletadas dentro das 24 horas em que o paciente deu entrada no hospital para a realização dos exames clínicos, e dessa forma, alíquotas foram separadas para serem incluídas no presente estudo.

Os critérios de inclusão dos pacientes na pesquisa foram:

- Diagnóstico positivo para a SGB, de acordo com os parâmetros neurológicos e eletro-neuromiológicos necessários para a caracterização aplicados pela equipe de neurologia que acompanhou o paciente;
- Apresentarem informações sobre a caracterização da manifestação neurológica no sistema do HC;
- Apresentarem número e registro no HC.

Os critérios de exclusão foram:

- Diagnóstico negativo para a SGB, sendo caracterizado dentro de outras manifestações neurológicas;
- Ausência de registro ou informações sobre o diagnóstico da manifestação neurológica no sistema do HC;
- Ausência de registro no sistema do HC.

Todos os pacientes tiveram acesso ao termo de consentimento livre e esclarecido, e a pesquisa foi desenvolvida e aprovada pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, bem como suas complementares tendo como registro da CAAE o número 61385416.1.1001.5.440 e o número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética é o 5440.

2.3. Coleta de dados epidemiológicos dos pacientes

A coleta dos dados epidemiológicos dos pacientes foi realizada acessando o sistema do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto checando exames, procedimentos realizados, prescrições médicas e descrições de anamnese dos pacientes. Os dados coletados foram gênero, raça, idade, data e sintomas de doença febril aguda prévia recente, data de início e sintomas manifestantes da SGB, tratamento com imunoglobulinas endovenosas, exames para outras doenças infecciosas, exames para dosagem de proteínas e células no líquido encéfalo-raquidiano, exame para painel de anticorpos anti-gangliosídeos e presença de outras doenças no paciente.

2.4. Detecção do material genético do ZIKV em amostras clínicas

As amostras clínicas coletadas passaram pelo processo de extração do RNA viral com o Kit De Extração Mini Spin Vírus Dna/Rna (KASVI, Paraná, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Os RNAs foram quantificados em aparelho espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) para observar a pureza e integridade do material genético. O RNA viral foi quantificado por qRT-PCR em tempo real com o kit TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific). A reação para cada amostra quantificada continha 2,5 µL do Master Mix (AmpliTaQ® Fast DNA Polymerase, Thermostable MMLV enzyme, dNTPs incluindo dATP, dGTP, dCTP, and dTTP, RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, ROX™ dye (referência passiva), *buffer*), 0,125 µL do *forward primer* e 0,125 µL do *reverse primer*, 0,125µL da sonda, 4 µL do RNA extraído e 3,125 µL de água ultrapura livre de RNase, completando um volume total de 10 µL por reação. Seguem abaixo as sequências dos *primers* e sonda utilizados para a detecção e quantificação do ZIKV:

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na detecção do RNA do ZIKV por RT-PCR em tempo real.

Primer/Sonda	Sequência	Referência
<i>Primer Forward – ZKEF</i>	5'AAGTTTGCATGCTCCAAGAAAAT 3'	Pyke <i>et al.</i> , 2014
<i>Primer Reverse – ZKER</i>	5'CAGCATTATCCGGTACTCCAGAT 3'	Pyke <i>et al.</i> , 2014
Sonda	5'-FAM-ACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGA-MGB-3'	Pyke <i>et al.</i> , 2014

Para a quantificação da carga viral, uma curva padrão foi confeccionada a partir do estoque viral previamente quantificado. O RNA viral foi extraído e foram feitas diluições seriadas com fator de 1:10 iniciando em 10⁶ PFU/mL e finalizando em 10⁰ PFU/mL. Os RNAs diluídos para a curva padrão foram adicionados à placa junto às amostras a serem quantificadas.

As quantificações foram feitas em duplicata para cada amostra, inclusive as diluições da curva padrão, e o termociclador utilizado foi o Realplex® 4 Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Na primeira etapa (pré-PCR) a reação de transcrição reversa do RNA (síntese do cDNA) foi feita a 50°C por 5 minutos, e a inativação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase ocorreu a 95°C por um minuto. Em seguida, 40 ciclos se seguem com 95°C por 15 segundos para a desnaturação das fitas de cDNA, e 60°C por 30 segundos para o anelamento dos *primers* e extensão das fitas de DNA. A partir da fluorescência emitida pela sonda FAM, o aparelho realizou a quantificação detectando a intensidade da emissão. Os resultados foram normalizados pelo volume de RNA utilizado na reação e foram então calculados para se obter Equivalente de PFU/mL.

Foi estabelecido um padrão para a caracterização do paciente quanto a positividade para o ZIKV. O indivíduo deveria apresentar detecção do genoma viral em pelo menos duas de suas amostras coletadas, seja no mesmo período ou em períodos de coletas diferentes.

2.5. Detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV nas amostras clínicas por PRNT (*Plaque Reduction Neutralizing Test*)

A investigação da presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV foi realizada nas amostras de soro e LCR primeiramente conduzindo um *screening* inicial com base no teste de PRNT (*Plaque Reduction Neutralizing Test* – Teste de neutralização por redução de placa). Para realizar esse *screening* inicial uma alíquota de cada amostra foi inativada a 56°C por 1 hora e em seguida foram diluídas 1:500 em meio DMEM sem suplementação. Da mesma forma uma amostra com altos títulos de anticorpos anti-ZIKV (controle positivo) e uma amostra com altos títulos de anticorpos anti-DENV (controle negativo) foram inativadas e diluídas igualmente. Em seguida as amostras diluídas receberam 60 PFU do ZIKV e foram incubadas a 37°C por 1 hora para que pudesse ocorrer a reação de ligação entre o antígeno (ZIKV) aos anticorpos se ali presentes. Após a incubação as amostras foram adicionadas a uma placa de 24 poços contendo 4×10^5 células Vero/poço que foram plaqueadas no dia anterior. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora para a adsorção viral. Na presença de altos títulos de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV impediriam a adsorção viral nas células Vero e conseqüentemente a morte celular. Após essa etapa o inóculo foi retirado, os poços foram lavados com PBS 1X e um *overlay* (meio semi-sólido constituído de CMC 1,5% e meio DMEM suplementado com 2% de antibiótico/antimicótico e 2% de SFB) é adicionado a cada poço da placa mantendo cada partícula viral restrita à região específica em que infectou a célula. A placa é então mantida a 37°C por 5 dias e então o *overlay* é retirado e uma solução de formol a 10% é adicionada a cada poço para que as células sejam fixadas. Em seguida uma solução de cristal violeta 1% é adicionada a cada poço para que as células sejam coradas e os resultados possam ser obtidos.

As regiões coradas pelo cristal violeta indicam que as células estão vivas e continuam aderidas à placa. A ausência de coloração demonstra regiões em que houve lise celular formando círculos pequenos chamados de placas. No controle positivo não há formação de placa, pois há grande quantidade de anticorpos neutralizantes indicando uma inibição total das partículas virais. No controle negativo uma amostra positiva para o DENV foi utilizada para certificar que esses anticorpos não neutralizam de maneira cruzada o ZIKV. Na ausência de anticorpos específicos as partículas virais não são neutralizadas e causam lise celular (cerca de 60 placas). Amostras de pacientes que neutralizaram 50% das partículas virais foram consideradas positivas para anticorpos neutralizantes anti-ZIKV e amostras que neutralizaram menos de 50% das partículas foram consideradas negativas. Somente então as amostras com 50% ou mais de neutralização numa diluição de 1:500 foram submetidas ao PRNT. Este teste é utilizado para identificar e quantificar a quantidade de anticorpos neutralizantes contra partículas virais infecciosas. O PRNT é um teste sorológico mais específico para a identificação de arboviroses e é amplamente utilizado para a titulação de anticorpos neutralizantes de um determinado patógeno.

A realização do PRNT se deu pela diluição seriada (realizada em meio DMEM sem suplementação) de anticorpos (diluição inicial 1:20 até 1:20480 – 11x) presentes na amostra analisada

que serão incubados com uma quantidade fixa do ZIKV (70 PFU/reacção) por 1 hora a 37°. Um controle negativo também é adicionado a placa, o qual apenas recebe vírus com um soro sabidamente negativo para anticorpos anti-ZIKV. Em seguida as diluições são adicionadas em uma placa de 24 poços, sendo que cada dupla de poços recebem uma diluição. O teste é realizado em duplicata. As placas receberam previamente células Vero (cerca de 4×10^5 células/poço) cerca de 24 horas antes. Dessa forma, as células são incubadas com as diluições contendo vírus + anticorpo diluído serialmente por 1 hora a 37° (tempo necessário para a reacção antígeno-anticorpo acontecer e o vírus permanecer viável). Após esse período a placa é lavada com PBS 1X e o *overlay* (o mesmo meio semi-sólido citado acima) é adicionado a cada poço da placa. O teste é mantido por 5 dias em estufa a 37° e então o *overlay* é retirado e o teste é revelado da mesma maneira como já descrito acima. O controle negativo deve conter o número aproximado de 60 placas e será utilizado como um parâmetro para observar a capacidade de neutralização viral a ser verificada em cada amostra testada.

2.6. Isolamento do ZIKV a partir das amostras clínicas

Em algumas amostras de pacientes conseguimos detectar na PCR em tempo real um CT de amplificação do ZIKV relativamente alto, e a partir dessas amostras tentamos realizar o isolamento viral. Para tanto, uma alíquota de 100µL da amostra do paciente foi diluída em 2mL de meio DMEM sem suplementação, foi filtrada em filtro de 0,22 µm para eliminar qualquer contaminação bacteriana e então foi inoculada em uma garrafa de 25cm² contendo células Vero em 90% de confluência. Seguiu-se uma incubação a 37° por 1 hora para que as partículas virais se presentes na amostra pudessem infectar as células. Posteriormente, a garrafa foi completada com 4 mL de meio DMEM suplementado com 2% de SFB e 2% de antibiótico/antimicótico e mantida em estufa a 37°C por 5 dias.

Após essa primeira passagem o sobrenadante da garrafa foi coletado e aliquotado e 1mL foi re-inoculado em uma outra garrafa de 25cm² contendo células Vero com 90% de confluência. A infecção ocorreu como descrito acima e a garrafa foi mantida também como descrito a 37°C por 5 dias. O sobrenadante foi coletado novamente e re-inoculado como descrito acima.

Para observar se houve aumento da carga viral, 140µL dos sobrenadantes da primeira e segunda passagem foram submetidos à extração do RNA viral com o kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN®, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Juntamente com os sobrenadantes a serem extraídos, duas águas autoclavadas foram extraídas para verificar qualquer vestígio de contaminação. Após a extração o RNA viral foi quantificado por qRT-PCR em tempo real com o kit TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific) com o mesmo protocolo já descrito acima utilizando-se os mesmos primers. Para a quantificação da carga viral, uma curva padrão foi confeccionada a partir de estoque viral previamente quantificado como já descrito nos experimentos anteriores. As quantificações foram feitas em duplicata para cada amostra, inclusive as diluições da curva padrão, e o termociclador utilizado foi o Realplex® 4 Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo,

Alemanha). A reação de qRT-PCR em tempo real foi conduzida nos mesmos moldes como já descritos previamente. Os resultados foram normalizados pelo volume de RNA utilizado na reação e foram então calculados para se obter Equivalente de PFU/mL de sobrenadante de cultura.

Para eliminar qualquer hipótese de contaminação no momento da extração do RNA viral ou na confecção da RT-PCR em tempo real, o ensaio de titulação viral foi realizado para verificar a presença de efeito citopático (lise celular) observado pela formação de placa. Esse ensaio é considerado padrão-ouro para quantificação viral. Células Vero foram distribuídas em placas de 24 poços em uma concentração de 4×10^5 células/poço para atingir confluência de 90-100% no dia seguinte. Após lavar as células com solução de PBS 1X, uma alíquota de 50 μ L de cada isolado viral foi utilizada para a quantificação, e diluída em 450 μ L para diluições seriadas 1:10. Foram feitas 11 diluições, e 200 μ L de cada diluição foram adicionados em duplicata na placa. Para que os vírus adsorvessem na monocamada de células, a placa foi incubada por 1 hora à 37°C. Após esse período o inóculo foi retirado lavando os poços com PBS 1X e em seguida o *overlay* já descrito acima foi adicionado. A adição do *overlay* é de extrema importância para que limite o vírus a infectar apenas um foco celular, gerando um efeito citopático local e dando origem a uma unidade formadora de placa (*plaque-forming units* – PFU). O ensaio foi mantido por cinco dias em estufa a 37°C.

Para a revelação da placa e contagem do título viral o CMC foi retirado dos poços e 500 μ L de uma solução de formaldeído 10X foi adicionada para a fixação das células e mantida por 30 minutos em temperatura ambiente e em movimentação. Em seguida a placa foi lavada com água corrente e 300 μ L de uma solução de cristal violeta foi adicionada para corar as células fixadas por mais 30 minutos. Posteriormente a placa foi lavada novamente em água corrente, o excesso da coloração foi retirado e então foi possível observar pontos sem coloração indicando PFUs. Cada PFU corresponde a uma partícula viral infecciosa, e para fazer a titulação do vírus, os PFUs foram contados nos poços que apresentaram o menor número de placas, ou seja, a diluição em que havia um número limitante de partículas virais infecciosas. A quantificação foi extrapolada para PFU/mL.

3.7. Sequenciamento dos isolados virais

O sequenciamento dos isolados virais e dos vírus presentes nas amostras clínicas, oligonucleotídeos foram desenhados a fim de que o genoma completo fosse sequenciado. Dez pares de *primers* foram desenhados para tanto, através do alinhamento de várias sequencias completas do ZIKV depositadas no GenBank. O cDNA foi confeccionado a partir das amostras de interesse utilizando-se o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de PCR foi realizada utilizando-se uma enzima de alta fidelidade para reduzir a taxa de erros de bases nucleotídicas na síntese do DNA com a enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., Massachusetts, EUA). A reação foi realizada com 4 μ L de Buffer 5X Phusion HF que acompanha a enzima, 0,4 μ L de dNTPs 10 mM,

1 µL do *forward primer* e 1 µL do *reverse primer*, 0,2 µL da *Phusion DNA Polymerase*, 9,4 µL de água livre de nucleasse e 4 µL do cDNA da amostra, totalizando uma reação de 20 µL. A ciclagem da PCR compreendeu em um estágio inicial de desnaturação das fitas do DNA a uma temperatura de 98°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos 98°C por 10 segundos, a temperatura de anelamento ideal para cada par de *primers* por 30 segundos e 72°C por 30 segundos para cada kb do amplicon. Uma extensão final de 72°C por 7 minutos foi adicionada.

Tabela 2. Relação dos oligonucleotídeos utilizados para a realização do sequenciamento do genoma do ZIKV.

Oligonucleotídeos	Sequência	TNAMAh do fragmento gerado (pb)	Temperatura de anelamento
ZK_5'UTR_F	5'AGTTGTTGATCTGTGTGAATCAGAC3'	520	
ZK_Cap_R	5'TGTCCAAGTACATATAGTATGCACTC3'		
ZK_5'UTR_F2	5'GAAACGAGAGTTTCTGGTCATGA3'	919	
ZK_PrM_R	5'AGTCCCTATTGCTGACTCCTATG3'		
ZK_Env_F	5'TACTTGGTCATGATACTGCTGATTG3'	1611	
ZK_Env_R	5'TTCAACGTCGTTATAGACGAAC3'		
ZK_Env_In	5'ACTGGTTGGTTCACAAGGAGT3'		
ZK_NS1_F	5'GAGTGTGATCTTCTTATCCACAG3'	1121	
ZK_NS1_R	5'CAGAATCACAAGCACTCCAAG3'		
ZK_NS1_In	5'TTCACACTAGTGCTGGCTCAA3'		
ZK_NS2A_F	5'GATGGCTGTTGGTATGGAATG3'	1207	
ZK_NS2B_R	5'TCTACGAGTCATTACTCTGTACTC3'		
ZK_NS2_In	5'CTGATAACATCACCTTGGCAA3'		
ZK_NS3_F	5'TGATGACCATCTGTGGCATG3'	1997	
ZK_NS3_R	5'TGGAATCTCTCTGTCATGTGTC3'		
ZK_NS3_InF	5'CTTCACTTCACGTCTACTACA3'		
ZK_NS3_InR	5'AGTCTTTCTGCTGAGCTGTATGA3'		
ZK_NS4A_F	5'GACGCCAGAGTTTGTTCAGAT3'	1331	
ZK_NS4B_R	5'TTTGTAGGAGTAGAACTCCAGG3'		
ZK_NS4_InF	5'ATTCTCAATGGACATTGACCTG3'		
ZK_NS4_InR	5'AAGGAGTAGTTGTTGTATGAAGT3'		
ZK_NS5_F1	5'ACTTGGCTGGAGCTTCTCTAAT3'	1528	
ZK_NS5_R1	5'ATCCTCGTTCAAGAATCCAAGG3'		
ZK_NS5_InF1	5'CAACTCTACACATGAGATGTACTG3'		
ZK_NS5_F2	5'AAGACTGCAGTGGAAAGCTGT3'	1549	
ZK_NS5_R2	5'GCGTTCTCGGCCTGACTATA3'		
ZK_NS5_InF2	5'ATGATTGCGTTGTGAAGCCAATT3'		
ZK_3'UTR_F	5'GCAGGATCATAGGTGATGAAGAA3'	472	
ZK_3'UTR_R	5'TATTCGGCGATCTGTGCCT3'		

Para a purificação dos fragmentos, todo o volume (20 µL) dos produtos das amplificações foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0% (Invitrogen, Carlsbad, EUA), em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). Os géis foram corados com Gel Red (Biotium, Hayward, EUA) e as bandas foram purificadas utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, EUA). Após a purificação, a concentração dos fragmentos de PCR foi estimada pelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para a reação do sequenciamento as amostras foram preparadas com o kit de reação ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para cada amostra a ser sequenciada em microplaca de 96 poços, utilizou-se aproximadamente 40 ng de DNA, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos, 2 µL de “Big Dye” (deoxinucleotídeos, dideoxinucleotídeos fluorescentes, enzima Taq DNA-Polimerase), 3µL de tampão “Big Dye” (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM de Cloreto de Magnésio) e água milli-Q estéril, para completar um volume final de 20 µL. A ciclagem utilizada foi a seguinte: 95°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a amplificação as amostras foram purificadas com o kit BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A separação eletroforética e a coleta de dados foram realizadas no sequenciador automático de DNA ABI Prism® 3100 sequencer Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Os arquivos obtidos a partir do sequenciamento foram alinhados utilizando o programa Bioedit. As sequências consenso foram montadas e comparados com o banco de dados do GenBank (Benson et al, 2013) utilizando a ferramenta Blast (Altschul et al, 1990). Foram selecionadas sequências de referências do Brasil e de outros países para a região 5' UTR do genoma viral (Tabela 3). As sequências selecionadas foram utilizadas para obtenção de um alinhamento múltiplo que foi gerado utilizando o programa de alinhamento Mafft (Katoh, 2013). O alinhamento foi analisado com o programa jModeltest (Darriba et al, 2013) para escolha do modelo evolutivo adequado para construção das árvores filogenéticas com o uso da metodologia de AIC (Akaike). As árvores foram obtidas com o uso do programa PhyML (Dufayard et al, 2010) e Mega 7 (Kumar et al, 2016) utilizando valores de bootstrap de 500 novas árvores para obtenção de uma árvore com maior confiança.

Tabela 3. Lista das seqüências do ZIKV obtidas na base de dados do GenBank.

Identificador (GenBank)	País de Origem	Tipo de amostra	Ano da Coleta	Origem do vírus	Cepa viral
KF383118	Senegal		2001		ArD157995
HQ234501	Senegal		1984		ArD_41519
KF383116	Senegal		1968		ArD7117
HQ234500	Nigéria	Sangue	1968		IbH_30656
AY632535	Uganda		1947		MR_766
KF383119	Senegal		2001		ArD158084
KF383115	República Centro Africana		1968		ArB1362
EU545988	Micronesia		2007		
JN860885	Camboja		2010		FSS13025
KJ776791	Polinésia Francesa		2013		H/PF
HQ234499	Malásia		1966		P6_740
NC_035889	Brasil	Cérebro (feto)	2015	Humano	
KX197192	Brasil	Soro	2015	Humano	PE243
KX280026	Brasil	Soro	2015	Humano	
KY272991	Brasil	Leite materno	2016	Humano	
KU926310	Brasil	Saliva	2016	Humano	
KU926309	Brasil	Urina	2016	Humano	
MF073358	Brasil	Soro	2015	Humano	
KU497555	Brasil		2015	Humano	
MF352141	Brasil			Humano	PE243
MH882545	Brasil	Semen	2016	Humano	
KX811222	Brasil		2016		
KY631492	Brasil	Plasma	2016	Humano	
KU922923	México		2016	Humano	InDRE/Lm/

3.10. Análises estatísticas dos resultados obtidos

A análise descritiva dos dados foi realizada por tabelas de frequência, sendo as variáveis contínuas apresentadas com cálculo de média e desvio padrão ou mediana e percentis.

Para testar as diferenças entre 2 grupos foram aplicados os testes t de Student (paramétrico) ou Mann-Whitney (não-paramétrico) bi-caudais. Para comparação de 3 ou mais subgrupos de pacientes, foram utilizadas análises de ANOVA (paramétrica) ou Kruskal-Wallis (não-paramétrica), seguidas dos pós testes de Tukey e Dunn, respectivamente. A decisão entre aplicação de testes paramétricos e não-paramétricos foi baseada no resultado do teste Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilks de normalidade. O teste do χ^2 foi aplicado para testar as diferenças entre as proporções nos grupos avaliados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism8. Para todos os testes utilizados o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

2. RESULTADOS

4. RESULTADOS

A relação causal entre a infecção pelo o ZIKV e a microcefalia já foi bem estabelecida com um número de estudos que demonstraram o isolamento do ZIKV no líquido amniótico, placenta, e tecidos de crianças que nasceram com microcefalia, demonstrando que o vírus pode passar do sangue materno para o feto em desenvolvimento do sistema nervoso central e afetar esse processo principalmente durante o primeiro e terceiro trimestre gestacional (17,18,19). Em contrapartida, os estudos relacionados à síndrome de Guillain-Barré e sua relação com a infecção pelo ZIKV são bastante escassos, e o que se sabe é de uma associação entre o aumento do número de casos de infecção pelo ZIKV e o consecutivo aumento no número de casos de SGB, contudo uma relação causal entre esses dois fatores ainda não foi estabelecida.

No presente trabalho foi proposto investigar a relação causal entre o ZIKV e a SGB a partir de amostras clínicas de pacientes que foram diagnosticados com SGB a partir do ano de 2016 e que seguiram tratamento no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-SP. Nós propusemos investigar a presença do RNA do ZIKV em amostras de sangue, urina e LCR desses pacientes, em diferentes períodos da doença, a tentativa de isolamento do ZIKV se detectado no paciente a partir dessas amostras, e a investigação de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV nessas mesmas amostras. O histórico de infecção prévia dos pacientes também foi investigado, bem como exames relevantes como outras infecções por microrganismos infecciosos, análise albuminocitológica do LCR, teste para painel de gangliosídeos e estudo da eletroneuromiografia. Esses dados foram coletados dos prontuários médicos dos pacientes na plataforma ATHOS do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Elementos do estudo contendo as características clínicas dos pacientes, testes de eletroneuromiografia e teste para painel de gangliosídeos foi realizado em parceria com o grupo de pesquisa em Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob a supervisão do Professor Dr. Amilton Antunes Barreira, e todas as amostras foram coletadas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e obtidas por meio de termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos pacientes, de acordo com normas do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa com base na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, bem como suas complementares.

4.1. Caracterização das amostras clínicas

Durante o período de 2016, no auge da infecção pelo ZIKV, o número de casos da SGB apresentou um aumento significativo reportado em várias regiões do Brasil, e dessa forma o presente estudo teve início nesse mesmo período. Pacientes que procuraram atendimento médico nas Unidades de Emergência de Ribeirão Preto com sintomas motores e sensitivas com características de parestesias e paralisias, e alterações neurológicas e psicológicas que indicassem um possível diagnóstico da

Síndrome de Guillain-Barré foram incluídas na presente pesquisa. Os casos suspeitos foram encaminhados para realizar o tratamento adequado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, e em parceria com o Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto as amostras desses pacientes foram coletadas e encaminhadas para as análises deste trabalho. A média das idades dos pacientes foi de 50,1 anos e mediada de 48 anos, sendo que a faixa etária variou entre 17 a 80 anos. Dos 42 pacientes, 25 eram do gênero masculino (59,52%) e 17 do gênero feminino (40,47%); 35 dos pacientes se autodeclararam da raça branca (83,33%), 5 da raça parda (11,9%), e 2 da raça preta (4,76%). Esses dados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Características epidemiológicas dos pacientes.

Idade (em anos)	Gênero		Raça
	Feminino	Masculino	
50,1 (±16,22)	17 (40,47%)	25 (59,52%)	Branca – 35 (83,33%) Parda – 5 (11,9%) Preta – 2 (4,76%)

Para a realização do diagnóstico e tratamento do paciente exames para a detecção de microrganismos infecciosos foram conduzidos, bem como a investigação do LCR para avaliar a presença de células e proteínas no SNP e suas proporções. Os pacientes que apresentaram um diagnóstico clínico bastante sugestivo ou suspeito de SGB foram submetidos ao estudo da eletroneuromiografia para avaliação da condução do impulso nervoso no sistema sensitivo motor do paciente. Esse exame pode ser a resposta conclusiva para o diagnóstico da SGB.

A investigação para a presença de patógenos foi realizada pelo Hospital das Clínicas por solicitação da equipe médica que acompanhou cada caso, e dessa forma cada paciente teve diferentes patógenos analisados, de acordo com o critério da equipe médica. Na tabela 5 encontram-se os exames realizados para a investigação desses patógenos e o número de pacientes que apresentaram positividade ou não nesses exames.

Tabela 5. Exames realizados para detecção de patógenos infecciosos nos pacientes.

Exames	Resultado			Patógenos detectados
	Positivo	Negativo	Intermediário	
PCR para Herpes 6	0	6		No exame de Micologia foi identificado: <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Candida albicans</i> em 1 paciente. No exame de Culturas em geral foram detectados: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bacilos gram-negativos sem especificação em 3 pacientes;
PCR para EBV	0	17		
PCR Herpes Simplex I-II	0	7		
PCR Herpes Zoster	0	18		
PCR CMV	0	17		
Cultura Micobactérias	0	10		
Micologia	1	10		
CIE para Fungos	0	6		
ELISA HIV	0	34		

VDRL	0	27		<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Micrococcus</i> sp. em 2 pacientes; ▪ <i>Staphylococcus aureus</i> em 2 pacientes; ▪ <i>Staphylococcus warneri</i> em 1 paciente.
PCR Cisticercose	0	1		
Culturas em Geral	7	11		
Sorologia Hepatites	2	24		
Hemoculturas	0	10		
PCR HTLV I-II	1	4		
ELISA Toxoplasmose	0	1		No exame de Sorologia para Hepatites foram detectados:
PCR Enterovirus	0	4		<ul style="list-style-type: none"> ▪ HBV em 1 paciente; ▪ HCV em 1 paciente.
PCR Parvovovirus	0	4		
PCR Adenovirus	0	4		
PCR Poliomavirus	0	4		
Baciloscopia	0	2		No exame de PCR para HTLV I-II foi detectado:
ELISA <i>Micoplasma pneumoniae</i>	3	4	7	<ul style="list-style-type: none"> ▪ HTLV-I em 1 paciente.
ELISA Toxocara	1	0		

Dentre os 24 exames de identificação patogênica realizados 12 pacientes apresentaram positividade em um deles. No exame de Micologia um paciente apresentou infecção por *Candida albicans*; No exame de Culturas em Geral três pacientes apresentaram infecção por bacilos gram-negativos não especificados; dois pacientes apresentaram infecção por *Micrococcus* sp., sendo que um deles estava co-infectado com *Staphylococcus aureus*; um paciente infectado apenas com *Staphylococcus aureus*; um paciente infectado com *Staphylococcus warneri*; um paciente apresentou sorologia positiva para o HCV, e um paciente apresentou sorologia positiva para o HBV.

Os testes mais solicitados foram para a detecção de HIV-1 e 2, sendo que do grupo de 42 pacientes, 34 (80,95%) tiveram solicitações para esse teste. A detecção do HIV foi realizada por ELISA e todos os pacientes foram negativos. O exame para sífilis (VDRL) foi o segundo mais solicitado e 27 pacientes (64,28%) foram investigados para este patógeno, sendo que nenhum apresentou positividade no exame. 26 pacientes (61,9%) foram investigados para sorologias para hepatites. O exame para a detecção do Herpes Zoster por PCR foi realizado em 18 pacientes (42,85%), sem nenhuma positividade; O exame para a detecção de bactérias em geral (Culturas em Geral foi realizado também em 18 pacientes (42,85%), com sete pacientes apresentando crescimento bacteriano (16,66%); A detecção para o EBV por PCR foi realizada em 17 pacientes (40,47%), sem nenhum resultado positivo para este método. A detecção para o CMV por PCR foi realizada em 17 pacientes (40,47%), sem nenhum resultado positivo; O teste de ELISA para avaliar positividade para *Micoplasma pneumoniae* foi realizado em 14 pacientes (33,33%), e destes três pacientes apresentaram resultado positivo para a infecção, sete apresentaram resultado intermediário, e 7 apresentaram resultado negativo; O teste para a micologia foi realizado em 11 pacientes (26,19%), e um paciente apresentou infecção ativa por *Candida albicans*; A cultura para micobactérias foi realizada em 10 pacientes (23,8%), e nenhum paciente apresentou positividade; Hemoculturas também foram realizadas em 10 pacientes (23,8%), e nenhum paciente apresentou

positividade; O teste para a detecção da presença de Herpes Simplex I e II por PCR foi realizado em sete pacientes (16,66%), sendo todos os resultados negativos; O teste CIE para fungos foi realizado em seis pacientes (14,28%), sem nenhum resultado positivo; A PCR para a detecção do HTLV I e II foi realizado em 5 pacientes, e um deles apresentou resultado positivo para o HTLV-I; Os testes de PCR para Enterovírus, Parvovírus, Adenovírus e Poliomavírus foram realizados cada um em quatro pacientes (9,52%), sendo todos os resultados negativos; A baciloscopia para a investigação para tuberculose foi realizada em dois pacientes (4,76%) com ambos apresentando resultados negativos; Um teste de PCR para Cisticercose (2,38%) foi realizado e o resultado foi negativo; Um teste de ELISA para toxoplasmose foi realizado em um paciente (2,38%), que apresentou resultado negativo para anticorpos anti-toxoplasma; e um teste de ELISA para investigar a verminose por *Toxocara* foi realizado em um paciente (2,38%) que apresentou resultado positivo. Do total de 42 pacientes, 40 deles (95,23%) realizaram pelo menos dois exames para análise de investigação de doenças infecciosas, e apenas 12 pacientes (28,57%) apresentaram positividade para os patógenos investigados.

Dentre os 42 pacientes que apresentaram sintomas neurológicos e sensitivo-motores, 31 tiveram diagnóstico confirmado de SGB (73,8%). O estudo da eletroneuromiografia (ENMG) foi de extrema importância para a conclusão de 30 diagnósticos, apesar do diagnóstico de um dos casos ter sido baseado apenas nos indícios clínicos do paciente, já que o estudo de ENMG não foi condizente com todos os parâmetros necessários para concluir um quadro de polineuropatia sensitivo-motora desmielinizante ou axonal aguda ou subaguda indicativa da SGB. Os outros 11 pacientes (26,19%) apresentaram outras manifestações clínicas sendo que três foram diagnosticados com encefalite, dois com AVC, dois com transtorno psicótico agudo e de comportamento, um paciente com encefalopatia de Wernicke, um com meningite viral e um paciente com polineuropatia não especificada. Houve um caso de óbito (3,22%) dentre os 31 pacientes com a SGB.

As manifestações clínicas observadas dentre os pacientes diagnosticados com a síndrome foram:

Tabela 6. Manifestações clínicas dos pacientes diagnosticados com a SGB.

Sintomas Clínicos	Nº de pacientes
Sintomas sensoriais	25 (80,64%)
Parestesia	23 (74,19%)
Tetraparesia	18 (58,06%)
Disautonomia	14 (45,16%)
Ataxia	13 (41,9%)
Paraparesia	13 (41,9%)
Paresia	12 (38,7%)
Envolvimento craniano	12 (38,7%)
Confusão mental	7 (22,58%)
Disfagia	6 (19,35%)
Paralisia respiratória	5 (16,12%)
Cefaléia	5 (16,12%)
Disfonia	5 (16,12%)
Dislalia	4 (12,9%)
Variante de Miller Fisher	2 (6,45%)

Dentre os 31 pacientes diagnosticados com a SGB, 100% deles apresentaram alguma disfunção motora e hipotonia, sendo que 25 (80,64%) relataram sintomas sensoriais associados como dessensibilização de membros, dores e câimbras pelo corpo. O quadro de parestesias em membros, principalmente extremidades como pés e mãos foram bastante relatados acometendo 23 (74,19%) dos pacientes, com bastante frequência no estágio inicial da síndrome e como sequela residual no período de convalescência (Tabela 6). A tetraparesia, denominada como a perda parcial das funções motoras dos membros inferiores e superiores, foi relatada em 18 (58,06%) dos pacientes, que descreveram extrema dificuldade na deambulação ficando restritos ao uso de cadeira de rodas por algum período e de auxílio para necessidades básicas do cotidiano. A disautonomia foi relatada em 14 (45,16%) dos pacientes e consistiu na disfunção do sistema nervoso autônomo observando-se a paralisia do aparelho urinário e intestinal e disfunção esfinteriana que impediram os pacientes de realizarem necessidades básicas de excreção, bem como a hipertensão arterial, hipotensão e arritmias cardíacas. A ataxia foi registrada em 13 (41,9%) dos pacientes e era acompanhada por desequilíbrio e dificuldade de deambulação. A paraparesia foi relatada em 13 (41,9%) dos pacientes que apresentaram perdas parciais da movimentação, reflexo e sensibilidade dos membros superiores ou inferiores. A paresia estava presente em 12 38,7% dos pacientes, que apresentaram perda parcial da motricidade em certo estágio da SGB. O envolvimento de nervos cranianos foi observado em 38,7% dos pacientes, sendo que dois casos foram diagnosticados como a variante de Miller Fisher. Cerca de 22,58% dos pacientes relataram confusão mental, que consistiu em desorientação espaço-temporal e em alguns casos perda de memória. A disfagia foi observada em 19,35% dos pacientes que desenvolveram dificuldade de deglutição da dieta sólida, apresentando engasgos. A paralisia respiratória foi registrada em 16,12% dos pacientes, os quais

apresentaram a necessidade de ventilação mecânica e em três casos os pacientes foram traqueostomizados. A cefaleia persistente foi relatada em 16,12% dos pacientes. A disфония e a dislalia foram relatadas em 16,12% e 12,9% dos pacientes, respectivamente, que desenvolveram dificuldades de comunicação verbal.

O diagnóstico do subtipo da SGB foi realizado em 26 dos 31 pacientes (Tabela 7). A maioria dos casos da SGB se enquadraram no subtipo PIDA abrangendo 13 (56,52%) dos 23 casos caracterizados. O subtipo NAMA foi o segundo mais recorrente abrangendo seis casos (20,08%). O subtipo NAASM abrangeu 4 casos (17,39%), e a variação da Síndrome de Miller Fisher abrangeu três casos (11,53%), sendo que um desses pacientes também foi caracterizado com PIDA participando dos dois grupos. Um dos pacientes foi enquadrado no subtipo de polirradiculoneuropatia inflamatória desmielinizante crônica (*Chronic Inflammatory Demyelinating Neuropathy – CIDP*), pois apesar de ter sido diagnosticado com a SGB, ele apresentava um histórico de neuropatia desmielinizante hereditária com quadro recorrente, sendo então classificado nesta outra categoria.

Tabela 7. Classificação do subtipo da SGB em 23 pacientes.

Subtipo da SGB	Nº de pacientes
PIDA	12 (52,17%)
NAMA	6 (20,08%)
NAASM	4 (17,39%)
SMF	3 (11,53%)

*PIDA: Polirradiculoneuropatia Inflamatória Desmielinizante Aguda
 *NAMA: Neuropatia Axonal Motora Aguda
 *NAASM: Neuropatia Axonal Sensitivo-motora Aguda
 * Síndrome de Miller Fisher

Uma análise complementar rotineiramente empregada na investigação da SGB é a avaliação do LCR do paciente, observando as quantidades de proteínas (proteínoorraquia) e de leucócitos nesse material. Os dados para avaliar a dissociação albuminocitológica (hiperproteínoorraquia maior que 45 mg/100mL de LCR e celularidade menor do que 10 células/mm³ de LCR, uma das características para compor o diagnóstico da SGB) no LCR estavam disponíveis para 29 dos 31 pacientes diagnosticados com a SGB e observou-se essa dissociação em 21 pacientes (72,4%), com mediana da proteínoorraquia de 60,33 mg/100mL e mediana da celularidade de 2,1 células/mm³.

Para dar início à investigação da relação entre a SGB e a infecção pelo ZIKV, as informações sobre os sintomas que remetessem a quadros infecciosos prévios recentes a síndrome, ou a ausência deles foram coletadas a partir dos prontuários dos pacientes (Tabela 8). Os sintomas do quadro de doença febril exantemática prévia num período máximo de um mês ao surgimento da SGB foram relatados por 10 (32,25%) dos 31 pacientes e constituíram em febre, cefaleia, mialgia, artralgia, exantema, dor retro orbital e hiperemia conjuntival, com resolução espontânea entre cinco a sete dias após o início dos sintomas. A média de tempo para o surgimento da SGB foi de 12 dias após o início do quadro febril. Um desses pacientes relatou testes de NS1 e sorologias para dengue terem apresentado resultados

negativos. Um dos pacientes apresentou náusea e vômitos associados ao quadro. Um dos pacientes relatou diarreia associada ao quadro. Um dos pacientes relatou a ausência de exantema. Outros dois pacientes (6,45%) relataram quadro de doença exantemática num período maior de antecedência à síndrome de 120 dias. O quadro de diarreia prévia a SGB foi relatado por oito pacientes (25,8%), sendo que dois casos apresentaram febre associada, um caso apresentou febre e vômitos associados e um caso apresentou presença de sangue nas fezes. A média de tempo para o surgimento da SGB foi de 11,5 dias após o início do quadro diarreico. Três pacientes (9,67%) relataram quadro com sintomas semelhantes a gripe como dores no corpo, coriza e espirros. Um dos casos relatou ter realizado exame sorológico para o ZIKV em posto de saúde, sendo o resultado positivo. A média de tempo entre o surgimento e o desenvolvimento da SGB foi de 10,5 dias após o início do quadro. Três pacientes (9,67%) relataram vacinação anterior ao surgimento da SGB. Dois casos relataram terem sido vacinados contra o vírus H1N1, e um caso contra o YFV. A média de tempo para o surgimento da SGB foi de 15 dias após a vacinação. Um paciente (3,22%) relatou quadro de náusea e vômitos, e após sete dias apresentou os primeiros sintomas relacionados a SGB. Seis pacientes (6,45%) relataram não apresentar nenhuma sintomatologia anterior a SGB.

Tabela 8. Sintomas e/ou eventos recentes anteriores a SGB relatados pelos pacientes.

Sintomas prévios a SGB relatados	Nº de pacientes	Média de tempo (em dias) entre os sintomas e a SGB
Doença febril exantemática	10 (32,25%)	12 ($\pm 6,84$)
Doença febril exantemática	2 (6,45%)	120
Quadro diarreico	8 (25,8%)	11,5 ($\pm 9,8$)
Sintomas semelhantes a gripe	3 (9,67%)	10,5 ($\pm 6,36$)
Vacinação	3 (9,67%)	15 ($\pm 8,66$)
Quadro de náusea e vômitos	1 (3,22%)	7
Assintomáticos	6 (19,35%)	-

Reunindo as informações de acordo com a sintomatologia anterior a SGB relatada pelos pacientes foi possível observar que os 12 pacientes que relataram manifestações de doença febril exantemática, cinco casos foram classificados como PIDA, dois casos como NAMA, um caso como Síndrome de Miller Fisher, um caso como uma variante de polineuropatia crônica CIDP e dois casos ficaram sem classificação (Tabela 9). Dentre os cinco casos de PIDA três pacientes apresentaram exames que detectaram patógenos infecciosos. Um paciente apresentou resultado positivo para HCV, um teve resultado positivo para bacilos gram-negativos e um paciente apresentou positividade para o *Micoplasma pneumoniae*. Esses dois últimos pacientes apresentaram também dissociação albuminocitológica no LCR. Dois casos foram classificados como NAMA sendo que um deles apresentou resultado positivo para *Staphylococcus aureus*, porém nenhum dos dois casos apresentaram dissociação albuminocitológica. O paciente que foi caracterizado com a SMF apresentou dissociação

albuminocitológica e ausência de detecção de patógenos infecciosos, bem como o caso classificado como CIDP. Dois casos não receberam a classificação em relação ao subtipo da SGB. Um deles apresentou resultado positivo para o patógeno *Toxocara* sp. com ausência de dissociação albuminocitológica e um dos casos apresentou a dissociação e ausência de infecção detectada.

Tabela 9. Características observadas nos pacientes que apresentaram doença febril exantemática prévia - 12 pacientes.

	PIDA	NAMA	SMF	CIDP	S.C.
D.I.	1	1			1
D.P.C	2		1	1	1
D.I. + D.P.C	2				
Sem D.I e sem D.P.C		1			

*SMF – Síndrome de Miller Fisher

*S.C. – Sem caracterização

*D.I. – Detecção de infecção

*D.P.C. – Dissociação albuminocitológica

Em relação aos pacientes que relataram quadro diarreico (Tabela 10), um paciente foi classificado como PIDA e apresentou dissociação albuminocitológica no LCR, sem detecção de infecções. Dois casos foram classificados no subtipo NAMA, os dois apresentando dissociação albuminocitológica, e um deles com positividade para *Staphylococcus warneri*. Dois pacientes foram classificados no subtipo NAASM, ambos apresentando dissociação albuminocitológica, e um deles com positividade para *Micrococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*. Três casos não receberam classificação em relação ao subtipo da SGB, e todos apresentaram dissociação albuminocitológica sem detecção de patógenos nos exames realizados.

Tabela 10. Características observadas nos pacientes que apresentaram quadro diarreico prévio - 8 pacientes.

	PIDA	NAMA	NAASM	S.C.
D.I.				
D.P.C	1	1	1	3
D.I. + D.P.C		1	1	

*S.C. – Sem caracterização

*D.I. – Detecção de infecção

*D.P.C. – Dissociação albuminocitológica

Os pacientes que relataram quadro semelhante a gripe (Tabela 11) totalizaram três casos, dos quais um foi caracterizado como PIDA, apresentou dissociação albuminocitológica no LCR e

apresentou positividade para bacilos gram-negativos e *Candida albicans*. Dois pacientes não foram caracterizados quanto ao subtipo da SGB, sendo que ambos apresentaram dissociação albuminocitológica.

Tabela 11. Características observadas nos pacientes que apresentaram quadro semelhante a gripe - 3 pacientes

	PIDA	S.C.
D.P.C		2
D.I. + D.P.C	1	

*S.C. – Sem caracterização
 *D.I. – Detecção de infecção
 *D.P.C. – Dissociação albuminocitológica

O grupo de pacientes que relatou evento de vacinação prévia a SGB (Tabela 12) foi composto por três pacientes. Dois casos foram classificados como PIDA, um deles relatou vacinação para H1N1 e apresentou detecção de HTLV em seus exames. O segundo caso de PIDA também relatou vacinação para H1N1, 15 dias após relatou quadro semelhante a gripe (caso fazendo parte também do grupo de quadro semelhante a gripe), com detecção de *Mycoplasma pneumoniae* em seus exames, e apresentando dissociação albuminocitológica no LCR. Um caso não recebeu classificação quanto ao subtipo da SGB, apresentando dissociação albuminocitológica.

Tabela 12. Características observadas nos pacientes que relataram vacinação recente - 3 pacientes

	PIDA	S.C.
D.I.	1	
D.P.C		1
D.I. + D.P.C	1	

*S.C. – Sem caracterização
 *D.I. – Detecção de infecção
 *D.P.C. – Dissociação albuminocitológica

O grupo de pacientes assintomáticos (Tabela 13) foi composto por seis casos, um deles sendo classificados como PIDA. Quatro casos foram classificados como NAASM, um deles apresentando dissociação albuminocitológica no LCR, dois casos que não apresentaram, e um caso que a punção do LCR não foi realizada. Um dos casos não foi classificado em relação ao subtipo da SGB e não realizou a punção do LCR.

Tabela 13. Características observadas nos pacientes sem sintomas prévios (assintomáticos) - 6 pacientes

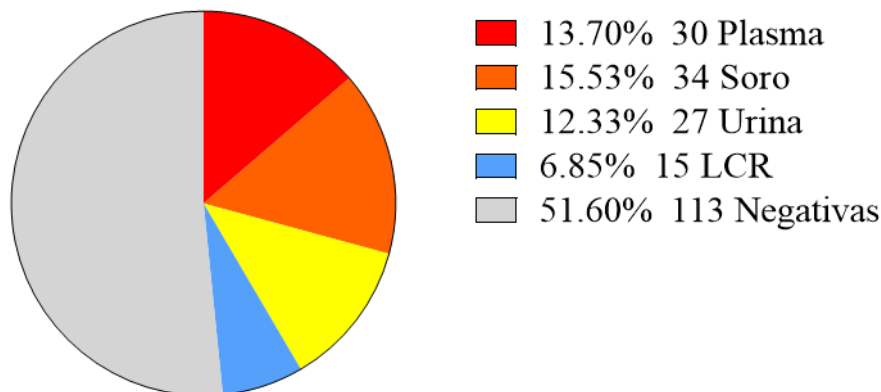
	PIDA	NAASM	S.C.
D.P.C		1	
Sem D.P.C.	1	2	
S.I.		1	1

*S.C. – Sem caracterização
 *D.P.C. – Dissociação albuminocitológica
 *S.I. – Sem informação

Apenas um dos casos apresentou sintomas de vômitos e náuseas, e foi classificado como PIDA e apresentando dissociação albuminocitológica no LCR.

4.2. Detecção do ZIKV nas amostras clínicas

Para a realização da detecção do RNA do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes e para observar o tempo de persistência dessa detecção, amostras de sangue, urina e LCR foram coletadas e analisadas. Um Total de 219 amostras foram analisadas e 106 (48,4%) foram positivas para a detecção do RNA do ZIKV. Foram coletadas no total 66 amostras de plasma, 77 amostras de soro, 48 amostras de urina e 28 amostras de LCR. A urina foi o material com maior porcentagem de positividade com 56,25% das amostras com detecção para o ZIKV (27 amostras), seguida pelo LCR, que alcançou 53,57% de positividade (15 amostras). As amostras de plasma alcançaram uma porcentagem de positividade de 45,45% e as de soro de 44,15%, e apesar de estarem e maior número não ocuparam a porcentagem de maior positividade (Figura 8).



Total=219

Figura 7. Gráfico representativo da distribuição das amostras clínicas dos pacientes diagnosticados com a SGB coletadas, e a percentagem da positividade para a detecção do RNA genômico do ZIKV dentre elas. O círculo total representa a totalidade de 219 amostras dentre plasma (vermelho), soro (alaranjado), urina (amarelo), líquido cefalorraquidiano (azul) e negativas (cinza). As porcentagens e números representam a quantificação de amostras positivas e negativas para o ZIKV.

Dentre os 31 pacientes diagnosticados com a SGB, 22 (70,96%) apresentaram detecção do ZIKV por RT-PCR em tempo real em pelo menos um de seus materiais coletados, e nove (29,03%) pacientes foram negativos (Tabela 13). Não houve diferença significativa entre as cargas virais do ZIKV detectadas no soro, plasma, urina e LCR dos pacientes com a SGB (Figura 8). A média da carga viral no plasma foi de 5800 cópias de equivalente de PFU/mL (± 16646), com mediana de 620,5 cópias de equivalente de PFU/mL. No soro a média da carga do ZIKV foi de 2758 cópias de equivalente de PFU/mL (± 6115), com mediana de 519,4 cópias de equivalente de PFU/mL. A média da carga do ZIKV na urina foi de 4370 cópias de equivalente de PFU/mL (± 13679), com mediana de 453,9 cópias de equivalente de PFU/mL. No LCR a média da carga do ZIKV foi de 8056 cópias de equivalente de PFU/mL (± 18291), com mediana de 646 cópias de equivalente de PFU/mL. Dentre os pacientes com detecção para o ZIKV, 14 (66,6%) apresentaram também dissociação albuminocitológica no LCR. Os pacientes SGB que foram negativos para o ZIKV apresentaram 87,5% dos casos (7 pacientes – de um total de 9 pacientes, 8 não tinham informações do LCR) com dissociação albuminocitológica, porém a diferença não foi significativa entre os grupos ($p=0,51$).

Tabela 14. Características de todos os pacientes diagnosticados com a SGB.

Paciente	Sintomas prévios	Classificação do subtipo da SGB	Dissociação albuminocitológica	Deteção do ZIKV	Nº de coletas	Material que apresentou positividade
P1	Quadro febril exantemático	SMF	Sim	Sim	2	P, S e L
P3	Quadro diarreico	-	Não	Sim	4	U e S
P4	Sintomas gripais	-	Sim	Sim	5	P, S, U e L
P6	Quadro febril exantemático	PIDA	Sim	Sim	4	P, U e S
P11	Quadro febril exantemático	PIDA	Sim	Sim	2	S e U
P21	Quadro febril exantemático	PIDA	Sim	Apenas em 1 material	3	P
P27	Quadro diarreico	-	Sim	Apenas na 3ª coleta	3	P e S
P28	Quadro febril exantemático	PIDA	Não	Apenas em 1 material	3	S
P33	Quadro diarreico	SMF	Sim	Não	1	-
P36	Assintomático	-	-	Não	3	-

P42	Quadro febril exantemático	PIDA	Sim	Não	1	-
P44	Quadro diarreico	NAASM	Sim	Sim	2	U e L
P47	Assintomático	NAASM	Não	Sim	2	U, S e L
P49	Quadro febril exantemático	-	-	Não	2	-
P50	Quadro febril exantemático	CIDP	Sim	Não	1	-
P53	Quadro febril exantemático	NAMA	Não	Sim	2	P, S, U e L
P54	Quadro febril exantemático	SMF	Sim	Sim	4	P, S, U e L
P55	Assintomático	NAASM	Não	Sim	6	P, S, U e L
P56	Vacinação	PIDA	Não	Sim	6	P, S, U e L
P57	Gripe e vacinação	-	Sim	Sim	5	S, P e U
P58	Quadro febril exantemático	PIDA	Sim	Sim	5	S, P e L
P60	Assintomático	NAASM	Sim	Sim	4	S, P e U
P61	Sintomas gripais	PIDA	Sim	Sim	2	S, P e L
P62	Quadro febril exantemático	NAMA	Não	Sim	1	S e U
P63	Assintomático	PIDA	Não	Sim	1	P, S, U e L
P64	Vacinação	PIDA	Sim	Sim	1	P, S, U e L
P65	Quadro diarreico	PIDA	Sim	Sim	1	P, S, U e L
P66	Quadro diarreico	NAASM	Sim	Sim	2	P, S e U
P67	Quadro diarreico	PIDA	Sim	Não	1	-
P69	Náusea e vômito	PIDA	Sim	Não	1	-
P72	Quadro diarreico	NAMA	Sim	Sim	1	S e U
P74	Assintomático	NAASM	-	Sim	1	P e S

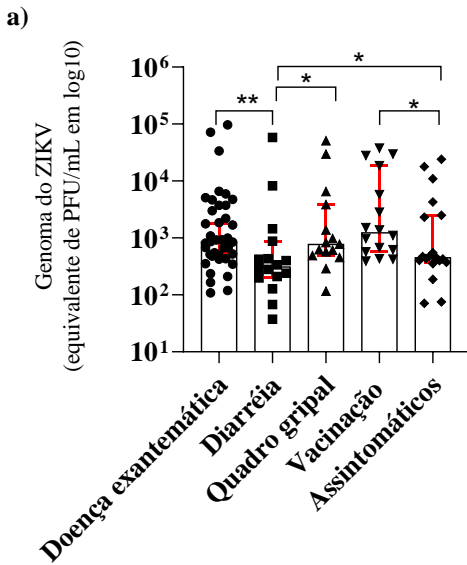
P: Plasma

S: Soro

U: Urina

L: LCR

Carga viral do ZIKV em pacientes com a SGB subdivididos pelos sintomas prévios



Carga viral do ZIKV em pacientes com a SGB subdivididos pelo subtipo da síndrome

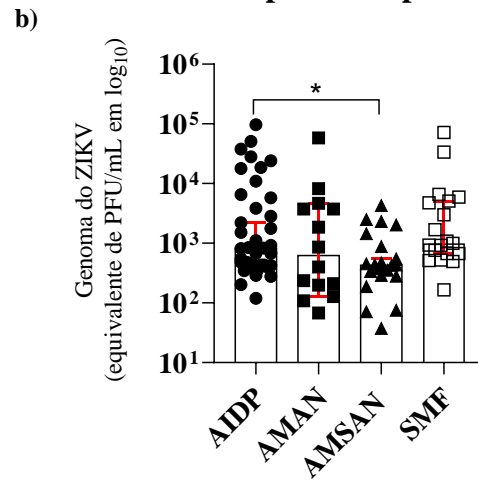


Figura 8. Gráfico demonstrando a quantificação do RNA do ZIKV nas amostras totais de plasma, soro, urina e LCR dos pacientes diagnosticados com a SGB. O One-Way ANOVA Kruskal Wallis foi aplicado para avaliar a significância entre as diferenças das medianas das cargas virais em cada material coletado. Não se observou diferença estatística ($p > 0,05$). A carga viral foi quantificada utilizando-se uma curva padrão de PFU, os resultados foram transformados para equivalente de PFU e estão representados em \log_{10} .

Carga viral do ZIKV em amostras clínicas de pacientes diagnosticados com a SGB

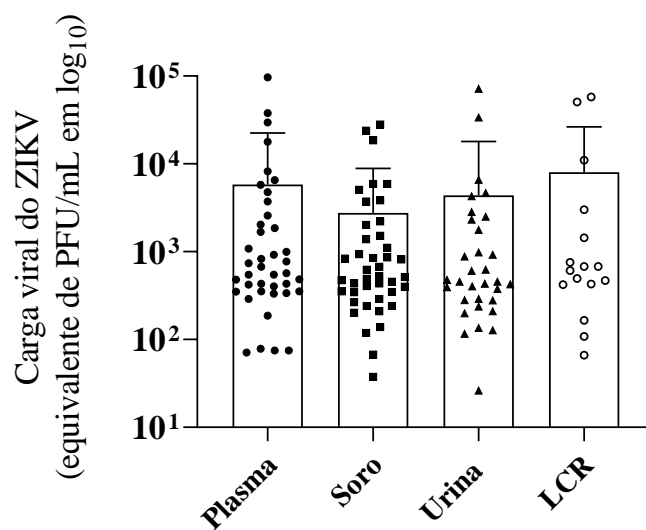


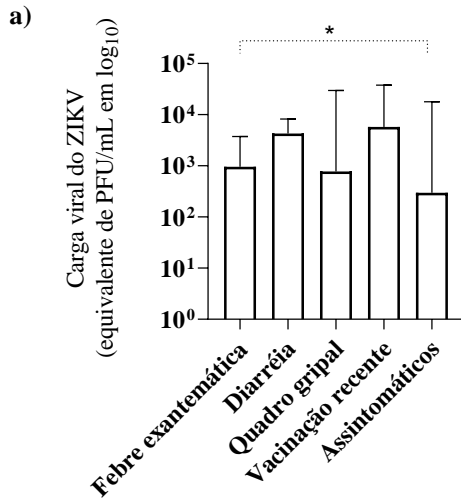
Figura 9. Gráficos representativos da quantificação do RNA genômico do ZIKV nas amostras clínicas coletadas dos pacientes diagnosticados com a SGB. A). Quantificação da carga viral do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes diagnosticados com

a SGB avaliados pelos sintomas prévios relatados. B). *Quantificação da carga viral do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes diagnosticados com a SGB avaliados pela classificação da SGB. O teste ANOVA One Way Kruskal Wallis foi aplicado para avaliar a significância entre as medianas das cargas virais entre os grupos. A carga viral foi quantificada utilizando-se uma curva padrão de PFU, e dessa forma os resultados foram transformados para equivalente de PFU e estão representados em \log_{10} . $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,001$ **.*

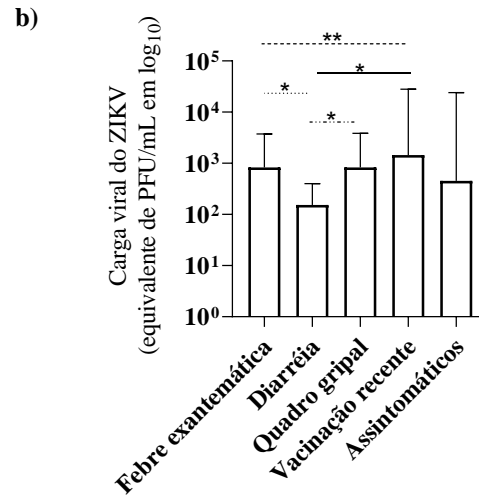
De acordo com a sintomatologia prévia a SGB, dentre os 22 pacientes positivos para a detecção do ZIKV, 18 (81,8%) relataram sintomas prévios ao desenvolvimento da SGB e 4 foram assintomáticos (18,2%). Foi possível observar que dos 12 pacientes que relataram quadro de febre exantemática, sete (58,33%) apresentaram detecção do genoma do ZIKV em pelo menos uma das amostras clínicas, e cinco deles (71,42%) também apresentavam dissociação albuminocitológica no LCR. No grupo que relatou quadro de diarreia, a detecção do ZIKV foi obtida em cinco (62,5%) de um total de oito pacientes, sendo que três (60%) também apresentaram dissociação albuminocitológica. Os três pacientes que relataram quadro semelhante a gripe tiveram detecção do ZIKV, bem como dissociação albuminocitológica no LCR. Os três pacientes que relataram vacinação prévia também foram todos positivos para a detecção do ZIKV, sendo que dois deles (66,6%) apresentaram dissociação albuminocitológica. Dentre os seis pacientes assintomáticos, cinco (83,33%) apresentaram detecção do RNA do ZIKV em pelo menos uma de suas amostras, e três pacientes apresentaram também dissociação albuminocitológica (60%) e um paciente não tinha esse dado. Foi possível observar que os pacientes com quadro diarreico obtiveram menores quantificações das cargas virais do ZIKV em relação aos outros grupos (Figura 9). Os pacientes que relataram vacinação prévia apresentaram uma quantificação do ZIKV significativamente maior do que a observada dentre os pacientes assintomáticos. A mediana de intervalo entre os sintomas relatados e o surgimento da SGB dentre os pacientes com detecção para o ZIKV foi de 15 dias (IQR 7 a 15) e entre os pacientes SGB sem detecção foi de 9 dias (IQR 7 a 20) não havendo diferença estatística entre elas ($p=0,47$).

Ao se avaliar a carga do ZIKV em cada material separadamente de acordo com os sintomas prévios relatados pelos pacientes, foi possível observar que as quantificações do ZIKV no plasma dos pacientes que relataram doença febril exantemática foram significativamente maiores em relação ao grupo assintomático (Figura 11). Além disso, a carga viral do ZIKV no soro dos pacientes com quadro de diarreia foi significativamente menor do que as observadas nos pacientes de doença febril exantemática, quadro semelhante a gripe e vacinação. Este último grupo também apresentou quantificações mais elevadas do ZIKV quando comparadas ao grupo de doença febril exantemática. Na urina o grupo de doença febril exantemática, bem como os pacientes assintomáticos obtiveram maiores quantificações do ZIKV em relação ao grupo com quadro de diarreia. As cargas virais no LCR não foram estatisticamente diferentes entre os grupos.

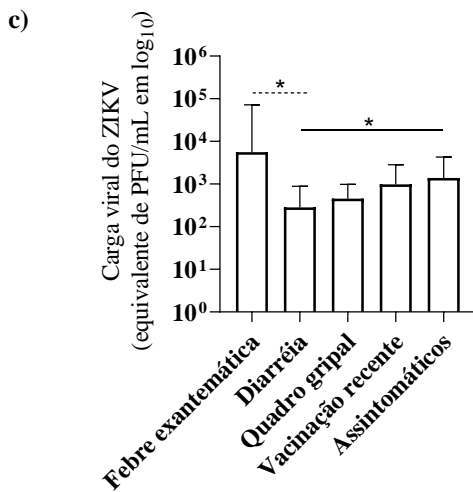
Cinética da detecção do RNA do ZIKV no plasma de pacientes subdivididos por sintomas prévios a SGB



Cinética da detecção do RNA do ZIKV no soro de pacientes subdivididos por sintomas prévios a SGB



Cinética da detecção do RNA do ZIKV na urina de pacientes subdivididos por sintomas prévios a SGB



Cinética da detecção do RNA do ZIKV no LCR de pacientes subdivididos por sintomas prévios a SGB

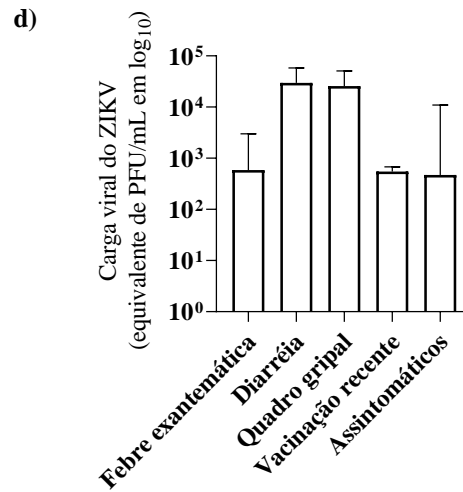
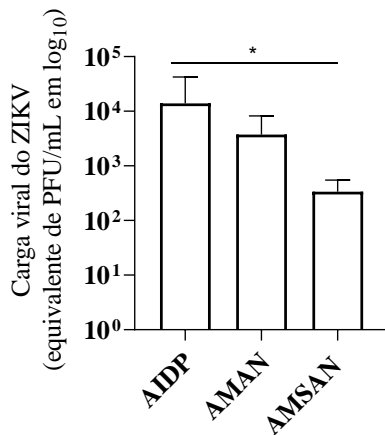
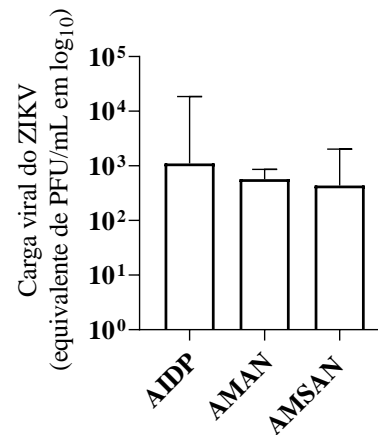


Figura 10. Gráficos representativos da quantificação do RNA genômico do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes subdivididos de acordo com os sintomas prévios a SGB a) no plasma, b) no soro, c) na urina e d) no LCR. O teste ANOVA One Way Kruskal Wallis e o teste T foram aplicados para avaliar a significância entre as medianas das cargas virais entre os grupos. A carga viral foi quantificada utilizando-se uma curva padrão de PFU, e dessa forma os resultados foram transformados para equivalente de PFU e estão representados em log₁₀. $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,001$ **.

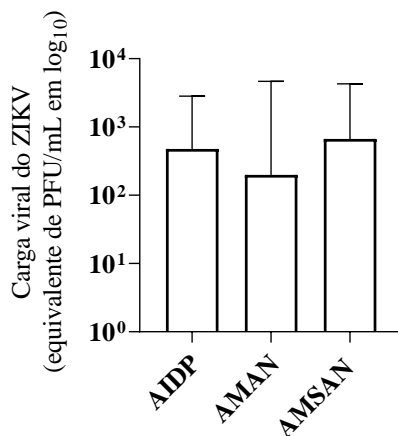
Carga viral do ZIKV no plasma de pacientes com a SGB divididos pelo subtipo da síndrome



Carga viral do ZIKV no soro de pacientes com a SGB divididos pelo subtipo da síndrome



Carga viral do ZIKV na urina de pacientes com a SGB divididos pelo subtipo da síndrome



Carga viral do ZIKV no LCR de pacientes com a SGB divididos pelo subtipo da síndrome

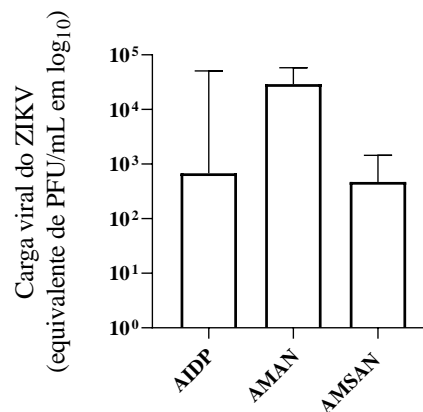


Figura 11. Gráficos representativos da quantificação do RNA genômico do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes subdivididos de acordo com a classificação da SGB a) no plasma, b) no soro, c) na urina e d) no LCR. O teste ANOVA One Way Kruskal Wallis e o teste T foram aplicados para avaliar a significância entre as medianas das cargas virais entre os grupos. A carga viral foi quantificada utilizando-se uma curva padrão de PFU, e dessa forma os resultados foram transformados para equivalente de PFU e estão representados em log₁₀. $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,001$ **.

Em relação ao subtipo da SGB, foi possível observar que o ZIKV foi detectado em 19 dos 23 pacientes que receberam a classificação quanto ao subtipo da síndrome, sendo que no subtipo PIDA oito pacientes apresentaram positividade (42,1%), no subtipo NAMA quatro casos foram positivos (21%), no subtipo NAASM seis casos foram positivos (31,57%), e no subtipo da SMF dois casos obtiveram positividade (10,5%). A carga viral entre os pacientes diagnosticados com o subtipo PIDA foi significativamente maior do que nos pacientes diagnosticados com o subtipo NAASM (Figura 10b). Analisando a carga viral em cada material separadamente foi possível observar que as quantificações do ZIKV foram significativamente maiores entre os pacientes PIDA em relação ao grupo NAASM, similar

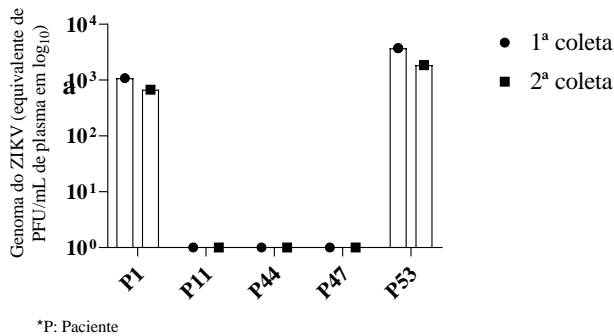
ao panorama da análise da carga viral total. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre as quantificações do ZIKV no soro, na urina e no LCR nesses grupos.

Um total de 16 pacientes obtiveram mais de um período de coleta de materiais, e pudemos avaliar a persistência da detecção do ZIKV nessas amostras, bem como a cinética do vírus em cada paciente. A média de persistência de detecção foi de 55,56 dias ($\pm 45,39$), com o menor tempo de detecção sendo de sete dias e o período máximo de até 186 dias após o primeiro período de coleta (Tabela 13).

Tabela 15. Características dos pacientes diagnosticados com a SGB com mais de um período de coleta de amostras clínicas e com detecção do RNA do ZIKV.

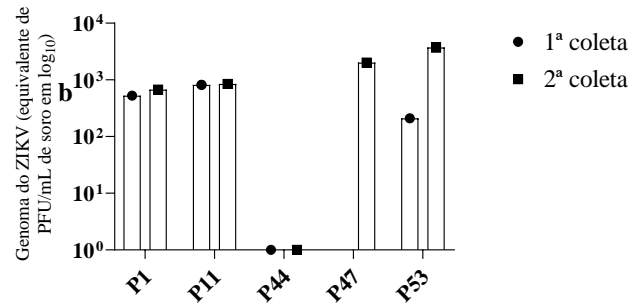
Nº do Paciente	Sintomas prévios	Classificação do subtipo da SGB	Dissociação albuminocitológica	Nº de coletas	Período de detecção do ZIKV	Tipo(s) de amostra clínica da última detecção
P1	Quadro febril exantemático	SMF	Sim	2	7 dias	P, S e L
P3	Quadro diarreico	-	Não	4	90 dias	U e S
P4	Sintomas gripais	-	Sim	5	90 dias	P
P6	Quadro febril exantemático	PIDA	Sim	4	60 dias	P, U e S
P11	Quadro febril exantemático	PIDA	Sim	2	60 dias	S e U
P44	Quadro diarreico	NAASM	Sim	2	30 dias	U
P47	Assintomático	NAASM	Não	2	30 dias	U e S
P53	Quadro febril exantemático	NAMA	Não	2	16 dias	S e P
P54	Quadro febril exantemático	- NAASM	Sim	4	14 dias	S e P
P55	Assintomático		Não	6	60 dias	P e L
P56	Vacinação	PIDA	Não	6	21 dias	S e P
P57	Gripe e vacinação	-	Sim	5	109 dias	S e P
P58	Quadro febril exantemático	PIDA	Sim	5	186 dias	S e P
P60	Assintomático	NAASM	Sim	4	72 dias	S e P
P61	Sintomas gripais	PIDA	Sim	2	22 dias	S, P e L
P66	Quadro diarreico	NAASM	Sim	2	22 dias	U

Cinética da detecção do RNA do ZIKV no plasma de pacientes com 2 períodos de coleta

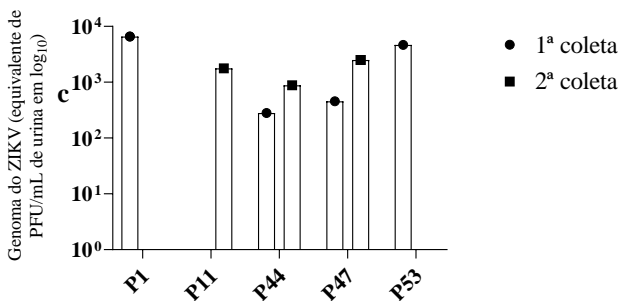


*P: Paciente

Cinética da detecção do RNA do ZIKV no soro de pacientes com 2 períodos de coleta



Cinética da detecção do RNA do ZIKV na urina de pacientes com 2 períodos de coleta



Cinética da detecção do RNA do ZIKV no LCR de pacientes com 2 períodos de coleta

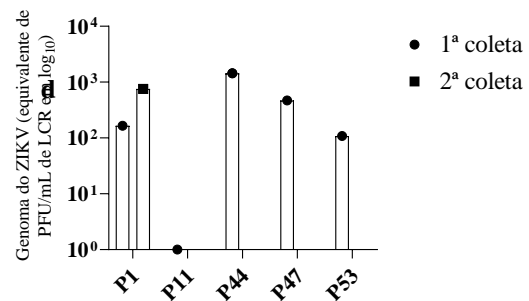


Figura 12. Gráficos representativos da quantificação do RNA genômico do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes diagnosticados com a SGB que obtiveram dois períodos de coletas. Em a) encontra-se a quantificação do ZIKV no plasma dos pacientes P1, P11, P44, P47 e P53. Em b) encontra-se a quantificação do ZIKV no soro dos pacientes P1, P11, P44, P47 e P53. Em c) encontra-se a quantificação do ZIKV na urina dos pacientes P1, P11, P44, P47 e P53. Em d) encontra-se a quantificação do ZIKV no plasma dos pacientes P1, P11, P44, P47 e P53. Cada período de coleta é representado por um símbolo.

A cinética do ZIKV foi avaliada em cada paciente de acordo com o número de períodos de coletas de cada um. Sendo assim, eles puderam ser agrupados entre pacientes que obtiveram dois, quatro, cinco e seis períodos de coletas. De acordo com os resultados, interessante foi possível identificar eventos de intermitência na detecção do ZIKV como observado no plasma do paciente 4 (P4), P6, P55, P56 e P60, no soro do P3, P6, P57, P60 e na urina e no LCR do P6 (Figura 12). Alguns materiais não foram coletados em certos períodos de coleta e por isso não estão representados nos gráficos.

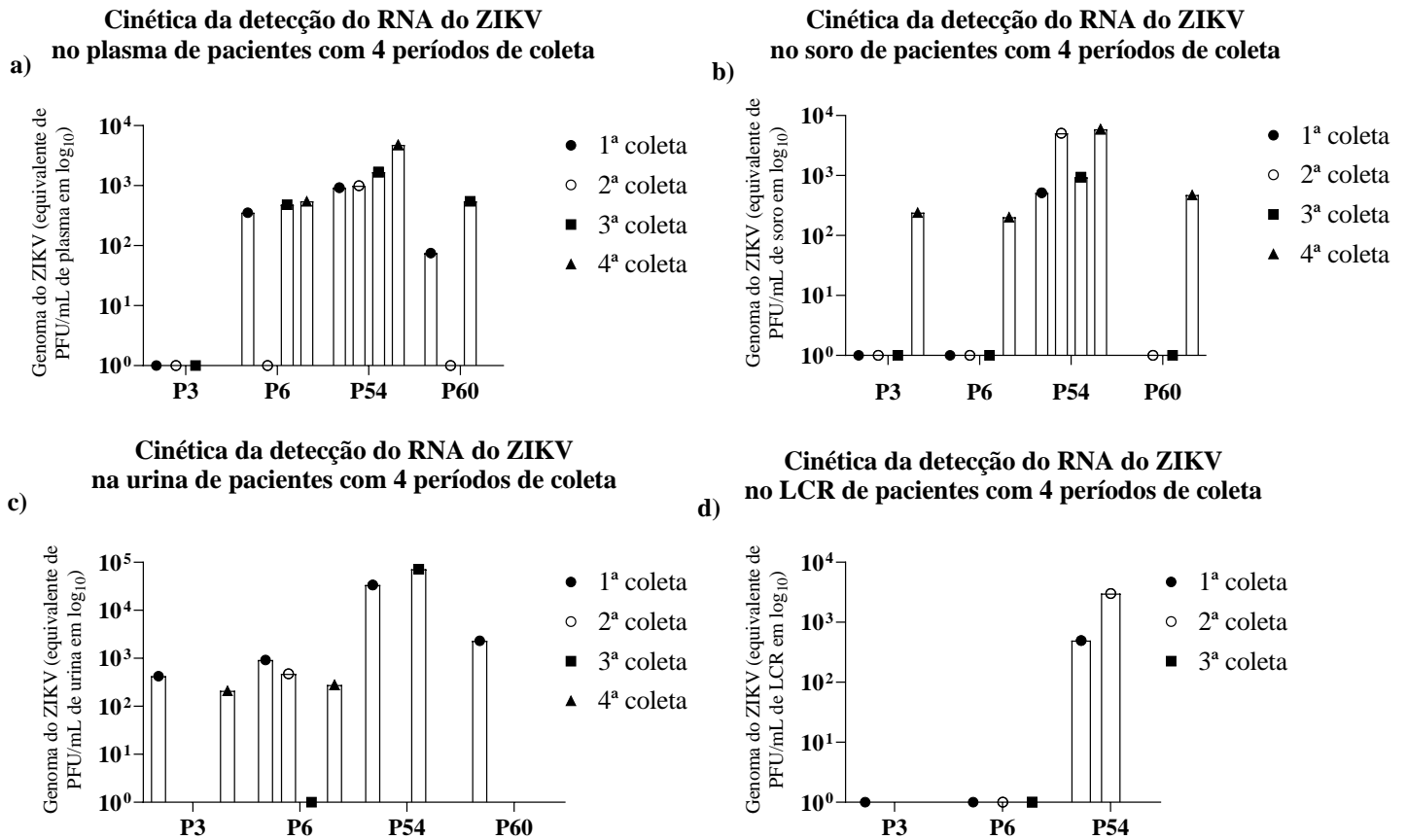


Figura 13. Gráficos representativos da quantificação do RNA genômico do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes diagnosticados com a SGB que obtiveram quatro períodos de coletas. Em a) encontra-se a quantificação do ZIKV no plasma dos pacientes P3, P6, P54 e P60. Em b) encontra-se a quantificação do ZIKV no soro dos pacientes P3, P6, P54 e P60. Em c) encontra-se a quantificação do ZIKV na urina dos pacientes P3, P6, P54 e P60. Em d) encontra-se a quantificação do ZIKV no plasma dos pacientes P3, P6, P54 e P60. Cada período de coleta é representado por um símbolo.

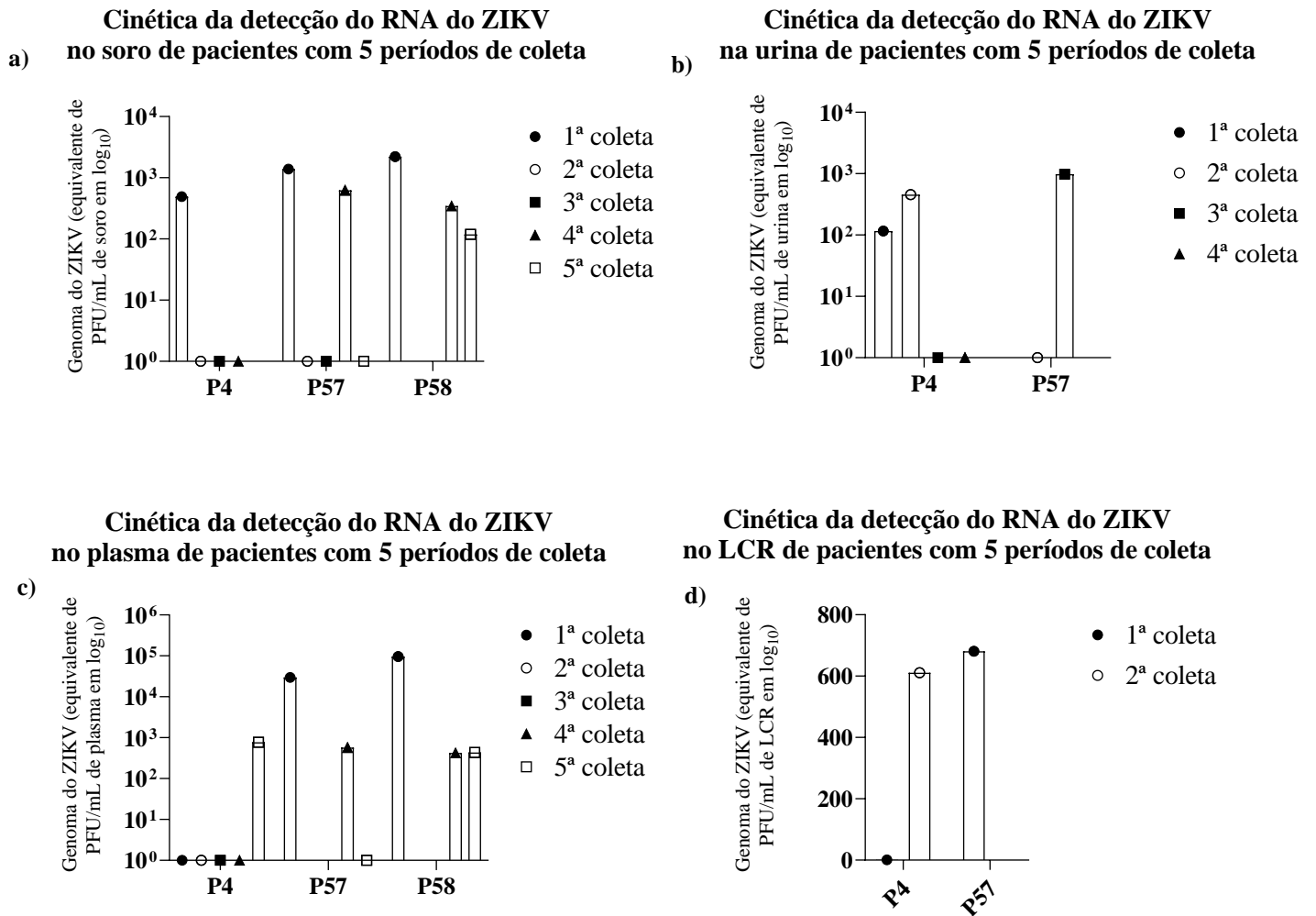


Figura 14. Gráficos representativos da quantificação do RNA genômico do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes diagnosticados com a SGB que obtiveram cinco períodos de coletas. Em a) encontra-se a quantificação do ZIKV no plasma dos pacientes P4, P57 e P58. Em b) encontra-se a quantificação do ZIKV no soro dos pacientes P4, P57 e P58. Em c) encontra-se a quantificação do ZIKV na urina dos pacientes P4, P57 e P58. Em d) encontra-se a quantificação do ZIKV no plasma dos pacientes P4, P57 e P58. Cada período de coleta é representado por um símbolo.

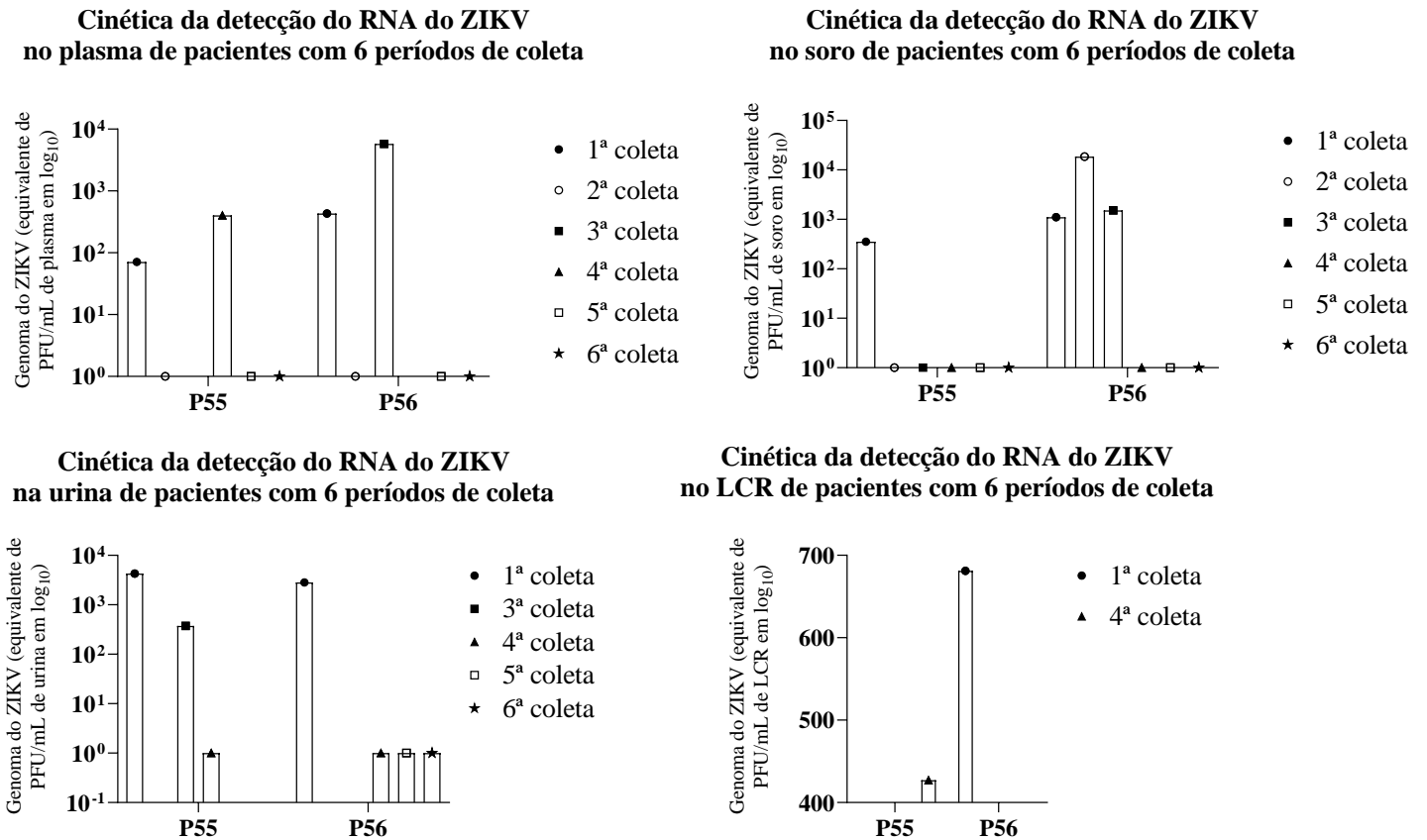


Figura 15. Gráficos representativos da quantificação do RNA genômico do ZIKV nas amostras clínicas dos pacientes diagnosticados com a SGB que obtiveram seis períodos de coletas. Em a) encontra-se a quantificação do ZIKV no plasma dos pacientes P55 e P56. Em b) encontra-se a quantificação do ZIKV no soro dos pacientes P55 e P56. Em c) encontra-se a quantificação do ZIKV na urina dos pacientes P55 e P56. Em d) encontra-se a quantificação do ZIKV no plasma dos pacientes P55 e P56. Cada período de coleta é representado por um símbolo.

Em relação aos exames realizados para detecção de infecção pré-existente nos pacientes, observou-se que sete (31,81%), dos 22 dois pacientes apresentaram positividade para algum patógeno. O P56 apresentou resultado positivo para HTLV-I, os P57 e P58 para *Micoplasma pneumoniae*, o P61 para bacilos gram-negativos e *Candida albicans*, o P62 para *Staphylococcus aureus*, o P65 para *Staphylococcus warneri*, e P66 com dupla detecção para *Micrococcus sp.* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 13).

As manifestações clínicas da SGB mais prevalentes observadas dentre os 22 pacientes que tiveram a detecção do ZIKV foram: sintomas sensoriais relatados por 77,3% dos casos (17 pacientes), parestesia em 68,2% dos casos (15 pacientes), tetraparesia em 54,5% dos casos (12 pacientes) e a disautonomia em 50% dos casos (11 pacientes). Dentre os 14 casos de disautonomia, 11 apresentaram detecção do ZIKV, e dos quatro casos de paralisia respiratória notificados, três foram positivos para a detecção do ZIKV (75%), demonstrando uma maior incidência de manifestações graves da SGB nesses pacientes. O único óbito relatado dentre os pacientes diagnosticados com a SGB apresentou detecção do genoma do ZIKV em suas amostras biológicas (P63) (Tabela 13).

Ao avaliar a dissociação proteínocitológica no LCR dos pacientes que apresentaram detecção para o ZIKV, um deles não continha esses dados, e dessa forma, de um total de 21 pacientes com dados disponíveis para análise, 14 tiveram dissociação proteínocitológica (66,6%) indicando uma alta prevalência dessa característica na infecção pelo ZIKV.

4.2. Isolamento do ZIKV em amostras clínicas

Algumas amostras que apresentaram quantificações das cargas virais do ZIKV acima de 1000 cópias de equivalente de PFU/mL foram selecionadas para a tentativa de realização do isolamento do vírus a partir do material coletado, no intuito de demonstrar a presença sítio-específica do vírus no paciente e sua viabilidade indicando que o vírus está com capacidades replicativas no indivíduo. O procedimento realizado está descrito detalhadamente em Materiais e Métodos (2.6 Isolamento do ZIKV a partir de amostras clínicas) e está representado na figura 17. Um ensaio de qRT-PCR em tempo real foi realizado a partir das alíquotas da primeira passagem (#1), segunda passagem (#2) e da terceira passagem (#3) das amostras clínicas que foram previamente inoculadas em células VERO para observar a diminuição do CT da detecção do ZIKV em cada passagem, concluindo assim a replicação do vírus e seu isolamento em cultura. O aumento da carga viral foi detectado em duas culturas provenientes de duas amostras de dois pacientes diferentes. Uma amostra foi proveniente do soro do P27. Esse paciente apresentou detecção do ZIKV apenas em seu terceiro período de coleta, e apenas no soro, porém obteve uma alta quantificação inicial da carga viral. De acordo com o critério de caracterização do paciente quanto a positividade para o ZIKV estabelecido no presente trabalho, este caso por ter apresentado detecção apenas em seu último período de coleta e em apenas um material coletado, não pudemos considerar a infecção pelo ZIKV como possível causa do desenvolvimento da SGB. Contudo, continuamos com o procedimento do isolamento viral neste paciente.

A segunda amostra com detecção de aumento da carga viral foi proveniente do LCR do P44, que foi considerado positivo para a infecção pelo ZIKV como possível causa da SGB, de acordo com o critério pré-estabelecido no presente estudo. A figura 4 demonstra o plot de amplificação das curvas-padrão que tiveram um r^2 de 0,99. Na #1 passagem nenhuma das alíquotas amplificaram, e na #2 obtivemos a amplificação do isolado 44L. A amostra amplificou num CT bem tardio e obteve uma quantificação de 3,8 cópias. Na #3 a confirmação do isolamento da amostra 44L foi obtida pelo aumento da carga viral entre a passagem anterior com uma quantificação de 42.760 cópias. O isolado 27S obteve amplificação na #3 com uma quantificação de 25.236 cópias.

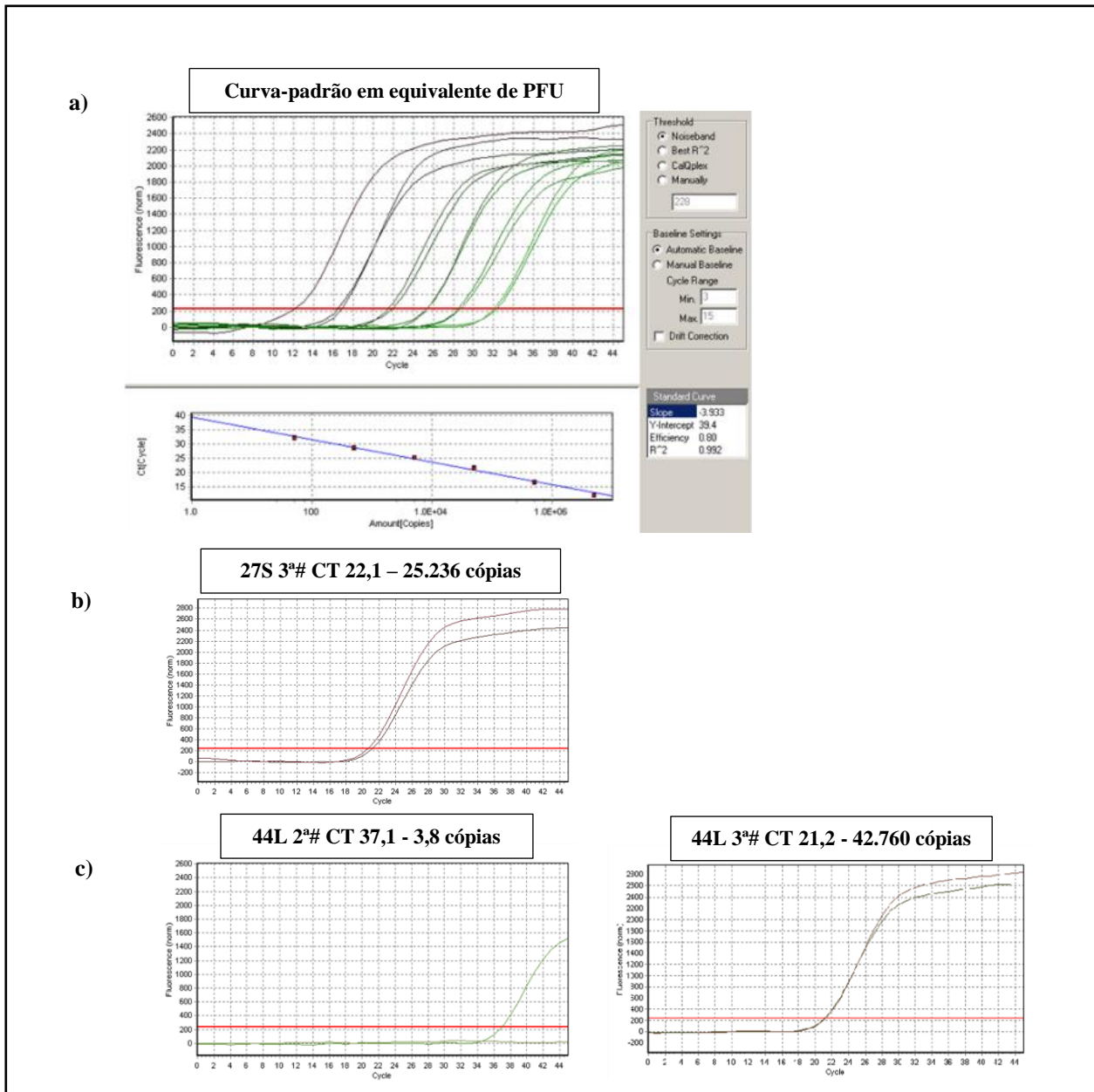


Figura 16. Ensaio de qRT-PCR em tempo real dos inóculos 27S e 44L. a). Curva-padrão do ZIKV em equivalente de PFU utilizada para a quantificação da carga viral. b). Plot de amplificação do inóculo 27S apenas na 3^a do isolado em cultura celular. c). Plot de amplificação do inóculo 44L nas 2^a e 3^a passagem do isolado em cultura celular. CT: Cycle Threshold; #: n^o de passagens.

Para avaliar a viabilidade dos isolados virais e a formação de efeito citopático em células foram realizados. Os ensaios de PFU em células VERO, e demonstraram que realmente os isolados estavam viáveis e produzindo efeito citopático induzindo lise celular. O isolado 27S foi quantificado em $2,25 \times 10^4$ PFU/mL e o isolado 44L foi quantificado em $1,75 \times 10^4$ PFU/mL (Figura 18).

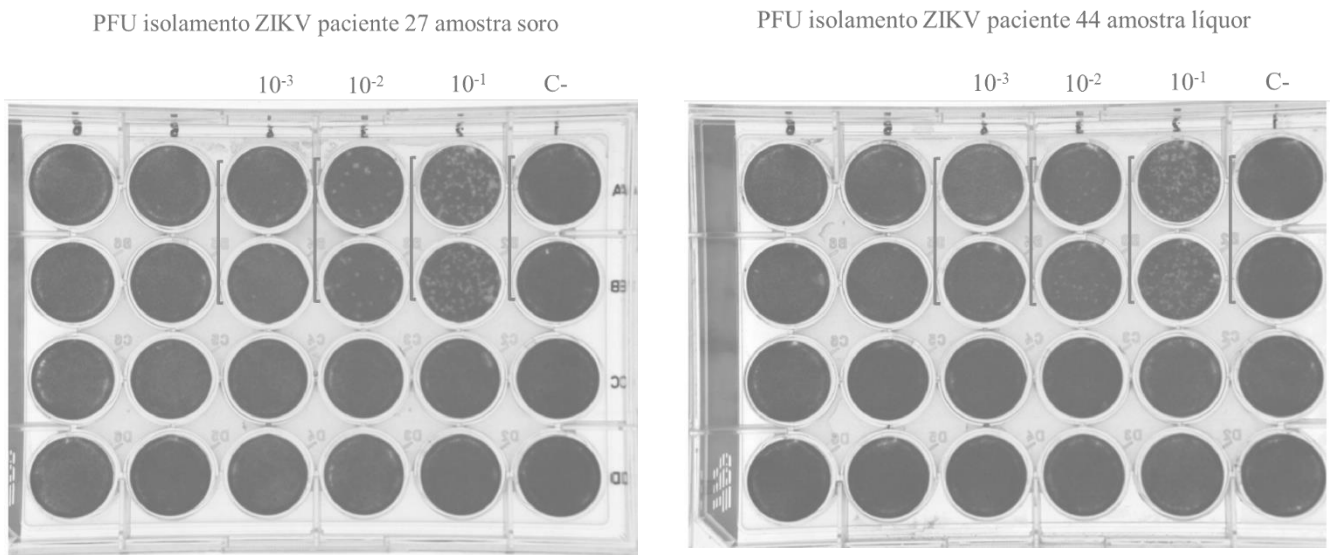


Figura 17. *Imagens dos PFUs realizados para as titulações dos isolados virais 27S e 44L. C- representa o controle negativo do teste, no qual não há adição de amostra viral. As diluições realizadas para se obter o esgotamento do efeito citopático para possibilitar a quantificação estão acima de cada poço em que houve formação de placa.*

4.3. Análise das sequências nucleotídicas dos isolados virais

Foi possível realizar o sequenciamento completo dos isolados virais obtidos, além de realizarmos o sequenciamento da região 5'UTR/prM do ZIKV amplificadas diretamente do plasma e da urina do P1. As análises filogenéticas do genoma completo do ZIKV forneceram topologias demonstrando que os isolados são semelhantes ao genótipo circulante no Brasil proveniente da Polinésia Francesa (Asiático-Americano) (Figura 19). As sequências completas que foram utilizadas para a análise dos isolados foram somente sequências virais oriundas de humanos provenientes de vários materiais e tecidos coletados em outros estudos do Brasil e de outros países. As sequências consensos identificadas por sequenciamento de Sanger foram agrupadas com outras sequências brasileiras na árvore filogenética sendo inseridas no grupo identificado como Mar.

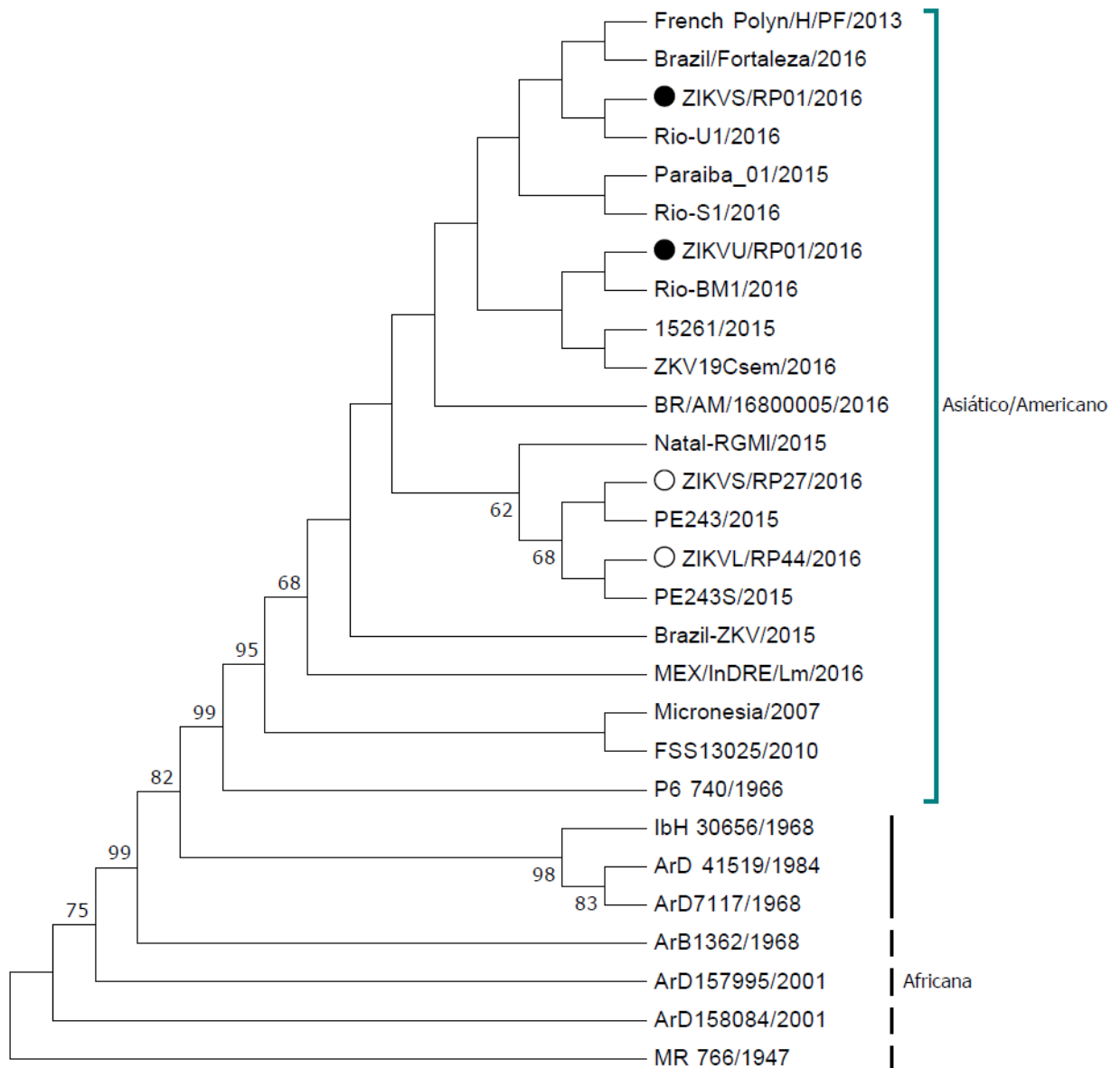


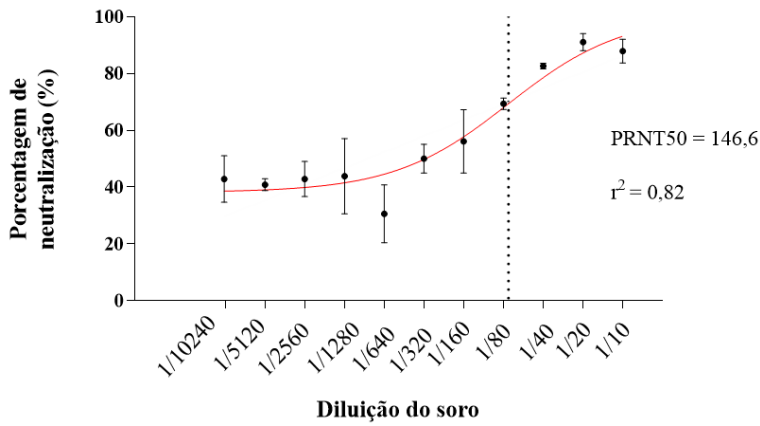
Figura 18. Arvore filogenética dos isolados virais 27S e 44L construídas a partir de sequencias do genoma completo.

4.4. Detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV

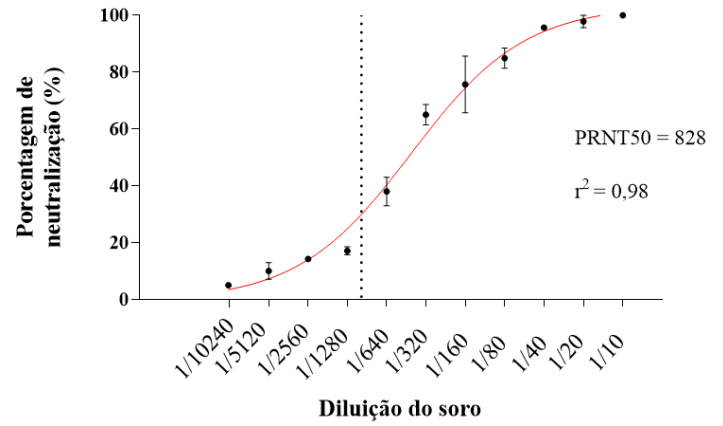
Além da presença do RNA nos pacientes diagnosticados com a SGB, o presente trabalho também investigou a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV nesses pacientes utilizando-se o ensaio de PRNT50, que é padrão-ouro para análises sorológicas virais, principalmente para flavivírus. Os pacientes que obtiveram um PRNT50 maior que 1/500 foram considerados positivos. Dos 31 pacientes diagnosticados com a SGB, nove pacientes (29%) apresentaram anticorpos neutralizantes anti-ZIKV no soro acima de 1/500. Oito desses pacientes (36,4%) também tiveram detecção do genoma do ZIKV em suas amostras clínicas (P1, P6, P11, P65, P44, P54, P57 e P59), e um dos pacientes que foi negativo para a detecção do ZIKV apresentou anticorpos neutralizantes anti-ZIKV acima de 1/500 (P28).

Os soros dos pacientes que obtiveram mais de um período de coleta foram submetidos ao ensaio de PRNT50 na primeira e em sua última coleta, de modo que caso a primeira amostra ainda não apresentasse anticorpos neutralizantes suficientes, na última coleta a concentração desses anticorpos já seriam detectáveis. De fato, observamos que o P1 iniciou com um PRNT50 de 1/146, o que levaria a um resultado negativo, caso não analisássemos seu último período de coleta, que obteve um PRNT50 1/828 (um aumento de 5,5x em sete dias).

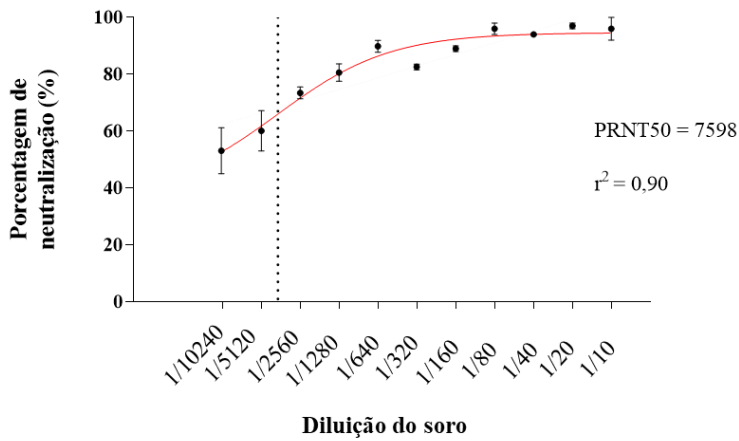
PRNT Paciente 01 Soro 1ª coleta



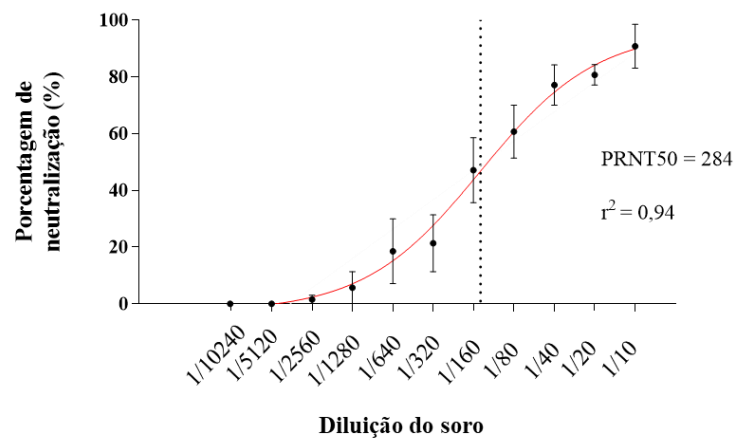
PRNT Paciente 01 soro 3ª coleta



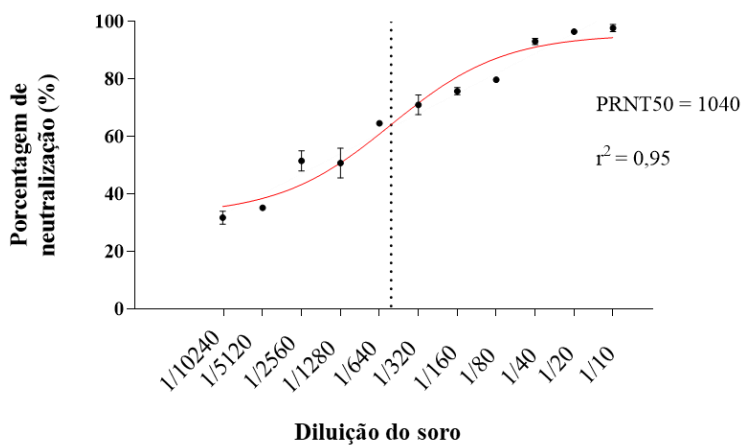
PRNT Paciente 06 Soro 1ª coleta



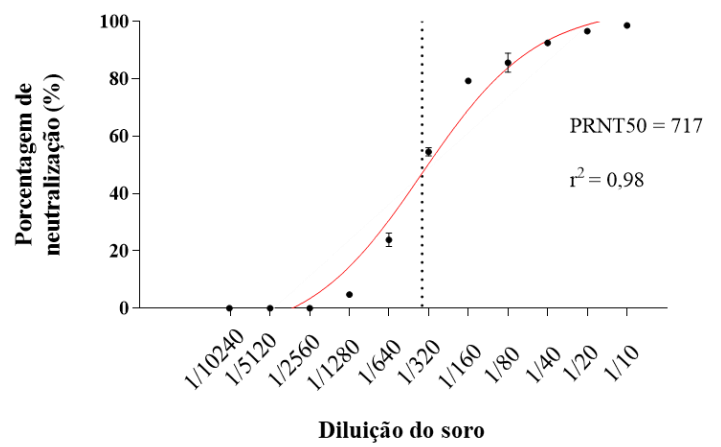
PRNT Paciente 06 soro 4ª coleta



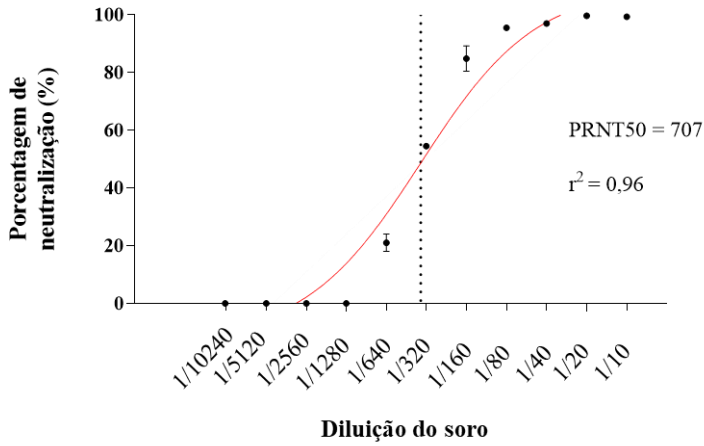
PRNT Paciente 11 Soro



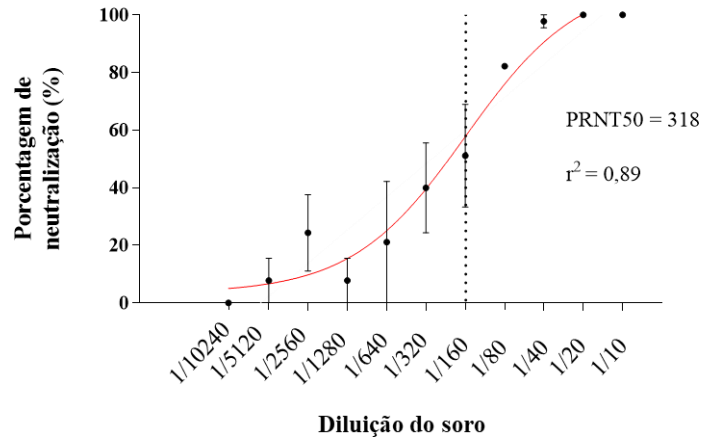
PRNT Paciente 65 Soro



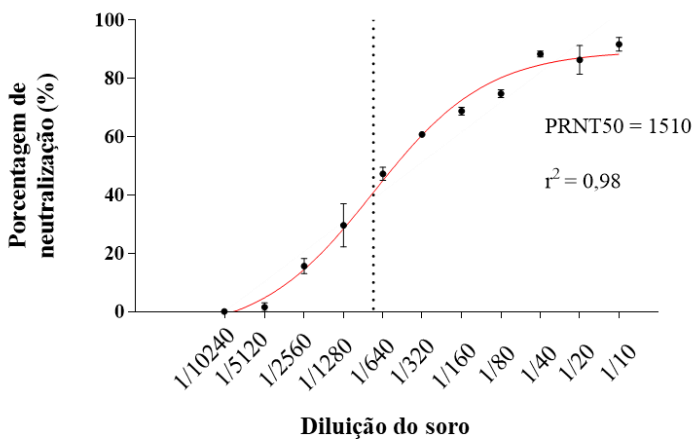
PRNT Paciente 44 Soro 1ª coleta



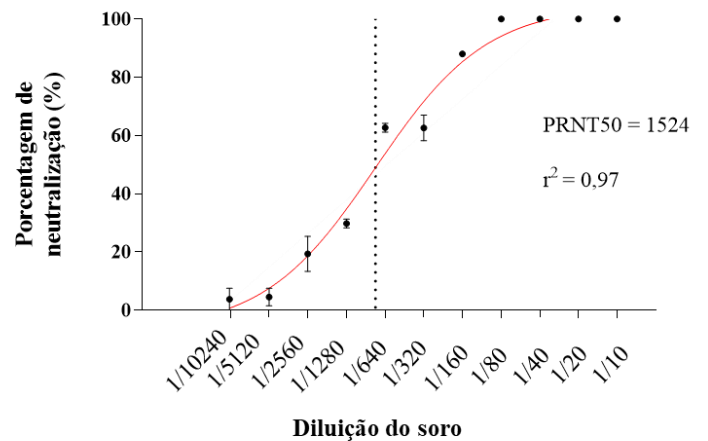
PRNT Paciente 44 Soro 2ª coleta



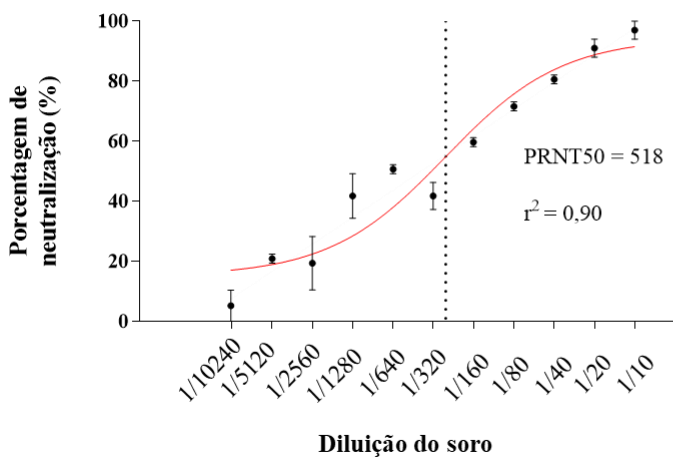
PRNT Paciente 54 Soro 1ª coleta



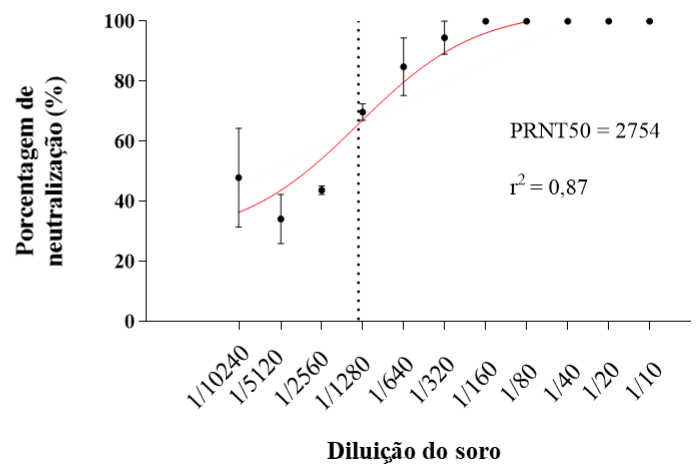
PRNT Paciente 54 Soro 5ª coleta



PRNT Paciente 57 Soro 3ª coleta



PRNT Paciente 59 Soro 3ª coleta



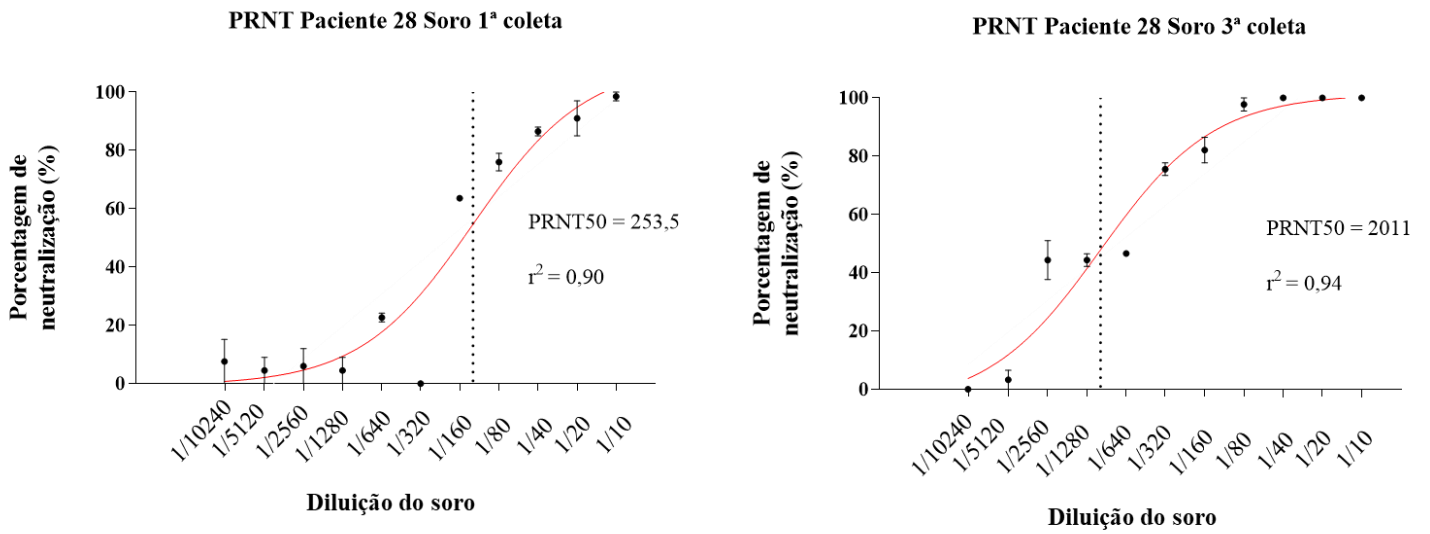


Figura 19. Gráficos dos ensaios de PRNT realizados no soro dos pacientes para observar a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV.

2. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a presença do ZIKV e de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV em uma coorte de pacientes com sintomas neurológicos sugestivos da SGB, atendidos no Hospital das Clínicas da cidade de Ribeirão Preto. Corroborando com as informações epidemiológicas pré-existent da SGB, a incidência da doença em nosso estudo foi principalmente em pacientes com 50 anos de idade ou mais, e em indivíduos do sexo masculino.

Como demonstrado, 81,8% dos pacientes com detecção para o ZIKV foram sintomáticos antes do desenvolvimento da SGB, o que demonstra um diferencial desse vírus nesses pacientes, já que na população em geral a maioria quando infectada é assintomática (12). O intervalo entre o período sintomático e o desenvolvimento da SGB foi de aproximadamente 15 dias, não havendo diferença em relação aos pacientes que não apresentaram detecção para o ZIKV. Resultados semelhantes também foram observados em outros trabalhos, como em Porto Rico (87), que obteve um intervalo de sete dias e não observou diferença relevante entre pacientes infectados e não infectados pelo ZIKV, bem como na Colômbia (86). Um intervalo relativamente curto de quatro dias foi registrado no México (88). Já um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro (85), observou um intervalo de 10 dias, bastante semelhante ao que obtivemos. Esses resultados em relação ao intervalo entre os sintomas e o surgimento da SGB seguiram um padrão já descrito na literatura para casos de SGB não relacionados a infecção pelo ZIKV como observado em infecções por *C. jejuni*, citomegalovírus, vírus Epstein-Bar, dentre outras, com registros de que os pacientes geralmente passam a desenvolver sintomatologia referente a síndrome dentro de duas a oito semanas (13).

A dissociação albuminocitológica foi uma característica presente nos pacientes diagnosticados com a SGB, tanto nos que tiveram a detecção do ZIKV quanto os que não tiveram. A porcentagem dentre os pacientes infectados que apresentaram a dissociação foi de 66,6%, mais da metade dos casos, porém menos expressiva do que a observada nos pacientes com a SGB infectados pelo ZIKV em Porto Rico (87), os quais 94,2% tiveram a dissociação albuminocitológica no LCR. Contudo, esse estudo trouxe diferenças na metodologia aplicada em relação ao presente trabalho. O *cutt-off* utilizado para avaliar a contagem da celularidade no LCR dos pacientes de Porto Rico foi de uma contagem ≤ 50 células/ μL , e o utilizado nos pacientes da presente pesquisa foi a contagem ≤ 10 células/ μL , e isso possibilitou que um maior número de pacientes em Porto Rico fossem caracterizados com a dissociação albuminocitológica. Além disso, além da técnica de qRT-PCR em tempo real empregada para a investigação da infecção pelo ZIKV, o trabalho também considerou teste de ELISA para a investigação sorológica de anticorpos IgM anti-ZIKV, o que sabidamente pode levar a um reconhecimento cruzado do DENV. Esse fator pode elevar também o número de casos positivos de infecção pelo ZIKV, e camuflar os aspetos essencialmente pertinentes a SGB em pacientes infectados pelo ZIKV.

O genoma do ZIKV foi detectado em 70,9% dos pacientes com a SGB, sendo que o material com a maior porcentagem de detecção foi a urina. O primeiro estudo sugerindo a relação do ZIKV com

a SGB realizado na Polinésia Francesa (13) durante a epidemia de ZIKV em 2013 a 2014 não obteve nenhum paciente com detecção do RNA viral de um total de 42 casos, resultado similar ao observado em Bangladesh (que de 18 pacientes diagnosticados com a SGB não houve nenhuma detecção. O estudo realizado dentre os pacientes do Rio de Janeiro obteve detecção em apenas três pacientes. O estudo realizado entre os pacientes da Colômbia (86) obteve 40% de detecção entre os pacientes com a SGB. Um estudo realizado no Brasil no estado do Rio de Janeiro obteve a detecção do material genético do ZIKV em apenas três de total de 35 pacientes diagnosticados com a SGB (85). Em Bangladesh 18 pacientes com a SGB foram investigados quanto a presença do genoma do ZIKV, e Um outro trabalho realizado em Porto Rico obteve resultados similares (87), demonstrando que de 71 pacientes diagnosticados com a SGB que tiveram amostras clínicas testadas, 28 apresentaram positividade para o ZIKV (39,4%).

A alta incidência da infecção pelo ZIKV nos pacientes diagnosticados com a SGB neste trabalho pode ser o reflexo do que já era observado na cidade de Ribeirão Preto, um local com elevadas taxas de infecção por DENV, com alta concentração de vetores *Aedes aegypti*, de clima quente, com alta proliferação desses vetores e sob forte vigilância epidemiológica por todo esse cenário. A chegada de mais uma arbovirose, de outro flavivírus se confundiu e se somou aos vários casos de dengue na cidade. Em fevereiro de 2016 já havia 2.326 casos suspeitos de ZIKV e a Secretaria da Saúde de Ribeirão Preto havia declarado epidemia pelo ZIKV e caos na rede pública de saúde. Além desses números se somavam também 2.064 casos de dengue confirmados apenas no mês de fevereiro. Um outro fator a ser considerado é que por ser uma cidade bastante desenvolvida, Ribeirão Preto recebe vários pacientes de cidades circunvizinhas de menor porte, para a realização de atendimento médico. Casos mais graves e raros como a SGB em sua grande maioria são trazidos para serem atendidos no hospital das Clínicas que é referência na região. Dessa forma, o número de casos diagnosticados com a SGB provinha não apenas da cidade de Ribeirão Preto, mas de outras cidades próximas da região interiorana do estado de São Paulo, que também notificaram vários casos suspeitos de infecção pelo ZIKV. Não foram encontrados boletins e informativos avaliando a incidência da SGB na população de Ribeirão Preto anterior ou após 2016, dessa forma tornando inviável a análise da incidência da síndrome após a infecção pelo ZIKV.

Os isolados obtidos são de grande relevância, pois reforçam efetivamente a relação causal entre o ZIKV e a Síndrome de Guillain-Barré. O ZIKV já foi isolado de vários materiais biológicos humanos como saliva (88,89), soro (91), sêmen (48), urina (89), dentre outros, contudo o isolamento do vírus no LCR de um paciente com SGB ainda não foi descrito na literatura, demonstrando a presença do ZIKV no SNC, o que aumenta as suspeitas de que a SGB pode ser desencadeada pela infecção prévia pelo ZIKV por um mecanismo ainda desconhecido.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho é de grande relevância para a contribuição no campo da patogenia da SGB relacionada a infecção pelo ZIKV. As alterações da infecção pelo ZIKV observadas nesses pacientes, desde a alta porcentagem de casos sintomáticos, a alta incidência da detecção do ZIKV nos indivíduos diagnosticados com a SGB, bem como a detecção desse vírus em mais de 50% dos LCRs analisados, os eventos de intermitência replicativa do ZIKV nesses pacientes, e o longo período de detecção de seu genoma formam um panorama de características únicas da infecção na SGB. O isolamento do ZIKV a partir de amostras clínicas desses pacientes, e o sequenciamento desses isolados, nos permitiram conhecer melhor características genotípicas importantes para avaliar possíveis diferenças entre as cepas já isoladas de vários casos de infecção pelo ZIKV e dentre os pacientes infectados diagnosticados com a SGB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. David Baud, D. J. (2017, Junho 21). An update on Zika virus infection. *The Lancet*, p. 11.
2. Musso D, G. D. (2016). Zika virus. *Clin Microbiol Rev*, pp. 487–524. Wikan N, S. D. (2016). Zika virus: a history of newly emerging arbovirus. *Lancet Infectious Disease*.
3. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009; 360: 2536-43.
4. Cao-Lormeau, V. M. (2014). RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2011.141380>
5. Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>
6. Zanluca, C., De Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., Dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>
7. Hennessey, M., Fischer, M., & Staples, J. E. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *American Journal of Transplantation*. <https://doi.org/10.1111/ajt.13743>
8. Cardoso, C. W., Paploski, I. A. D., Kikuti, M., Rodrigues, M. S., Silva, M. M. O., Campos, G. S., ... Ribeiro, G. S. (2015). Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2112.151167>
9. Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M. L., Horovitz, D. D. G., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., ... Sanseverino, M. T. V. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>
10. Ikejezie, J., Shapiro, C. N., Kim, J., Chiu, M., Almiron, M., Ugarte, C., ... Aldighieri, S. (2017). Zika Virus Transmission — Region of the Americas, May 15, 2015–December 15, 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6612a4>
11. Zika virus microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Geneva: World Health Organization, March 17, 2016 (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204633/1/zikasitrep_17Mar2016_eng.pdf).
12. Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *New Engl J Med*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
13. Cao-Lormeau, V. M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., ... Ghawché, F. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
14. Nóbrega, M. E. B. da, Araújo, E. L. de L., Wada, M. Y., Leite, P. L. e, Dimech, G. S., & Pércio, J. (2018). Outbreak of Guillain-Barré syndrome possibly related to prior Zika virus infection, Metropolitan Region of Recife, Pernambuco, Brazil, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742018000200016>

15. dos Santos, T., Rodriguez, A., Almiron, M., Sanhueza, A., Ramon, P., de Oliveira, W. K., ... Espinal, M. A. (2016). Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1609015>
16. Parra, B., Lizarazo, J., Jiménez-Arango, J. A., Zea-Vera, A. F., González-Manrique, G., Vargas, J., ... Pardo, C. A. (2016). Guillain–Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1605564>
18. Musso, D., Bossin, H., Mallet, H. P., Besnard, M., Brout, J., Baudouin, L., ... Baud, D. (2018). Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30446-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30446-2)
19. Swaminathan, S., Schlaberg, R., Lewis, J., Hanson, K. E., & Couturier, M. R. (2016). Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmc1610613>
20. Carteaux, G., Maquart, M., Bedet, A., Contou, D., Brugières, P., Fourati, S., ... Mekontso Dessap, A. (2016). Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1602964>
21. Karimi, O., Goorhuis, A., Schinkel, J., Codrington, J., Vreden, S. G. S., Vermaat, J. S., ... Grobusch, M. P. (2016). Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00502-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00502-X)
22. Dirlikov, E. et al. Postmortem findings in patient with Guillain–Barré syndrome and Zika virus infection. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 114–117 (2018).
23. Murray, K. O., Gorchakov, R., Carlson, A. R., Berry, R., Lai, L., Natrajan, M., ... Mulligan, M. J. (2017). Prolonged detection of zika virus in vaginal secretions and whole blood. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2301.161394>
24. Mansuy, J. M., Mengelle, C., Pasquier, C., Chapuy-Regaud, S., Delobel, P., Martin-Blondel, G., & Izopet, J. (2017). Zika virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161631>
25. Michlmayr, D., Andrade, P., Gonzalez, K., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0>
26. Furtado, J. M., Espósito, D. L., Klein, T. M., Teixeira-Pinto, T., & da Fonseca, B. A. (2016). Uveitis Associated with Zika Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1603618>
27. Parke, D. W., Almeida, D. R. P., Albini, T. A., Ventura, C. V., Berrocal, A. M., & Mitra, R. A. (2016). Serologically Confirmed Zika-Related Unilateral Acute Maculopathy in an Adult. *Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.06.039>
28. Tan, J. J. L., Balne, P. K., Leo, Y. S., Tong, L., Ng, L. F. P., & Agrawal, R. (2017). Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09479-5>

29. Miner, J. J., Sene, A., Richner, J. M., Smith, A. M., Santeford, A., Ban, N., ... Apte, R. S. (2016). Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.079>
30. Mead, P. S., Duggal, N. K., Hook, S. A., Delorey, M., Fischer, M., Olzenak McGuire, D., ... Hinckley, A. F. (2018). Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1711038>
31. Joguuet, G., Mansuy, J. M., Matusali, G., Hamdi, S., Walschaerts, M., Pavili, L., ... Bujan, L. (2017). Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30444-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30444-9)
32. Chimelli, L., & Avvad-Portari, E. (2018). Congenital Zika virus infection: a neuropathological review. *Child's Nervous System*. <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3651-3>
33. Adebajo T, Godfred-Cato S, Viens L, Fischer M, Staples JE, Kuhnert-Tallman W, et al. Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, October 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017;66(41):1089-99.
34. Alvarado, M. G., & Schwartz, D. A. (2017). Zika virus infection in pregnancy, microcephaly, and maternal and fetal health: What we think, what we know, and what we think we know. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0382-RA>
35. Oliveira Melo, A. S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., & Bispo De Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1002/uog.15831>
36. Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., & Petersen, L. R. (2016). Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMs1604338>
37. Pomar, L., Malinger, G., Benoist, G., Carles, G., Ville, Y., Rousset, D., ... Lambert, V. (2017). Association between Zika virus and fetopathy: a prospective cohort study in French Guiana. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1002/uog.17404>
38. De Oliveira Melo, A. S., Aguiar, R. S., Amorim, M. M. R., Arruda, M. B., De Oliveira Melo, F., Ribeiro, S. T. C., ... Tanuri, A. (2016). Congenital Zika virus infection: Beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurology*. <https://doi.org/10.1001/jNAMAeurol.2016.3720>
39. Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>
40. Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Castillo-Medina, L. F., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Halstead, S., ... Ramírez-Santana, C. (2018). Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00116>
41. Annamalai, A. S., Pattnaik, A., Sahoo, B. R., Muthukrishnan, E., Natarajan, S. K., Steffen, D., ... Pattnaik, A. K. (2017). Zika Virus Encoding Nonglycosylated Envelope Protein Is Attenuated and Defective in Neuroinvasion. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.01348-17>

42. Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., ... Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>
43. Lindenbach BD, Rice CM, Molecular biology of flaviviruses, *Advances in Virus Research*, 2003; 59:23-61.
44. Boyer, S., Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D., & Failloux, A.-B. (2018). An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>
45. Amraoui, F., Atyame-Nten, C., Vega-Rúa, A., Lourenço-De-Oliveira, R., Vazeille, M., & Failloux, A. B. (2016). Culex mosquitoes are experimentally unable to transmit zika virus. *Eurosurveillance*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.35.30333>
46. Guo, X. X., Li, C. X., Deng, Y. Q., Xing, D., Liu, Q. M., Wu, Q., ... Zhao, T. Y. (2016). Culex pipiens quinquefasciatus: A potential vector to transmit Zika virus. *Emerging Microbes and Infections*. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.102>
47. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev* 2016; **29**: 487–524.
48. Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141363>
49. Motta IJF, Spencer BR, Cordeiro da Silva SG, et al. Evidence for transmission of Zika virus by platelet transfusion. *N Engl J Med* 2016; **375**: 1101–03.
50. Besnard, M., Lastère, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>
51. Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., ... de Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
52. Musso, D., Roche, C., Nhan, T. X., Robin, E., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V. M. (2015). Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021>
53. Gourinat, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>
54. Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E., & Descloux, E. (2016). Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)00624-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)00624-3)
55. Musso, D., Richard, V., Teissier, A., Stone, M., Lanteri, M. C., Latoni, G., ... Busch, M. P. (2017). Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.006>
56. Atkinson, B., Hearn, P., Afrough, B., Lumley, S., Carter, D., Aarons, E. J., ... Hewson, R. (2016). Detection of Zika Virus in Semen. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2205.160107>

57. Tappe, D., Pérez-Girón, J. V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D. F., Jaenisch, T., ... Schmidt-Chanasit, J. (2016). Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase. *Medical Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0445-7>
58. Dowd, K. A., DeMaso, C. R., Pelc, R. S., Speer, S. D., Smith, A. R. Y., Goo, L., ... Pierson, T. C. (2016). Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.049>
59. Andrade, D.V., Harris, E., 2017. Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure. *Virus Res*.
60. Bardina, S.V., Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J.J., Brown, J.A., Nachbagauer, R., Foster, G.A., Krysztof, D., Tortorella, D., Stramer, S.L., Garcia-Sastre, A., Krammer, F., Lim, J.K., 2017. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science* 356(6334), 175-180.
61. Priyamvada, L., Quicke, K.M., Hudson, W.H., Onlamoon, N., Sewatanon, J., Edupuganti, S., Pattanapanyasat, K., Chokephaibulkit, K., Mulligan, M.J., Wilson, P.C., Ahmed, R., Suthar, M.S., Wrammert, J., 2016. 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* 113(28), 7852-7857.
62. Wijdicks EF, Klein CJ. Guillain–Barré Syndrome. *Mayo Clin Proc* 2017; 92: 467–479.
63. Anandan, C., Khuder, S. A., & Koffman, B. M. (2017). Prevalence of autonomic dysfunction in hospitalized patients with Guillain-Barré syndrome. *Muscle and Nerve*. <https://doi.org/10.1002/mus.25551>
64. Wakerley, B. R., & Yuki, N. (2015). Mimics and chameleons in guillain– barré and miller fisher syndromes. *Practical Neurology*. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2014-000937>
65. Bickerstaff ER. Brain-stem encephalitis; further observations on a grave syndrome with benign prognosis. *Br Med J* 1957;1:1384–7.
66. Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 2016; 388: 717–727.
67. Sejvar, J. J., Baughman, A. L., Wise, M., & Morgan, O. W. (2011). Population incidence of Guillain-Barré syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*. <https://doi.org/10.1159/000324710>
68. Van Den Berg, B., Walgaard, C., Drenthen, J., Fokke, C., Jacobs, B. C., & Van Doorn, P. A. (2014). Guillain-Barré syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.121>
69. Geleijns, K., Roos, A., Houwing-Duistermaat, J. J., van Rijs, W., Tio-Gillen, A. P., LNAMA, J. D., ... Jacobs, B. C. (2014). Mannose-Binding Lectin Contributes to the Severity of Guillain-Barre Syndrome. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.4211>
70. Sang, D., Chen, Q., Liu, X., Qu, H., Wei, D., Yin, L., & Zhang, L. (2012). Fc receptor like 3 in Chinese patients of Han nationality with Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neuroimmunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.03.006>

71. Heikema, A. P., Islam, Z., Horst-Kreft, D., Huizinga, R., Jacobs, B. C., Wagenaar, J. A., ... Endtz, H. P. (2015). *Campylobacter jejuni* capsular genotypes are related to Guillain-Barré syndrome. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.031>
72. Araujo, A. Q. C., Silva, M. T. T., & Araujo, A. P. Q. C. (2016). Zika virus-associated neurological disorders: A review. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/aww158>
73. Ralapanawa, D. M. P. U. K., Kularatne, S. A. M., & Jayalath, W. A. T. A. (2015). Guillain-Barre syndrome following dengue fever and literature review. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1672-0>
74. Oehler, E., Fournier, E., Leparç-Goffart, I., Larre, P., Cubizolle, S., Sookhareea, C., ... Ghawche, F. (2015). Increase in cases of guillain-barré syndrome during a chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014 to 2015. *Eurosurveillance*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.48.30079>
75. Jacobs, B. C., Rothbarth, P. H., Van Der Meché, F. G. A., Herbrink, P., Schmitz, P. I. M., De Klerk, M. A., & Van Doorn, P. A. (1998). The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: A case-control study. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.51.4.1110>
76. Hadden, R. D. M., Karch, H., Hartung, H. P., Zielasek, J., Weissbrich, B., Schubert, J., ... Toyka, K. V. (2001). Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barré syndrome. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.6.758>
77. Islam, Z., Jacobs, B. C., Van Belkum, A., Mohammad, Q. D., Islam, M. B., Herbrink, P., ... Endtz, H. P. (2010). Axonal variant of Guillain-Barré syndrome associated with *Campylobacter* infection in Bangladesh. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181cff735>
78. Ogawara, K., Kuwabara, S., Mori, M., Hattori, T., Koga, M., & Yuki, N. (2000). Axonal Guillain-Barre syndrome: Relation to anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* infection in Japan. *Annals of Neurology*. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200010\)48:4<624::AID-ANA9>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200010)48:4<624::AID-ANA9>3.0.CO;2-O)
79. Yuki, N., Susuki, K., Koga, M., Nishimoto, Y., Odaka, M., Hirata, K., ... Yamada, M. (2004). Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402391101>
80. Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., ... Miyatake, T. (1993). A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *The Journal of Experimental Medicine*.
81. Asbury, A. K., & Cornblath, D. R. (1990). Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.410270707>
82. Wakerley, B. R., Uncini, A., & Yuki, N. (2014). Guillain-Barré and miller fisher syndromes - New diagnostic classification. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.138>
83. Sejvar, J. J., Kohl, K. S., Gidudu, J., Amato, A., Bakshi, N., Baxter, R., ... Wiznitzer, M. (2011). Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.003>

84. Jasti, A. K., Selmi, C., Sarmiento-Monroy, J. C., Vega, D. A., Anaya, J. M., & Gershwin, M. E. (2016). Guillain-Barré syndrome: causes, immunopathogenic mechanisms and treatment. *Expert Review of Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1193006>
85. Da Silva, I. R. F., Frontera, J. A., De Filippis, A. M. B., & Do Nascimento, O. J. M. (2017). Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. *JAMA Neurology*. <https://doi.org/10.1001/jNAMAeurol.2017.1703>
86. Parra, B., Lizarazo, J., Jiménez-Arango, J. A., Zea-Vera, A. F., González-Manrique, G., Vargas, J., ... Pardo, C. A. (2016). Guillain-Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1605564>
87. Dirlikov, E., Major, C. G., Medina, N. A., Lugo-Robles, R., Matos, D., Muñoz-Jordan, J. L., ... Rivera-García, B. (2018). Clinical features of Guillain-Barré syndrome with vs without zika virus infection, Puerto Rico, 2016. *JAMA Neurology*. <https://doi.org/10.1001/jNAMAeurol.2018.1058>
88. Soto-Hernández, J. L., Ponce de León Rosales, S., Vargas Cañas, E. S., Cárdenas, G., Carrillo Loza, K., Díaz-Quiñonez, J. A., ... Kuri Morales, P. (2019). Guillain-Barré Syndrome Associated With Zika Virus Infection: A Prospective Case Series From Mexico. *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00435>
89. Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Lavezzo E, Brugnarò P, Palù G. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Euro Surveill*. 2016;21(10):pii=30159. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917>
90. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, dos Santos AAC, Menezes LSR, da Cruz SOD, et al. (2016) Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6): e0004816. doi:10.1371/journal.pntd.0004816
91. Musso, D., Nilles, E.J., Cao-Lormeau, V.M., 2014b. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O595–O596.