

REVIEW ARTICLE

ZIKA VÍRUS ASSOCIADO À MICROCEFALIA

Hugo Leonardo dos Santos Menezes¹, Júnia Nunes Pacheco¹, Nayara Rubia Tomal¹, Virgílio Ribeiro Guedes²

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) é um emergente flavivírus transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. Inicialmente foi isolado de um macaco *Rhesus* utilizado para monitoramento da febre amarela na floresta Zika, localizada em Uganda em 1947. Após a primeira infecção humana pelo ZIKV, casos ocorreram no Sudeste Asiático, África subsaariana, Polinésia francesa, Nova Caledônia, Ilhas *Cook* e Ilha da Páscoa. Atualmente, o Brasil é o lugar com maior número de infecções notificadas pelo vírus. Após o aumento de casos de microcefalia no estado do Pernambuco em outubro de 2015, foram reconhecidas importantes evidências da relação existente entre a presença do vírus e a ocorrência de microcefalia e óbitos neonatais.

Palavras-chave: Zika vírus; Microcefalia; Transmissão vertical.

¹ Graduando do Curso de Medicina pela Fundação Universidade Federal do Tocantins;

² Professor orientador: Mestrando em ciências da Saúde e Professor da Fundação Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

Hugo Leonardo dos Santos Menezes. Endereço para correspondência: Quadra 103 norte, rua NO 07, lote 16, apto 06; email: hugolsmenezes@gmail.com

ZIKA VIRUS ASSOCIATED WITH MICROCEPHALY

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an emerging flavivirus transmitted by mosquitos from the *Aedes* genus. It was initially isolated from a rhesus monkey used for monitoring yellow fever in Zika forest, located in Uganda in 1947. After the first human infection, ZIKV cases occurred in Southeast Asia, sub-Saharan Africa, French Polynesia, New Caledonia, Cook Islands and Easter Island. Currently, Brazil is the country with the highest number of reported infections by the virus. After increased cases of microcephaly in the state of Pernambuco in October 2015, important evidence of the relationship between the presence of the virus and the occurrence of microcephaly and neonatal deaths were recorded.

Keywords: Zika virus; Microcephaly; Vertical transmission.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo ZIKV se dá por picada de mosquitos do gênero *Aedes* (i.e. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*). Trata-se de um vírus de descoberta recente sendo o Brasil o maior afetado atualmente. No entanto, é impossível reconhecer o número real de infecções, pois é uma doença em que 80% dos casos são oligossintomáticos ou subclínicos, levando grande parte dos doentes a não procurarem serviço de saúde. Além disso, até o momento não existem testes sorológicos disponíveis, apenas identificação do RNA do zika vírus por RT-PCR em tempo real (teste de reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa) durante o quadro agudo da doença. Há ainda testes que utilizam imunoglobulina M (IgM) e anticorpos neutralizantes, os quais podem ser colhidos após quatro dias do início dos sintomas, mas têm especificidade não confiável, uma vez que podem se positivar por reação cruzada com anticorpos de outros flavivírus. Sendo o diagnóstico definitivo da doença de alto custo, não há em quantidade disponível.

Considerando todas as limitações, o Ministério da Saúde (MS) estimou o número de casos de infecções pelo Zika vírus a partir dos casos descartados para dengue e projeção com base na literatura internacional. Assim, a estimativa de casos de infecção pelo ZIKV no Brasil, para 2015, ficou entre 497.593 a 1.482.701 casos. O quadro clínico clássico de infecção se assemelha ao da dengue e ao da chikungunya e se manifesta por início abrupto de febre, cefaleia, artralgia, mialgia, conjuntivite não purulenta e exantema maculopapular, ou seja, um complexo de sintomas que dificulta o diagnóstico diferencial. Em outubro de 2015, o surto de microcefalia no Estado do Pernambuco levou o MS a investigar um evento raro e contrário ao perfil clínico e epidemiológico do Estado.

A microcefalia, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é uma malformação congênita de etiologia complexa e multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais, identificada através da medição do Perímetro Cefálico (PC). Recentemente esta organização atualizou novos parâmetros para o diagnóstico de microcefalia: sendo PC

igual ou inferior a 31,9 centímetros, para meninos, e, para meninas, igual ou inferior a 31,5 centímetros. Os valores citados valem para bebês nascidos com 37 semanas ou mais semanas de gestação. Para bebês prematuros a mudança ocorrerá na curva de referência para definição de caso suspeito de microcefalia. O novo padrão foi adotado pelo MS no dia 09 de março do ano de 2016 com o objetivo de padronizar as referências para todos os países.

Além da transmissão pelo artrópode, infecções pelo Zika vírus têm sido documentadas por transmissão intrauterina resultando em infecção congênita, transmissão intra-parto por mães em período de viremia, transmissão sexual, por transfusão sanguínea e por exposição em laboratório. Existe ainda, o receio de que uma transmissão por transplante de tecido ou órgão possa ocorrer e apesar de o ZIKV ter sido encontrado no leite materno, esse tipo de transmissão não foi documentada.

A possível relação entre infecção pelo ZIKV e a ocorrência aumentada de casos de microcefalia surgiu pela

concomitância com o surto de infecções e aqui serão apresentadas evidências descritas em algumas literaturas sobre tal relação.

REVISÃO DE LITERATURA

Por ser algo novo, a relação do vírus com a microcefalia possui poucos estudos que a comprovam. O Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia relacionada à infecção pelo Zika Vírus (2015) apresenta as evidências pelas quais o Ministério da Saúde (MS) reconheceu a relação estudada. Constatou-se nesse protocolo que os primeiros meses de gestação das mulheres com crianças microcefálicas corresponderam ao período de maior circulação do ZIKV na região Nordeste. Após investigação epidemiológica de prontuários e entrevistas com mais de 60 gestantes, as quais referiram doença exantemática e cujas crianças nasceram com microcefalia, não tiveram histórico de doença genética na família e/ou exames de imagem sugestivos de processo infeccioso já conhecido.

Profissionais de diversas áreas da medicina (infetologia, pediatria, neuropediatria, ginecologia, genética, etc.) fizeram observações de que há

alteração no padrão clínico individual desses casos, os quais apresentam características de comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC), similar às infecções congênitas por arbovírus em animais, descritos na literatura. Evidenciou-se também na literatura o neurotropismo do ZIKV, a partir de um modelo animal, o aumento na frequência de quadros neurológicos relatados na Polinésia Francesa e no Brasil após infecção pelo vírus com confirmação em Pernambuco (após isolamento do vírus em paciente com síndrome neurológica aguda). Na Polinésia Francesa houve identificação de casos de microcefalia após notificação do Brasil à Organização Mundial da Saúde (OMS). Foi constatada relação da infecção pelo ZIKV com quadros graves e óbitos a partir da identificação do RNA viral e resultados negativos para os demais vírus conhecidos, como dengue e chikungunya, provando que é um vírus com alto potencial de gravidade. Além disso, houve isolamento do vírus em líquido amniótico de duas gestantes cujo feto apresentava microcefalia, no interior da Paraíba, consistente com infecção intrauterina, identificação de

óbitos de recém-nascidos com malformações e padrão sugestivo de infecção no Estado do Rio Grande do Norte e outros Estados e identificação de recém-nascido, no estado do Ceará, com diagnóstico de microcefalia durante a gestação com resultado positivo para o ZIKV, tendo evoluído para óbito nos primeiros 5 minutos de vida.

Essas evidências foram base para que o Ministério da Saúde reconhecesse o Zika vírus como causa de microcefalia fetal e tomasse medidas de prevenção. Assim, após esta relação tomar conhecimento mundial, vários países, concomitantemente ao Brasil, iniciaram estudos sobre os casos de microcefalia.

Um estudo realizado no Brasil e publicado no *Morbidity and Mortality Weekly Report* (MMWR) do Centro de Controle de Doenças (CDC) do E.U.A. evidenciou a presença de Zika vírus em líquido amniótico de gestantes cujo feto era microcefálico comprovado por ultrassonografia (USG). Este mesmo estudo acompanhou 35 crianças, nascidas entre agosto e outubro de 2015 em oito estados Brasileiros, cujas mães

moravam ou visitaram regiões afetadas pelo vírus. Das 35 mães, 26 (74%) delas relataram exantema durante a gestação (21 no primeiro trimestre e 5 no segundo trimestre). Observou-se que 25 crianças (71%) tinham microcefalia severa (PC >3 SD abaixo da média para sexo e idade gestacional no nascimento), 17 (49%) tinham ao menos uma anormalidade neurológica e entre as 27 crianças que foram submetidas a estudos por imagem, todas tinham anormalidades nas imagens. As alterações foram vistas através de tomografia computadorizada e ultrassonografia transfontanela e mostraram um padrão de calcificações difusas pelo cérebro, principalmente em áreas periventriculares, área parenquimatosa e área talâmica.

Na região dos gânglios basais havia em, aproximadamente um terço dos casos, anormalidades de migração celular (e.g., lisencefalia, paquigiria), além de aumento ventricular secundário à atrofia cortical e subcortical. Observou-se também que o couro cabeludo de 11 crianças (31% dos casos) cresceu normalmente, sugerindo injúria cerebral aguda e parada de crescimento cerebral, mas não da pele.

Isso é compatível com a predileção por tecido neuronal visto em outros estudos. Testes para outras infecções congênicas como sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes simples tiveram resultado negativo.

Um estudo publicado no *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* reforça as evidências mostradas no artigo anterior ao descrever dois casos de microcefalia nos quais demonstravam, através de estudos ecográficos, várias alterações no encéfalo, como o aumento dos ventrículos, atrofia parenquimatosa, alterações de gânglios da base, que também foram vistos no estudo anterior, além de catarata bilateral e calcificações intraoculares. Este estudo relata que infecções intrauterinas que afetam o cérebro são raras, mas que devem ser destacadas as já conhecidas, citadas no estudo anterior. Dessa forma, o artigo compara as alterações cerebrais desses dois fetos com as alterações congênicas já conhecidas como, por exemplo, na infecção por citomegalovírus, que tem um quadro similar, porém com padrões menos severos e destrutivos. Além disso, diferem da infecção por toxoplasmose por não apresentarem os

nódulos característicos desta infecção. Por fim, o estudo constata que as calcificações são sugestivas de infecções intrauterinas, o que reforça a teoria de transmissão congênita, mas, em contrapartida, revela que estes dois fetos apresentaram danos severos no cerebelo, tálamo e tronco cerebral, que são raramente associados a infecções intrauterinas.

Em fevereiro deste ano, Mlakar *et al.*, publicou um relato de caso no *New England Journal of Medicine* sobre uma gestante europeia que morava em Natal e teve quadro de doença exantemática na décima terceira semana de gestação. Ela foi acompanhada por um serviço especializado na Eslovênia. Uma USG realizada com 29 semanas, idade em que a gestante identificou redução dos movimentos fetais, evidenciou anomalia fetal. Outra USG realizada com 32 semanas confirmou RCIU (estimado terceiro percentil de peso fetal), líquido amniótico normal, placenta medindo 3,5 cm de espessura (tamanho normal) com inúmeras calcificações, perímetro cefálico abaixo do segundo percentil para a gestação (microcefalia), ventriculomegalia e um diâmetro transcerebelar abaixo do

segundo percentil. Foi dado um prognóstico ruim para tais alterações e a mãe solicitou interrupção da gravidez, sendo uma autópsia completa realizada com tecidos fetais e maternos (placenta). Na investigação microbiológica, obtiveram resultados positivos para o Zika vírus no ensaio RT-PCR apenas na amostra de cérebro fetal (negativo para as amostras de outros órgãos coletados) e uma sequência completa do genoma do vírus foi recuperada com posterior análise filogenética que evidenciou que a estirpe brasileira do vírus surgiu da asiática, com diferenças em duas substituições de aminoácidos. Essa alteração indica uma eventual adaptação ao ambiente, porém mais pesquisas devem ser realizadas para novas conclusões. A análise histo-patológica identificou graves lesões em diversas partes do sistema nervoso central e a associação entre a infecção pelo ZIKV e anomalias fetais cerebrais foi observada por microscopia eletrônica demonstrando partículas densas no retículo endoplasmático danificado, consistentes com a detecção do vírus no cérebro fetal. As características histopatológicas mais proeminentes

eram coleções multifocais de filamentos, calcificações neuronais em forma de grânulos no córtex e substância branca subcortical com o envolvimento focal de toda a fita cortical ocasionalmente associado com deslocamento cortical. Esteve presente astrogliose difusa com explosão astrocitária focal para o espaço subaracnoideo, principalmente na convexidade dos hemisférios cerebrais. Durante a maior parte da substância cinzenta e branca cerebral estavam presentes células microgliais ativadas e alguns macrófagos que expressam HLA-DR. Alguns infiltrados perivascularares dispersos presentes na substância branca subcortical estavam presentes, compostos por células T e algumas células B. O cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal não mostraram nenhuma inflamação nem calcificações distróficas. O tronco cerebral e a medula espinhal mostraram degeneração Walleriana das vias longas ascendentes, especialmente o trato corticoespinhal lateral, enquanto que a ascensão das colunas dorsais foram bem preservadas. A localização do sinal de imunofluorescência e a aparência morfológica das calcificações, que se

assemelhava a estruturas neuronais destruídas, indicam uma possível localização do vírus nos neurônios. O neurotropismo do vírus não tem causas conhecidas, mas o estudo suspeita de que o vírus permanece no cérebro fetal por este ser um meio imunologicamente favorável. Sendo assim, este foi um caso que comprovou lesões graves no SNC ocasionadas pelo ZIKV, adquirido pelo feto por transmissão vertical (comprovada por calcificações na placenta e uma baixa proporção de peso placenta-feto, indicando danos placentários ocasionados pelo vírus).

Uma pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz e da Universidade da Califórnia (EUA), publicada no site da revista científica *The New England Journal of Medicine* acompanhou em setembro de 2015, antes mesmo de o Ministério da Saúde decretar emergência em saúde pública, 88 mulheres com sintomas de zika, como exantema, conjuntivite, cefaleia e artralgia. Os exames deram positivo para zika em 72 mulheres (82%): 42 aceitaram ser acompanhadas e passaram por USG; as demais alegaram que o local para os exames era distante de casa ou se negaram a fazer os testes por

temer os resultados. As 16 que tiveram teste para zika negativo, também foram realizadas ultrassonografias.

Todas eram previamente híginas, e não apresentavam nenhum outro fator de risco além de terem contraído zika – possíveis causas de microcefalia, como sífilis, citomegalovírus e rubéola haviam sido descartadas nos exames. Um dado chamou a atenção dos pesquisadores e foi registrado no trabalho: 88% das grávidas já haviam tido dengue, confirmado por exames sorológicos. As mulheres relataram ainda que outros parentes haviam contraído zika – 21% delas disseram que seus companheiros adoeceram.

Das 42 mulheres acompanhadas, 12 esperavam fetos com malformações. As ultrassonografias mostraram que cinco deles tinham restrição de crescimento intrauterino (com ou sem microcefalia); quatro apresentavam calcificações cerebrais, dois tinham outras lesões do sistema nervoso central; quantidade insuficiente de líquido amniótico foi percebida em sete crianças. Quatro fetos tinham fluxo anormal nas artérias cerebrais ou umbilicais.

Os filhos de mulheres contaminadas entre a 5^a e a 38^a semanas de gravidez apresentaram malformações, como microcefalia, calcificações cerebrais, restrição de crescimento intrauterino e ausência de hemisférios cerebrais. A infecção pelo vírus também afetou a função placentária e houve casos de grávidas com pouco líquido e até mesmo com ausência de líquido amniótico. Dois fetos morreram e suas mães haviam adoecido na 25^a e na 32^a semanas de gestação

DISCUSSÃO

O Zika vírus se espalhou explosivamente pela América do Sul e América Central, com mais de um milhão de casos suspeitos durante os últimos meses juntamente com um aumento substancial no número de casos de nascidos com microcefalia ou alterações neurológicas.

No Brasil, país com o maior número de infecção pelo Zika vírus identificados até o momento, de outubro de 2015 até o dia 06 de janeiro de 2016 foram notificados 4783 casos de microcefalia em 21 estados do país. A incidência chegou a 20/10000 nascidos

vivos, taxa essa 20 vezes maior que os anos anteriores, incluindo 76 mortes neonatais.

Infecções congênicas podem afetar múltiplos órgãos e muitos estão associados com danos cerebrais específicos, incluindo microcefalia, calcificações (predominantemente nas regiões periventricular, nos gânglios basais e parênquima cerebral), ventriculomegalia, desordens migratórias neuronais (paquigiria, polimicrogiria, lisencefalia e esquizencefalia), hipoplasia cerebelar e anormalidades de substância branca.

Estudos demonstraram que fetos de mães comprovadamente infectadas com o ZIKV possuem danos mais severos no SNC e o padrão se diferencia das demais infecções congênicas já conhecidas. Além disso, a concentração do ZIKV em tecido cerebral e em mais nenhum outro tipo de tecido, demonstrado por estudo histopatológico de um feto, demonstra seu neurotropismo, o qual ainda não possui causa conhecida. A transmissão vertical fica evidenciada quando mães que tiveram sintomas da doença durante a gestação com diagnóstico de

microcefalia fetal por imagem ultrassonográfica e posterior pesquisa do ZIKV no líquido amniótico positiva. Além disso, a análise histopatológica de uma placenta corrobora a transmissão vertical quando evidencia calcificações e uma baixa proporção de peso placenta-feto, indicando danos placentários ocasionados pelo vírus. Outro fato confirmado por estudo caso-controlado citado foi a confirmação de que a transmissão vertical pode ocorrer em qualquer idade gestacional.

É importante destacar que para que os danos causados pelo ZIKV aos fetos sejam completamente dissociados de outras infecções, a gestante com história de doença exantemática deve passar por anamnese completa sobre história familiar, histórico vacinal (o programa de vacinação brasileiro tem eliminado algumas infecções que causam anormalidades congênicas, como a rubéola) e exames para comprovação da presença do ZIKV. Esse é o meio de triagem adotado pelo MS para investigação de gestante com suspeita de infecção pelo ZIKV.

A infecção se alastrou e tomou níveis desproporcionais. A extensão

total da doença ainda não está clara, uma vez que a maioria das infecções é assintomática e muitas estão associadas apenas a casos leves da doença. Porém, a busca ativa de mulheres em idade fértil e a realização de um pré-natal adequado nas gestantes, medidas preconizadas pelo MS, levarão a maior detecção de casos suspeitos de infecção pelo ZIKV e o posterior acompanhamento desses fetos. Assim, mais casos poderão ser investigados.

Sabe-se que a microcefalia geralmente resulta do desenvolvimento anormal do cérebro. As consequências futuras deste acometimento dependem das anormalidades cerebrais subjacentes e podem variar de atrasos moderados de desenvolvimento até deficiência motora e intelectual severa, como a paralisia cerebral. As investigações que buscam a comprovação do ZIKV como mais uma causa de microcefalia são extremamente importantes para o reconhecimento real dos danos e o potencial desse novo vírus.

Além dos estudos cada vez mais corroborarem a positividade da relação questionada nesse artigo, existem pontos falhos na investigação que

devem ser citados. Em primeiro lugar, a prevalência do nascimento histórico de microcefalia no Brasil, aproximadamente 0,5 casos por 10.000 nascidos vivos, calculadas a partir de certidões de nascimento, foi menor do que as estimativas previstas de 1-2 casos por 10.000 nascidos vivos, o que pode indicar avaliação deficiente da microcefalia no Brasil. No entanto, durante o segundo semestre de 2015 sozinho, mais de 3.000 casos suspeitos de microcefalia (cerca de 20 casos por 10.000 nascidos vivos) foram relatados para o Ministério da Saúde por meio do protocolo de notificação especial do ZIKV, sugerindo um acentuado aumento na incidência de nascimento, embora isso possa ser devido ao aumento da notificação especial. Segundo, antes do alerta em novembro feito pelo MS, embora descrições de anomalias congênitas tivessem sido feitas, o perímetro cefálico infantil não era rotineiramente registrado. Por isso, é possível que os casos brandos de microcefalia possam não ter sido notificados. Adicionalmente, com a cobertura do surto pela mídia, a vigilância para microcefalia e a notificação médica de casos suspeitos

têm aumentado e isso pode superestimar os casos de microcefalia.

CONCLUSÃO

A relação de ZIKV e microcefalia é inegável, apesar de poder ter ocorrido superestimação dos casos. O primeiro desafio diante dessa nova doença é esclarecer e comprovar com mais estudos os riscos da doença durante a gestação, a história natural da doença e tratamento eficaz em caso de gestante infectada. Concomitantemente, desenvolver novas técnicas de diagnóstico é fundamental, pois o RT-PCR detecta o RNA do flavivírus e, portanto deve ser positivo apenas durante o período de viremia, que pode ser relativamente curto. Métodos sorológicos atuais têm considerável reação cruzada com outros flavivírus, aumentando o número de falsos positivos detectados e diminuindo o valor preditivo positivo do teste.

Essa epidemia, sem dúvidas, vai desafiar nossa saúde pública em todas as áreas, desde pesquisa e produção de vacinas até promoção, prevenção e reabilitação da saúde da população atingida. A geração de crianças microcefálicas vai precisar de todo o

apoio de uma equipe de saúde multiprofissional e de investimento governamental em reabilitação e reinserção social dessas crianças.

O Brasil, sendo o principal afetado, deve investir em mais pesquisas para compreender melhor as potenciais implicações dessas observações. É provável que a rápida disseminação da ZIKV em todo o mundo será um forte impulso para a investigação e colaboração sobre as propriedades biológicas do vírus, particularmente pela alta carga emocional e econômica gerada pelo risco neurotrópico e teratogênico da infecção pelo vírus na sociedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolo de atenção à saúde e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika.** 2015. 49p. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças

- Transmissíveis. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika.** 2015. 79p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde investiga 3.852 casos suspeitos de microcefalia no país.** 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php./cidadao/principal/age-ncia-saude/22145-ministerio-da-saude-investiga-3-852-casos-suspeitos-de-microcefalia-no-pais>>. Acesso em: 05 mar, 2016.
 - BRASIL, P.P.; GABAGLIA JP. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro – Preliminary Report. **N engl J Med**,2016.
 - HENNESEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J.E. Zika Virus Spreads to New Areas – Region of the Americas, May 2015 – January 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 65(3):55-58, 2016.
 - MLAKAR, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. **N Engl J Med.** 374(10): 951-8, 2016.
 - OLIVEIRAMELO, A.S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound Obstet Gynecol.** 47: 6–7, 2016.
 - RUBIN, E.J; GREENE, M.F.; BADEN, L.R. Zika Virus and Microcephaly. **N Engl J Med.** 2016.
 - SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible association between Zika Virus Infection and Microcephaly – Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** 65:59-62. 2016.
 - SILASI, M. et al. Viral infections during pregnancy. **Am J Reprod Immunol.** 73:199–213, 2015.
 - STOCKOLMEUROPEAN CEN TREFORDISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome.** 2015. Disponível em:

<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-virus-amrecias-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>.

12. TORJESEN, I. Zika Virus outbreaks prompt warnings to pregnant women. **BMJ**, 352:i500, 2016.