



Universidade de Santo Amaro

Curso de Medicina Veterinária

Fernando Setsuo Kano

VÍRUS DO OESTE DO NILO: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

São Paulo

2016



Universidade de Santo Amaro

Curso de Medicina Veterinária

Fernando Setsuo Kano

VÍRUS DO OESTE DO NILO: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção do título Bacharel em Medicina Veterinária. sob orientação do M.V. Prof. Dr. César Augusto Dinóla Pereira

São Paulo

2016

Fernando Setsuo Kano

VÍRUS DO OESTE DO NILO, UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção dos títulos Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: M.V Prof. Dr. César Augusto Dinóla Pereira.

São Paulo, ____ de _____ de 20

Banca Examinadora

M.V. Prof. Dr. César Augusto Dinóla Pereira

M.V. Prof. Dr.

Dedico este trabalho à minha família e namorada, que foram essenciais para a conclusão deste curso, perante as dificuldades, emoções e conhecimento durante este percurso. Também dedico ao meu orientador M.V. Prof. Dr. César Augusto Dinóla Pereira pelo apoio, generosidade e grande ajuda para a conclusão deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, meu pai Agnaldo Tsuyochi Kano, minha mãe Lilian Setsuko Kageyama Kano, meus avós Minoru Kano e Mitiko Kano, e minha irmã Fabiany Sayuri Kano que estiveram sempre presentes me apoiando e dando forças para que eu continuasse na luta durante essa etapa da minha vida. Com eles sempre me senti seguro para continuar.

Um agradecimento em especial para minha namorada Victoria Arrifano Moraes, que compartilhou comigo esse momento, foi muito paciente em momentos críticos, me ajudou bastante me dando dicas, apoio moral e me incentivando muito para o desenvolvimento deste e todos os outros trabalhos da universidade.

Agradeço também aos meus amigos e colegas da universidade que sempre torceram por mim e me apoiaram

Também agradeço meu cachorro Hachi por sempre estar presente, independente da situação, sempre contente, com seu olhar tentando me tranquilizar e animar.

Agradeço meu orientador professor doutor Cesar Augusto Dinola Pereira por gentilmente ter me ajudado e guiado no decorrer deste trabalho, me dando todo suporte necessário.

Agradeço a Deus por mais essa conquista.

Enfim, um muito obrigado a todos que me apoiaram nessa jornada.

RESUMO

O vírus do Oeste do Nilo, do inglês *West Nile virus* (WNV) membro da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus* (do latim flavus – amarelo) é um agente muito difundido pelo mundo, incluindo a América do Norte e Central. A grande proximidade com a América do sul chama atenção para o Brasil, principalmente quando se pensa na forma de transmissão do agente, sendo esta, por meio de aves migratórias e mosquitos, o que é comum no país. A infecção por este agente ocasiona, principalmente, alterações no sistema nervoso central (SNC), como a encefalite e em seu ciclo estão presentes, além das aves e mosquitos, também equinos e o ser humano, tornando esta doença de grande importância epidemiológica. Faz-se necessário o monitoramento da epidemiologia brasileira a respeito deste patógeno e pensando nisso, o presente trabalho abordará, em forma de revisão bibliográfica, aspectos relativos ao agente, como etiologia, patogenia, manifestações clínicas, métodos diagnósticos, dando ênfase na epidemiologia, com a finalidade de contribuir com o conhecimento sobre a atual situação do WNV no Brasil.

Palavras-chave: Vírus do Oeste do Nilo, patogenia, manifestações clínicas, diagnóstico e epidemiologia.

ABSTRACT

The West Nile Virus (WNV) member of the family *Flaviviridae*, genre *Flavivirus* (from Latin flavus-yellow) is an agent very spread out in the world, including North and Central America. The great proximity with South America calls attention to Brazil, mainly when is thinking is the way of agent transmission, through migratory birds and flies, that is common in the country. The infection by this agent occurs mainly alteration in the central nervous system (CNS) like encephalitis in its cycle, is presented besides birds and flies, either equinus and humans getting this illness into a big epidemiologic importance. It s necessary the monitory of Brazilian epidemiology toward this illness an thinking about the present work will treat, in the way of bibliographic revision, relative aspects to the agent, such as etiology, pathology, clinical manifestation, diagnosis methods, giving attention in the epidemiologic, with the actual knowledge about the situation of WNV in Brazil

Key-words: West Nile Virus, patogeny, clinical manifestation, diagnosis and epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 Morfologia e estrutura das partículas víricas da família. A) Foto de microscopia eletrônica de vírions do vírus do Nilo Ocidental (WNV); B) Ilustração esquemática de uma partícula vírica com os seus componentes..... | 12 |
| Figura 2 Ciclo natural do vírus WNV | 13 |
| Figura 3 Circulação do WNV no mundo entre 1960 e 2004 | 15 |
| Figura 4 Dispersão do WNV nas Américas entre 1999 e 2007 | 20 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. ETIOLOGIA..... | 11 |
| 3. HISTÓRICO | 14 |
| 4. PATOGENIA E SINTOMAS | 16 |
| 5. EPIDEMIOLOGIA | 18 |
| 6. DIAGNÓSTICO | 21 |
| 7. CONCLUSÃO | 23 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |

1. INTRODUÇÃO

O vírus do Oeste do Nilo (WNV) é um membro da família *Flaviviridae*. Esta família é taxonomicamente composta pelos gêneros *Flavivirus* (do latim flavus – amarelo), *Hepacivirus* (do grego heptos – fígado) e *Pestivirus* (do latim pestis – peste) (1).

A maioria dos *Flavivírus* (78%) se dissemina por meio de ciclos de transmissão natural, sendo dependentes de vetores artrópodes hematófagos, que irão transmitir o vírus para os hospedeiros vertebrados (1).

Os primeiros registros a respeito do WNV foram feitos em 1937, na então província de Uganda, África, localizada a oeste do Rio Nilo, por isso a denominação do vírus (2).

Até hoje, não se sabe ao certo como ocorreu a introdução do WNV na América, entretanto, existem algumas hipóteses: comercialização de aves exóticas infectadas trazidas do Oriente Médio; transporte acidental de mosquitos e/ou larvas em cargas importadas, como produtos agrícolas e veículos e humanos infectados que viajaram na época de epidemias. Contudo, a última hipótese é menos provável, pois humanos e cavalos apresentam viremia insuficiente para infectar mosquitos. Por esse motivo, a teoria mais aceita é a de que o WNV foi introduzido por mosquitos ou aves infectadas, oriundas de transações comerciais (3).

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo, por meio de uma revisão bibliográfica, abordar aspectos relativos à etiologia, patogenia, manifestações clínicas, diagnóstico, com ênfase na epidemiologia da doença no Brasil.

2. ETIOLOGIA

O vírus do Oeste do Nilo (WNV) é um membro da família *Flaviviridae*. Esta família é taxonomicamente composta pelos gêneros *Flavivirus* (do latim flavus – amarelo), *Hepacivirus* (do grego heptos – fígado) e *Pestivirus* (do latim pestis – peste) (1).

O WNV é pertencente ao gênero *Flavivirus*, porém os *Flavivírus* ainda podem ser divididos em três grupos genômicos de acordo com suas características, e seus vetores: *Flavivírus* transmitidos por carrapatos (ex.: Gadget Gully, Kadam, Langat, febre hemorrágica Omsk etc.); *Flavivírus* transmitido por mosquitos (ex.: vírus Aroa, dengue, encefalite japonesa, Nilo Ocidental, Israel Turkey, Zika etc.); *Flavivírus* sem vetor artrópode conhecido (ex.: vírus Entebbe dos morcegos, Modoc, Bukalasa dos morcegos, Yokose etc.) (1).

Os vírions desta família são pequenos (40-60 nm) e esféricos. Possuem uma molécula de fita simples de RNA com polaridade positiva de 9 a 12,3 kilobases. Possuem nucleocapsídeo icosaédrico (~30nm) envolvendo o genoma, sendo este composto por múltiplas cópias da proteína básica C, sendo mais bem ilustrado na Figura 1. O nucleocapsídeo é revestido por um envelope lipoprotéico, contendo glicoproteínas prM e E (4, 5). Ao final de sua maturação, a proteína prM é clivada para proteína M, por uma protease celular e a proteína H é incorporada ao vírus (5). Os *Flavivírus* são sensíveis a pH baixo, detergentes lipídicos e desinfetantes comuns e não resistem muito tempo no ambiente (4).

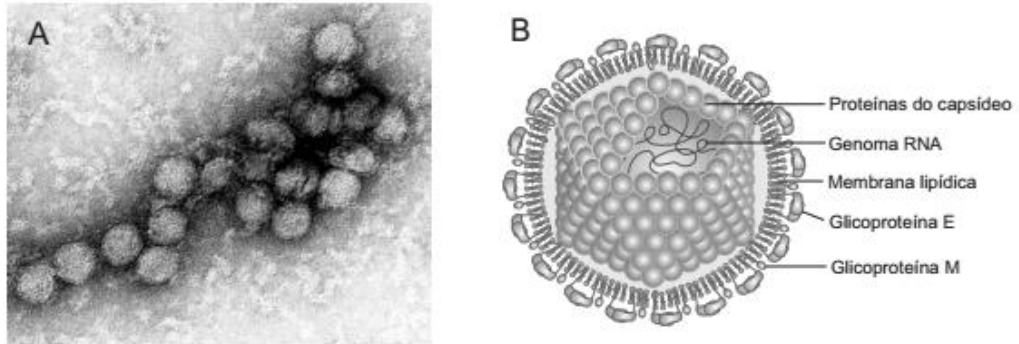


Figura 1. Morfologia e estrutura das partículas víricas da família. A) Foto de microscopia eletrônica de vírions do vírus do Nilo Ocidental (WNV); B) Ilustração esquemática de uma partícula vírica com os seus componentes.

Fonte: (1).

A replicação e a produção da progênie viral ocorrem no citoplasma da célula do hospedeiro, sendo a penetração promovida por meio de endocitose, devido a interações protéicas do envelope do vírus e receptores da membrana plasmática (FLORES, 2007).¹ O principal determinante antigênico desse vírus é a glicoproteína E, e as interações iniciais dos receptores celulares do hospedeiro são promovidas por esta glicoproteína durante a sua penetração (1).

A maioria dos *Flavivírus* (78%) se dissemina por meio de ciclos de transmissão natural, sendo dependentes de vetores artrópodes hematófagos, que irão transmitir o vírus para os hospedeiros vertebrados. Os principais vetores são os mosquitos (50%), mas carrapatos também exercem esse papel, porém com menor frequência (28%). O WNV pertence ao grupo genômico transmitido por mosquitos, estes ingerem sangue de um hospedeiro vertebrado infectado e no momento de se alimentar de outro hospedeiro, o mosquito transmite o agente, promovendo a disseminação e a manutenção do vírus na natureza (1), conforme Figura 2.

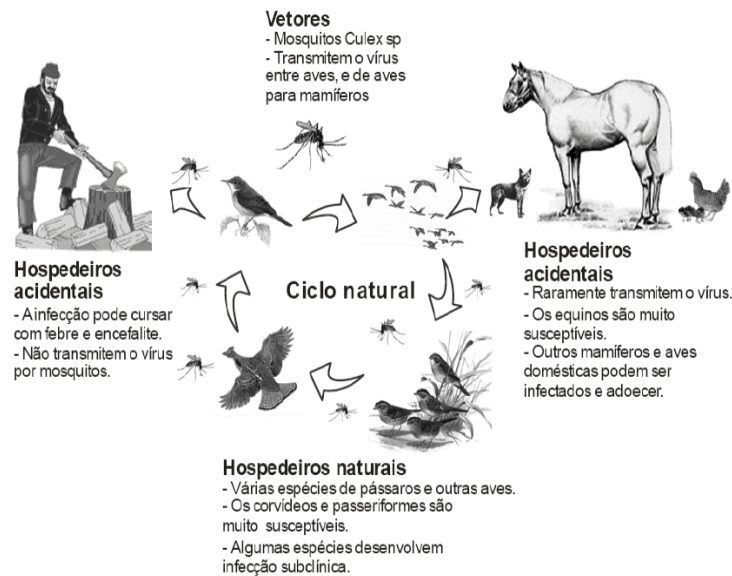


Figura 2. Ciclo natural do vírus WNV
Fonte: (1).

Estudos demonstram que estirpes isoladas do WNV podem ser divididas em duas grandes linhagens genéticas em diversas regiões geográficas (6). A Linhagem 1 é disseminada no oeste da África até o Oriente Médio, Austrália, América do Norte e Europa Oriental. Surtos em humanos, cavalos e pássaros foram representados, recentemente por esta linhagem a qual pode ser subdividida em quatro subtipos sendo estes distintos em relação à virulência e distribuição geográfica (6). Diferentemente da linhagem 2, que se mostra menos virulenta para os seres humanos, apresentando-se em casos assintomáticos ou de sintomatologia leve (7). O vírus pertencente ao grupo B, da linhagem 1 é de grande importância para corvos americanos, pardais domésticos e pássaros cantores, devido sua alta virulência para essas espécies, algo que o distingue de outros WNV presentes na África e Austrália (8).

3. HISTÓRICO

Os primeiros registros a respeito do WNV foram feitos em 1937, na então província de Uganda, África, localizada a oeste do Rio Nilo, por isso a denominação do vírus (2). O vírus foi identificado no sangue de uma mulher com quadro febril (9). Alguns anos depois, verificou-se a presença do patógeno em aves (corvos e columbiformes), porém até 1997 o WNV ainda não era considerado patogênico para aves, até que em Israel, nessa mesma época, algumas aves apresentaram quadros de encefalite e paralisia, levando-as a morte (10). De acordo com Murgue (11) este vírus foi reconhecido como um dos arbovírus mais difundidos em aves, humanos e mosquitos, e comum epizootia em cavalos. O WNV se distribuiu inicialmente em regiões da África, Europa, Índia, Oriente Médio, Ásia e Austrália (2).

As primeiras epidemias associadas ao WNV, em humanos, mostravam baixa mortalidade, porém com quadros neurológicos graves (12). Em uma epidemia na cidade de Nova Iorque, em 1999, dentre os 67 humanos com sintomas de encefalite, 21 foram a óbito (8), pelo WNV. Ao final de uma minuciosa investigação, foi comprovado que nas casas dos pacientes e vizinhos, havia fases larvárias do mosquito *Culex* (13). Mosquitos do gênero *Culex* são ornitofílicos e estão muito associados ao WNV, pois são vetores de aves residentes e migratórias, o que levou à grande índice de mortalidade em pássaros de vida livre e de cativeiro (Zoológicos) nessa mesma época (14). Desde então, houve a disseminação do vírus para demais regiões do mundo em animais silvestres, domésticos (principalmente equinos) e em humanos (15).

Os primeiros relatos sorológicos dessa doença, em equinos, foram apresentados em 1956, no Egito e em 1960 em Israel. Contudo, somente em 1963 os primeiros sinais clínicos foram detectados nessa espécie. A partir daí, em regiões como Oriente Médio, África e Europa, iniciaram-se os relatos da doença nesses animais (2).

Somente em 2005 a doença foi relatada na América do Sul, apresentando 4,8% de equinos soropositivos na Colômbia. Em Buenos Aires houve também descrições da doença em equinos e em Córdoba, no México, foram relatados casos em aves, nessa mesma época (16). A Figura 4 ilustra

mapeamento do vírus no mundo entre os anos de 1960 a 2004, período que ocorreram grandes epidemias do agente.

Até hoje, não se sabe ao certo como ocorreu a introdução do WNV na América, entretanto, existem algumas hipóteses: comercialização de aves exóticas infectadas trazidas do Oriente Médio; transporte acidental de mosquitos e/ou larvas em cargas importadas, como produtos agrícolas e veículos e humanos infectados que viajaram na época de epidemias. Contudo, a última hipótese é menos provável, pois humanos e cavalos apresentam viremia insuficiente para infectar mosquitos. Por esse motivo, a teoria mais aceita é a de que o WNV foi introduzido por mosquitos ou aves infectadas, oriundas de transações comerciais (3).

Na Europa, América do Norte, África e Oriente Médio, o WNV é, atualmente, endêmico (2).



Figura 3. Circulação do WNV no mundo entre 1960 e 2004.
Fonte: (17).

4. PATOGENIA E SINTOMAS

A patogenicidade do WNV assemelha-se àquela exibida por outras flaviviruses (18). O mecanismo de ação e o local de replicação viral ainda não são conhecidos completamente. Pesquisadores acreditam que a replicação se inicie na pele e linfonodos regionais, alcançando o sistema reticuloendotelial, o que ocasiona uma viremia primária. Este vírus possui neurotropismo, havendo proliferação viral em neurônios e células gliais; causa citotoxicidade do sistema imune na tentativa de eliminar as células infectadas; promove inflamação perivascular difusa e forma nódulos na microglia (19).

Os equinos são muito suscetíveis à infecção pelo WNV, entretanto a viremia do WNV nesses animais é insuficiente para infectar mosquitos, ou seja, não há disseminação do vírus por meio de insetos hematófagos. Posteriormente à replicação viral, o vírus chega aos linfonodos regionais, seguido da circulação sanguínea, podendo assim, alcançar o SNC por atravessar a barreira hematoencefálica (1). A maioria dos equinos que são acometidos pelo WNV não apresenta sinais clínicos. Contudo, dentre os animais que apresentam quadros clínicos, 10% sofrem alterações neurológicas (20), por exemplo, quadros de encefalite, pois o vírus destrói neurônios e células adjacentes. Uma viremia de baixa concentração inicia a infecção e é caracterizada, nos cavalos, por fraqueza, debilidade generalizada, ataxia de suave a severa em membros posteriores e/ou anteriores, fasciculação muscular, mioclonias, déficit do nervo craniano, encefalite em casos graves e febre ($> 38,5^{\circ} \text{C}$), sendo o período de incubação entre 2 a 14 dias (21). Estima-se que a taxa de mortalidade dessa doença seja de um em cada três animais. Todavia, para animais que apresentam meningites ou encefalites podem aumentar o índice de mortalidade para 40% a 50% em equinos (22). Contudo, o sistema imunológico de animais que adquiriram uma infecção não fatal, consegue erradicar o vírus na maioria das vezes (1).

As aves também são suscetíveis ao WNV, havendo relatos de mais de 150 espécies de aves já infectadas. Nas espécies domésticas, os gansos têm maior tendência à infecção, e também podem desenvolver quadros neurológicos. Os psitacídeos e os galináceos são menos suscetíveis. (1). A taxa de mortalidade dessas aves em relação ao WNV é de 25 a 40%. Dentre

as aves silvestres, os passeiformes (pardais, pássaros cantores, rabos de palha), os corvídeos e os charadriiformes (aves pernaltas de banhados) são mais suscetíveis (1). Diferentemente dos equinos, as aves têm alto desenvolvimento de viremia e grande excreção do vírus. Os sinais clínicos aparecem em pouca porcentagem de aves infectadas, porém quando estes estão presentes são caracterizados por depressão, penas arrepiadas, movimentos de pedalagem, ataxia, opistótono, incoordenação, seguido de morte, que ocorre em menos de 24 horas (1). A taxa de mortalidade nessa espécie está por volta de 50% dos animais que apresentam sintomatologia clínica (1).

5. EPIDEMIOLOGIA

Algumas das funções de uma pesquisa epidemiológica são detectar e classificar agentes etiológicos, determinar a expansão de enfermidades, prevenir novos surtos e recorrências de doenças e também os impactos econômicos provocados por estas. É por meio da pesquisa epidemiológica que são coletados dados para determinação de doenças virais, como a doença do WNV, contudo, às vezes, a epidemiologia enfrenta dificuldades para adquirir informações, principalmente em relação ao número de casos de indivíduos acometidos e suas respectivas localizações (23). Estas dificuldades estão intimamente relacionadas com a facilidade de introdução de um novo agente etiológico em diferentes regiões, graças às grandes mobilidades humanas e animais, através de transportes modernos que percorrem longos trajetos em questão de horas, assim como novos hábitos alimentares, misturando-se diferentes costumes culturais, e até mesmo com a invasão dos ambientes naturais de vírus, com desmatamentos e urbanizações nesses locais. Todos esses fatores provam que as doenças emergentes e re-emergentes apresentam grande importância na saúde pública do Brasil e do resto do mundo (24).

Especificamente, o WNV tem, cada vez mais, se tornado preocupação para o Brasil, pois, de acordo com dados epidemiológicos, já está disseminado na América do Norte e a ocorrência de apenas um caso, poderá representar uma emergência na saúde pública, provocando um grande surto no país, devido à sua enorme gama de hospedeiros, principalmente equinos, aves e humanos, sendo esta uma zoonose muito importante (25).

A maioria dos animais domésticos e humanos são fontes de infecção, assim como as aves, que podem servir como tal para artrópodes e outros vetores (26).

A principal via de transmissão se dá por meio do mosquito do gênero *Culex*, que pica uma ave infectada, esta normalmente migratória, o que facilita a disseminação do agente. O mosquito que alberga o vírus vai se alimentar de outro hospedeiro, como equinos e humanos, e torna estes animais infectados (26, 2). O período de incubação varia entre 3 a 14 dias (27).

Os primeiros dados epidêmicos a respeito do WNV foram relatados no Egito e no Sudão no ano de 1950 (28) em Israel também foram relatadas epidemias nesta mesma época, havendo recidivas frequentes durante toda a década de 50 (29). Em 1974, na África do Sul, ocorreu uma epidemia que acometeu cerca de 55% da população, dentre eles, apenas casos clínicos brandos foram constatados, não havendo descrição de casos de encefalite (30).

Na Europa, o WNV foi detectado, primeiramente em Albânia, 1958, Espanha em 1961 e Portugal em 1967 (31). Países como Ucrânia, e Rússia também foram acometidos nessa mesma época, onde o vírus foi isolado em mosquitos, e na Ucrânia, foi relatado um caso de encefalite em 1985 (31).

Nos anos 90, grandes surtos foram detectados na Argélia, Marrocos e Tunísia, com altos índices de letalidade (31). Em 1996, no Marrocos, epizootias em equinos foram observadas, na Itália, em 1998. Na França, no ano 2000, a epizootia ocorreu no sul, região denominada de "la petite Camargue", próximo ao local onde havia ocorrido a epizootia e os casos humanos na década de 60. Esta região é caracterizada pela existência de áreas alagadas, grandes colônias de aves migratórias e alta concentração de mosquitos (31).

Em Israel, no ano de 1998, amostras de soro de 18 cavalos que apresentaram quadros de encefalomielite, continham o VWN, que foi isolado a partir do cérebro de uma cegonha (32). No ano 2000, Israel apresentou um novo surto, com 417 casos confirmados, dentre eles, 57,9% apresentaram sinais de encefalite e 15,9% de meningite. Entre os pacientes internados, a letalidade foi de 14,1% (33).

Em Setembro de 1999, o vírus foi detectado pela primeira vez na América do Norte, em Nova Iorque (8). Em 2005, na Colômbia, foi detectada a presença do vírus em cavalos, assim como na Argentina, onde três cavalos apresentaram quadros de encefalite, e vieram a óbito (34). O mesmo aconteceu em 2007, na Venezuela, que apresentou sorologia positiva em cavalos e aves (16).

A figura 5 ilustra a disseminação do WNV nas Américas entre os anos de 1999 e 2007.

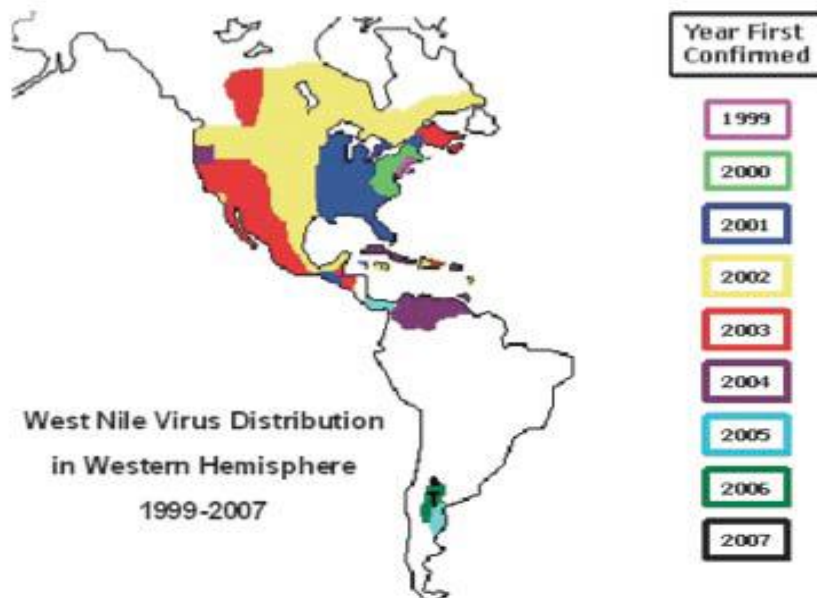


Figura 4 - Dispersão do WNV nas Américas entre 1999 e 2007.
Fonte: (35)

Com o objetivo de avaliar a ocorrência do vírus do Oeste do Nilo em seus reservatórios e hospedeiros finais animais e sua variabilidade genética em áreas do Brasil, (36). realizou um estudo com 4787 amostras de diferentes animais a procura do WNV. Esta autora conseguiu detectar o vírus em apenas duas amostras de aves silvestres na região do Pantanal brasileiro e Maranhão. A detecção foi feita por meio do teste molecular *one-step real-time* RT-PCR, contudo não houve sucesso na definição as estirpes circulantes.

Foi possível detectar anticorpos específicos para WNV, por meio do teste de ELISA, em quatro equinos, também na região do Mato Grosso (36). Estes dados levam a crer que a circulação do WNV está se iniciando no Brasil, tornando-se necessária maior vigilância para esse vírus no país.

É de importância epidemiológica saber que, nos trópicos, o WNV pode ser transmitido durante o ano todo, contudo em regiões temperadas, a transmissão aparenta estar limitada a períodos próximos ao final do Verão, sendo este a melhor época para desenvolvimento dos principais vetores (36).

6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial e tem por objetivo detectar o agente num paciente doente; ser fonte de pesquisa de soroprevalência em estudos epidemiológicos; produzir vacinas a partir de respostas imunológicas dos hospedeiros por meio de experimentos em animais (37) e avaliar resposta imune de doadores de sangue em relação aquele agente (38).

A identificação do WNV pode ser feita por meio de testes que buscam a o agente, como a cultura de células de mamíferos, por meio de amostras de cérebro e medula espinhal de equinos; coração, cérebro e intestino de aves, entre outros (39). O isolamento viral pode ser realizado em células Vero ou em células de rim de coelho (RK-13) (1). Testes sorológicos como a inibição da hemaglutinação (HI), a soroneutralização (PRNT), o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) e a hibridação in-situ. Estes se baseiam na identificação de anticorpos antiproteína E (40). Testes moleculares também são muito eficazes para diagnosticar o agente, sendo o teste quantitativo de PCR o mais utilizado, todavia identifica apenas 57% dos casos. (27).

Para diagnóstico por ELISA, pode ser utilizado soro ou LCR (líquido cefalorraquidiano, pois são amostras específicas para infecções do SNC (28), contudo há reatividade cruzada com outros Flavivírus devido a essa proteína, o que torna este tipo de teste pouco específico para detecção do WNV (41). Em contrapartida, existem vantagens em relação ao teste ELISA, como a não necessidade de utilização de aparelhos de alto custo e, por isso, é muito útil para estudos epidemiológicos (37).

Os testes de genoma convencional RT-PCR são muito mais rápidos do que métodos de cultura e são de grande utilização clínica e epidemiológica (42). A partir desse teste, o genoma é sequenciado, sendo removida a ambiguidade na identificação do vírus (43). Por esse motivo, o diagnóstico molecular tornou-se o teste de principal escolha para detecção de vírus no curso agudo das doenças (44).

Deve-se ter cautela a respeito de contaminação da amostra para teste de (*reverse transcriptase*) RT-PCR convencionais, pois há intensa manipulação da amostra durante a realização do teste, havendo também, risco de falsos negativos. Pensando nisso, entre 1992 e 1993, desenvolveram o teste *real-time*

PCR, o qual, dentro de um equipamento fechado, amplifica e detecta o material simultaneamente, reduzindo o risco de contaminação de forma considerável (45). Outra vantagem a respeito do teste em tempo real é a possibilidade de utilização em grande escala para vigilância (40).

A detecção e quantificação dos Flavivírus por meio de primers espécie-específicos numa mesma reação se dão pela detecção molecular em ensaios com primers degenerados e reativos. (40).

Algumas complicações quanto ao diagnóstico podem estar relacionadas com a carga viral presente na amostra, que pode ser baixa em post-mortem ou tecidos de triagem com ausência de sintomas; com as sequências de nucleotídeos similares dentre os membros da família *Flaviridae* e também são de difícil acesso para profissionais que trabalham a campo e necessitam de diagnóstico imediato (7).

7. CONCLUSÃO

Evidências sobre a circulação do vírus do Oeste do Nilo no Brasil foram demonstradas por diagnóstico direto, em aves e indireto, em equinos, o que reforça a necessidade da vigilância epidemiológica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FLORES, E. F; et. Al. **Virologia veterinária**, editora da UFMS, Santa Maria, V819, p. 565-576, 2007.
2. HAYES, E. B. et al. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1167–1173, 2005.
3. GUBLER, D. J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 45, n. 8, p. 1039–1046, 2007.
4. LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23–61, 2003.
5. PETERSEN, L. R.; ROHRIG, J. T. **West Nile Virus: A reemerging global pathogen**. Rev Biomed, Vol. 12, No. 3, P. 208-216, 2001.
6. LANCIOTTI, R. S. et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 96–105, 2002.
7. MONINI, M. et al. West Nile virus: characteristics of an African virus adapting to the third millennium world. **The Open Virology Journal**, v. 4, p. 42–51, 2010.
8. KOMAR, N. et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 311–322, 2003.

9. SMITHBURN, K. et al. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 20, p. 471–492, 1940.
10. WHO – World Health Organization. *West Nile Virus*. **Fact Sheet 354**, 2011.
11. Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V., Zeller H.G., West Nile in the Mediterranean Basin: 1950–2000, *Ann. NY Acad. Sci.* 951:117–126. 2001.
12. JUPP, P.G., **The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans**, *Ann. NY Acad. Sci.* 951:143–152, 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797772>
13. NASH, D.; MOSTASHARI, R.; FINE, A.; MILLER, J.; O’LEARY, D.; MURRAY, K.; HUANG, A.; ROSENBERG, A.; GREENBERG, A.; SHERMAN, M.; WONG, S.; LAYTON, M.. The outbreak of West Nile Virus infection in the New York city area in 1999. **The New England Journal of Medicine**, 344(24), 2001.
14. GOULD, E.A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 103(2), p. 109–121, 2009.
15. MORALES et al. West Nile virus in horses, Guatemala. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1038-1039, 2006.
16. BOSCH, I. et al. West Nile virus, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 651–653, 2007.

17. CHARREL, R. N. et al. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. **Virology**, v. 315, n. 2, p. 381–388, 2003.
18. NATHANSON N. Pathogenesis. In: MONATH, T. P. (Ed.). **St. Louis encephalitis**. Washington, Dc: Alpha, p. 201–236, 1980.
19. CORRÊA, A. P; VARELLA, R. B. **Aspectos epidemiológicos da Febre do Nilo Ocidental**. Revista Brasileira de epidemiologia, v.11, n.3, p. 1-10, set.2008.
20. MURGUE, B., MURRI, S., ZIENTARA, S., DURAND, B., DURAND, J.P. & Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. **Emerg. infect. Dis.**, 7 (4), 692–696. 2001
21. TROCK, S. C. et al. West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 745–747, 2001.
22. CHEVALIER, V. et al. Epidemiological processes involved in the emergence of vector-borne diseases: West Nile fever, Rift Valley fever, Japanese encephalitis and Crimean-Congo haemorrhagic fever. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 23, n. 2, p. 535–555, 2004.
23. TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p. 671–682, 2005.
24. SIMONETTI, J. P. **Especial doenças emergentes**. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br>>. Acesso em: 29 abril 2016.

25. LUNA, E.J.A.; SOUZA, R.P.; PEREIRA, L.E.. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 12(1), p.7-19, 2003.
26. ACHA, P. N; BORIS szyfres . **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales** 3^o edición, p. 278-283, 2003. **and evolution**. Advances in Vírus Research, v.59. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2003.
27. ZEINAD, A. K; NOVARETTI, M. C. Z; CHAMONE, D. A. F. **Vírus do Nilo Ocidental- Nova ameaça transfusional?** Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia. São Jose do Rio Preto. V, 26, n.2. p. 114-121, 2004.
28. HURLBUT, H. S. et al. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, n. 4, p. 579–620, 1956.
29. ZELLER, H; SCHUFFENECKER, I. West Nile Virus: An Overview of Its Spread in Europe and the Mediterranean basin in Contrast to Its Spread in the Americas. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, V. 23, p.147-156, 2004.
30. MCINTOSH, B. M. et al. Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with Culex (Culex) univittatus Theobald as vector. **South African Journal of Science**, v. 72, n. 10, p. 295–300, 1976.
31. MURGUE, B; MURRI, B; ZIENTARA, S; DURAND, B; DURAND, J.P. & Zeller, H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. **Emerg. infect. Dis.**, 7 (4), p. 692–696, 2001.
32. LANCIOTTI, R. S. et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. **Science (New York, N.Y.)**, v. 286, n. 5448, p. 2333–2337, 1999.

33. CRUZ L, Cardenas V, Abarca M, Rodriguez T, Serpas M, Fontaine R, et al. Short Report: Serological evidence of west Nile virus activity in El Salvador. **Am. J. Trop. Med. and Hyg**, V. 72, p. 612–615. 2005.
34. ADRIÁN DIAZ, L. et al. West Nile virus in birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 689–691, 2008.
35. ARTSOB, H. et al. West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 6-7, p. 357–369, 2009.
36. OMETTO, T. L., Monitoramento do Vírus do Oeste do Nilo no Brasil. **Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências**. São Paulo, 2013.
37. KUNO, G.. Serodiagnosis of Flaviviral infections and vaccinations in humans. In: CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P.. **The Flaviviruses: detection, diagnosis and vaccine development**. Advances in Research Techniques, v.61. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2003.
38. PRINCE, H.E.; TOBLER, L.H.; LAPÉ-NIXON, M.; FOSTER, G.A.; STRAMER, S.L.; BUSCH, M.P.. Development and persistence of West Nile Virus specific immunoglobulin M (IgM), IgA and IgG in viremic blood donors. **Journal of Clinical Microbiology**, 43 (9), p. 4316-4320, 2005.
39. STEELE K.E., LINN M.J., SCHOEPP R.J., KOMAR N., GEISBERT T.W., MANDUCA R.M., CALLE P.P., RAPHAEL B.L., CLIPPINGER T.L., LARSEN T., SMITH J., LANCIOTTI R.S., PANELLA N.A. & MCNAMARA T.S. Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, **New York. Vet. Pathol.**, 37, p. 208–224, 2000.

40. LANCIOTTI R.S., KERST A.J., NASCI R.S., GODSEY M.S., MITCHELL C.J., SAVAGE H.M., KOMAR N., PANELLA N.A., ALLEN B.C., VOLPE K.E., DAVIS B.S. & ROEHRIG J.T. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, 38, p. 4066-4071, 2000.
41. KUNO, G.; GUBLER, D. J.; OLIVER, A. Use of "original antigenic sin" theory to determine the serotypes of previous dengue infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 1, p. 103-105, 1993.
42. MOUREAU, G. et al. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 7, n. 4, p. 467-477, 2007.
43. LANCIOTTI, R. S. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 67-99, 2003.
44. DOMINGO, C. et al. Molecular diagnosis of flaviviruses. **Future Virology**, v. 6, n. 9, p. 1059-1074, 2011.
45. HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R.. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v.11, 1993.