RPDI
Janeiro > Abril 2012 / Vol. 8 > N.º 1

CASO CLÍNICO / *CLINICAL CASE*

Infecção por vírus *West Nile* (Flavivírus) em Portugal

Considerações acerca de um caso clínico de síndrome febril com exantema

West Nile virus (Flavivirus) infection in Portugal

Considerations about a clinical case with febrile syndrome and rash

/ M. J. Alves[1] / J. M. D. Poças[2] / T. Luz[1]
/ F. Amaro[1] / L. Zé-Zé[1] / H. Osório[1]

[1] Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac / Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
[2] Centro Hospitalar de Setúbal, Hospital S. Bernardo EPE

Correspondência:
M. J. Alves
CEVDI/INSA Av. Liberdade, 5
2965-575 Águas de Moura
Telefones: 265 912 222 – 265 938 290
Fax: 265 912 155
e-mail: m.joao.alves@insa.min-saude.pt

/ Resumo

O vírus *West Nile* (WN) é um flavivírus transmitido por mosquitos e agente etiológico de febre e de doença neuroinvasiva. O vírus WN mantém-se na natureza em ciclos enzoóticos que envolvem mosquitos ornitofílicos, como vectores primários, e algumas espécies de aves como reservatório primário.

A sua presença em Portugal é conhecida, surgindo esporadicamente alguns casos de infecção em equinos e humanos. Em 2010 foi identificado um caso humano na região sul de Portugal, tendo sido o único caso humano detectado em toda a época de actividade de mosquitos nesse ano.

Neste caso a paciente apresentava quadro febril com hiperpirexia muito irregular, por vezes com calafrios e picos de febre superiores a 39ºC, cefaleias, mialgias, adinamia e astenia acentuada, adenomegalias volumosas e dolorosas na região cervical, assim como exantema eritematoso difuso com maior expressão no tronco. Os exames laboratoriais identificaram seroconversão de anticorpos IgM contra o vírus *West Nile*.

Palavras-chave: vírus *West Nile;* síndrome febril; zoonoses.

/ Abstract

West Nile virus is a flavivirus transmitted by mosquitoes and the etiologic agent of West Nile fever and neuroinvasive illness. The virus is maintained in nature in enzootic cycles involving ornithophilic mosquitoes as primary vectors, and some species of birds as primary reservoirs.

West Nile virus presence in Portugal is well known emerging, sporadically, cases of infection in horses and humans. In 2010 a human case was identified in southern Portugal. This was the only human case detected by the National Institute of Health in the mosquito activity period in this year.

In this case the patient had fever with very irregular hyperpyrexia, with peaks above 39ºC, occasionally chills, headache, myalgia, malaise and accentuated weakness, painful lymphadenopathy in the cervical region, as well as a diffuse erythematous rash on the trunk. The laboratory findings included IgM antibodies seroconversion against West Nile virus.

Key-words: *West Nile virus; fever; zoonosis.*

/ Introdução

O vírus *West Nile* (WN) é um vírus do género *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) constituído por cerca de 70 vírus, a maior parte deles transmitidos por mosquitos ou carraças.

À semelhança dos outros flavivírus, o virião de WN é esférico, com 40 a 60 nm de diâmetro. O genoma, de ARN monocatenário de polaridade positiva, é envolvido por um nucleocápside com simetria icosaédrica, rodeado por membrana e invólucro em bicamada lipídica, com origem na célula hospedeira. São reconhecidas estirpes de duas linhagens genéticas, nomeadamente a linhagem 1 detectada na Europa, América do Norte, Ásia, África e Austrália e a linhagem 2 identificada na África subsaariana e Madagáscar[1].Em 2010 a linhagem 2 foi identificada, pela primeira vez na Europa, num surto ocorrido na Grécia com 191 casos e 32 mortos[2].

O vírus WN mantém-se na natureza em ciclos enzoóticos que envolvem mosquitos ornitofílicos, como vectores primários, e algumas espécies de aves como reservatório primário. Acidentalmente os mosquitos podem transmitir o vírus a equinos e humanos. Existem vários relatos de infecções humanas associadas a transplantes e doações de sangue[3, 4, 5, 6]. Muitas espécies de aves, inclusivamente migratórias, e de mosquitos, sobretudo do género *Culex,* têm sido identificadas como reservatórios e vectores de WN, o que provavelmente tem contribuído para a ampla distribuição geográfica do vírus e consequentemente da patologia em animais e humanos.

O período de incubação da infecção por WN varia, normalmente entre três e 15 dias após a picada do mosquito vector. Cerca de 80% das infecções humanas por vírus WN são assintomáticas, nas restantes pode haver uma síndrome febril com início súbito durante dois a cinco dias, com cefaleias, mialgias, mal-estar, náuseas e vómitos, por vezes com exantema maculopapular ou roseolar[7]. Em 1% das infecções pode haver sintomas neurotrópicos como meningite, meningoencefalite ou mielite, geralmente associados a febre elevada. Outras apresentações neurotrópicas incluem ataxia e sinais extrapiramidais, poliradiculite, convulsões e nevrite ocular[8, 9]. A fraqueza muscular é referida na maior parte das apresentações clínicas.

Em Portugal há evidências que o vírus WN se mantém em ciclos epizoóticos e que tem capacidade para infectar seres humanos esporádica e inesperadamente.

Nos primeiros estudos em arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes) em Portugal, realizados a partir dos anos 60, num inquérito epidemiológico foram identificadas 0,5% de positivos para WN por seroneutralização,[10] em 1649 indivíduos saudáveis, sobretudo dadores de sangue. O vírus WN Roxo, linhagem 1, foi isolado de mosquitos da espécie *Anopheles maculipennis* s.l.[11], na mesma região, muito próximo da barragem do Roxo, em Aljustrel, e, ainda na mesma região, foram identificados sete cavalos com anticorpos neutralizantes contra o vírus WN, em 24 equinos sobreviventes de um surto de encefalomielite equina ocorrido anos antes[12, 13].

No Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CEVDI/INSA), o diagnóstico laboratorial de rotina para arbovírus foi estabelecido em 1996[14]. A presença do vírus WN não foi identificada em amostras humanas até 2004; nesse ano foram diagnosticados dois casos, relacionados, em turistas que teriam permanecido na região sul do país[15]. Na mesma região, e na mesma época, o vírus, linhagem 1, foi isolado de mosquitos *Culex pipens* s.l. e *Cx. univittatus*[16]. A Administração Regional de Saúde do Algarve desenvolveu, com o CEVDI/INSA, um programa de vigilância de vectores do vírus WN, nos dois anos subsequentes à identificação dos casos humanos, e realizou um inquérito epidemiológico na região em que não foram identificados mosquitos infectados com vírus WN, nem outros casos humanos.

Em Julho de 2010 foi identificado um novo caso humano de infecção por vírus WN.

/ Caso Clínico

Evolução Clínica

No dia 9 de Julho de 2010, AMPCP, sexo feminino, 55 anos de idade, foi observada no SU do Hospital São Bernardo (HSB), Setúbal, por um quadro clínico de febre, exantema cutâneo e poliadenopatias.

Apresentava antecedentes de hábitos tabágicos acentuados (20 cigarros/dia), HTA medicada com um diurético tiazídico desde há cerca de um ano, episódios irregulares de úlceras da mucosa oral (< de 3/ano, e não acompanhados por outras queixas, nomeadamente fenómeno de patergia, olho vermelho, artralgias, artrite, ou tromboses venosas).

O quadro febril tinha três semanas de evolução e era caracterizado por hiperpirexia muito irregular, por vezes com calafrios e picos superiores a 39ºC, que se mantinham ao longo do tempo não melhorando com a medicação prescrita (analgésicos, anti--piréticos e anti-inflamatórios não esteróides). A paciente referia cefaleias, mialgias, adinamia e astenia acentuadas, acompanhadas de adenomegalias volumosas e dolorosas na região cervical que surgiram na semana anterior, assim como exantema cutâneo não pruriginoso e de aspecto eritematoso difuso com maior expressão no tronco, seguido de descamação da pele das mãos. Dois dias antes de recorrer ao SU verificou uma diminuição brusca do tamanho das adenomegalias.

Na observação clínica no SU realça-se a presença de exantema eritematoso com predomínio no tronco, confluente, embora evanescente, ausência de hepato-esplenomegalia, adenomegalias ou febre, sendo a observação cardíaca e pulmonar, assim como o exame neurológico, normais.

Residia em meio rural, referiu ingestão de água de poços e contacto regular com cães e gatos. Desde o início do Verão referia ter sido muito picada por mosquitos nas imediações da sua residência, negando viagens, designadamente a países tropicais, nos últimos 12 meses.

Tinha consultado vários médicos e realizados diversos exames auxiliares de diagnóstico, de cujos resultados se realçam: auto--anticorpos marcadores das vasculites e conetivopatias todos negativos, complementos normais, Widal e serologia da Brucelose também negativos, hemograma (L: 21100 com N 80%, P 400000), VS 16, serologias (CMV: IgG+ e IgM -, EBV: IgG + e IgM -, HSV 1e2: IgG e IgM negativos, HIV 1 e 2 negativos) e radiografia do tórax sem alterações significativas.

Dos exames então realizados no SU realçava-se hemograma, glucose, função renal e hepática, coagulação e gasimetria normais, ionograma com hipocaliémia (K 2,9 mEq/l) e PCR de 5,9 mg/100ml. Por suspeita de eventual zoonose foram pedidos testes ao CEVDI/INSA.

Teve alta para o Hospital de Dia de Infecciologia medicada com cloreto de potássio retard PO e vigilância clínica, com indicação para realizar hemoculturas caso voltasse a apresentar picos de febre superiores a 38ºC.



Uma semana depois, já na consulta externa, a doente mantinha quadro de febrícula (sem picos de hiperpirexia superiores a 38ºC), astenia a adinamia muito marcadas e ligeiras mialgias, tendo-se tomado conhecimento de uma serologia negativa para zoonoses com excepção de *West Nile* com IgG negativas e IgM positivas.

A doente foi mantida no domicílio com vigilância clínica, tendo sido alterada a medicação anti-hipertensiva da Indapamida para o Cilazapril.

Na semana seguinte recorreu de novo à Consulta Externa por agravamento das cefaleias e cervicalgias que eram muito intensas, e por ter voltado a ter febre mais alta, queixas que não melhoravam com Paracetamol.

O exame clínico não revelava nesta altura qualquer alteração relevante, com excepção de uma ligeira rigidez terminal da nuca com hipertonia dos músculos do pescoço.

Fez nesse dia TAC CE e Cervical que apenas revelou ligeiras alterações degenerativas cervicais. Repetiu as análises de rotina que revelaram: hemograma, função renal e hepática, ionograma, urina II, PCR e VS, coagulação, todas sem alterações.

QUADRO I – SUMÁRIO DOS RESULTADOS DOS TESTES PARA O VÍRUS *WEST NILE*

Data	12/7		22/07		06/08		27/07
Amostra	**1.º soro e sangue total**		**2.º soro**		**3.º soro**		**LCR**
Título	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgG+ IgM
***West Nile* (IFA)**	128 pos	16 sus	32 pos	32 pos	32 pos	32 pos	<8 neg
Flavivírus (RT- PCR)	neg	neg	ne	ne	ne	ne	ne

IFA – Imunofluorescência (limiares de positividade: IgG ≥32; IgM≥16)
RT-PCR – Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction
ne – não efectuado; neg - negativo; pos – positivo; sus - suspeito

Perante o agravamento clínico e a conhecimento dos resultados analíticos dos soros no CEVDI (serologia IgM positiva para *West Nile*) optou-se pela realização de uma PL que revelou um LCR com exame cito-químico (incluindo ADA) normal, tendo posteriormente o exame microbiológico, a serologia para *West Nile*, *Herpes Simplex*, Toxoplasmose, EBV e HHV6, e o PCR sido todos negativos (incluindo este último também para BK).

Duas semanas depois da primeira observação, a doente ainda referia cefaleias, dor de garganta, astenia e mal-estar intenso, embora não apresentasse febre ou erupção cutânea. Foram pedidas novas análises, e manteve a TA controlada com terapêutica médica com cilazapril e idanpamida.

Na observação efectuada quatro semanas depois houve uma melhoria nas queixas cervicais com menos astenia e mal-estar geral, mantendo-se apirética e sem alterações do exame objectivo, nomeadamente exantema ou adenomegalias. Continuou sob vigilância clínica no domicílio, voltando progressivamente ao exercício da sua actividade profissional (Psicóloga), medicada apenas com a mesma terapêutica anti-hipertensiva.

Volvidas três semanas apresentou-se de novo na consulta e após a realização de análises, teve alta clínica com o diagnóstico provável de infecção autóctone pelo vírus *West Nile*.

Exames Laboratoriais no CEVDI/INSA

A 12 de Julho, no laboratório do CEVDI/INSA, foi feita colheita de sangue total e soro para realização de análises serológicas e de detecção de ácidos nucleicos de *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia conorii, Coxiella burnetii,* Dengue, Chikungunya e vírus WN.

Os métodos indirectos e directos realizados mostraram-se negativos para estes agentes excepto para os anticorpos IgM (positivo, título 128) e IgG (suspeito, título 16) anti-vírus WN. O laboratório solicitou o envio de nova a amostra para confirmação de seroconversão nos títulos de IgM para *West Nile*. Foi assim recebido uma segunda (22 de Julho) e terceira amostra (6 de Agosto) de soro e uma amostra de líquido cefaloraquidiano a 27 de Julho.

No quadro I é apresentado um sumário dos resultados dos testes para WN realizados ao longo da evolução clínica.

Para excluir possíveis reacções cruzadas com outros vírus do género flavivírus, a 1.ª e 2.ª amostras foram também testadas, por IFA, para os flavivírus Dengue, Febre-amarela e Encefalite transmitida por Carraças (TBE) tendo apresentado resultados negativos.

A 1.ª e 2.ª amostras de soro foram enviadas a um dos laboratórios da rede ENIVD-ECDC (*European Network for Diagnostic of Imported Viral Diseases – European Center for Disease Control*), nomeadamente o Instituto Robert Koch, para análise, por provas de neutralização em placa (PRNT). Neste laboratório foram confirmados os resultados da IFA, no entanto os resultados da PRNT revelaram-se negativos.

Epidemiologia

A paciente habita numa zona rural, próximo de um campo de golfe e do estuário de um rio, incluído numa reserva natural, conhecida por fazer parte de rotas de migração de aves.

De 13 a 28 de Julho o CEVDI/INSA realizou colheitas de mosquitos adultos na zona exterior da habitação (até 1 km de distância), em 15 armadilhas/noite, com armadilhas tipo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*). Como atractivo foi utilizado CO_2 na forma de gelo seco. Foram capturados 1825 mosquitos adultos de 11 espécies diferentes (*Anopheles claviger*, *An. maculipennis* s.l., *Coquillettidea richiardii*, *Culiseta annulata*, *Cs. longiareolata*, *Cx. pipiens* s.l., *Cx. perexiguus*, *Cx. theileri*, *Ochlerotatus caspius*, *Oc. detritus* and *Orthopodomyia pulcripalpis*). A espécie mais abundante foi *Oc. caspius* (70%) seguida por *Cx. pipiens* (16%).

Os mosquitos fêmea identificados foram separados, por espécie e data de colheita, em 57 *pools* (com um máximo de 50 indivíduos) e testados para a presença de ácidos nucleicos de flavivírus com testes de RT-PCR para a detecção de uma zona conservada no gene NS5. Todos os *pools* testados foram negativos.

No laboratório do CEVDI/INSA, após a distribuição de uma circular informativa pela Direcção Geral de Saúde aos serviços de saúde, notou-se um acréscimo de pedidos de diagnóstico para WN, sem, contudo, terem sido identificados novos casos humanos positivos em toda a época de actividade dos mosquitos.

Vigilância do vírus WN em Portugal

Desde 2008 que, no âmbito do programa REVIVE (Rede de Vigilância de Vectores), Portugal tem um sistema de vigilância

sistemática de mosquitos e flavivírus transmitidos. O REVIVE resulta da colaboração da Direcção Geral de Saúde, Administrações Regionais de Saúde e Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Neste programa os mosquitos são capturados de Maio a Outubro, duas vezes por mês em vários concelhos de todas as regiões de saúde. Os mosquitos são depois identificados e reunidos em *pools* para pesquisa de flavivírus. De 2008 a 2010, o vírus WN não foi detectado em 16 992 mosquitos testados num total de 77 710 capturados em 44 concelhos de Portugal[17].

/ Discussão e Conclusões

A detecção da presença do vírus WN em Portugal tem sido muito esporádica e inesperada, provavelmente porque, aparentemente, o vírus ocupa nichos muito localizados geograficamente e no tempo ou é periodicamente introduzido por aves migratórias.

No caso descrito a detecção de uma amostra com anticorpos IgM levou imediatamente à tomada de iniciativas de vigilância nos vectores. A fauna de culicídeos na região (raio de 1 Km) mostrou ser bastante diversificada (cerca de 1/4 das espécies de Portugal foram identificadas naquele local). Algumas das espécies mais abundantes eram prováveis vectores de WN, no entanto o laboratório não identificou mosquitos infectados tendo calculado que a taxa mínima de infecção dos mosquitos seria muito próxima de zero.

A infecção por vírus WN é uma doença de notificação obrigatória, ao nível da Europa, de acordo com decisão da Comissão Europeia de 2 de Abril de 2009[18]. Segundo a definição de caso de infecção por WN[19], os casos prováveis, em que há detecção de anticorpos específicos no soro, são confirmados com 1) o isolamento do vírus WN ou 2) a detecção de ácidos nucleicos do vírus WN no sangue ou no LCR ou 3) a detecção de anticorpos IgM no LCR ou 4) detecção de título elevado de IgM e IgG e confirmação por neutralização.

No caso aqui apresentado a primeira amostra para análise da presença de anticorpos para o vírus *West Nile* foi colhida três dias depois da paciente se apresentar no hospital, no entanto, o início dos sintomas datam de três semanas antes o que pode justificar a descida em quatro títulos das imunoglobulinas M e a ligeira subida das IgG, assim como a não detecção de ácidos nucleicos no diagnóstico directo, uma vez que o período de virémia do vírus WN, em média de cinco dias, já tinha terminado.

O teste de neutralização (PRNT) representa a prova confirmatória para a presença de anticorpos específicos, no entanto está descrito, e foi recentemente provado num painel de controlo de qualidade internacional (*External Quality Assesssemnet for West Nile "European Network for Imported Viral Disease Diagnostic"*, resultados não publicados), que as técnicas utilizadas nos poucos laboratórios europeus que realizam a PRNT podem não detectar ambas as linhagens do vírus WN e é normalmente a linhagem 1 que têm na rotina do laboratório.

Em Portugal e no resto da Europa, tinha sido apenas identificada como agente etiológico a linhagem 1, no entanto, em 2010, pela primeira vez, os surtos na Europa foram atribuídos a vírus WN da linhagem 2[2, 20 ,21].

Uma vez que em duas amostras consecutivas foram determinados alterações de título IgM de 4x e a neutralização foi negativa, este caso foi considerado um "caso provável" de acordo com a definição de caso adoptada actualmente.

Não foram diagnosticados no laboratório mais casos de infecção humana por vírus *West Nile* durante toda a época, tendo sido inclusivamente analisados os co-habitantes do caso aqui descrito.

No entanto, em Outubro e Novembro, dois meses depois da identificação do caso humano, foram notificados duas ocorrências de infecções em equinos[22,23] a apenas 4 km de distância do local de residência do caso humano identificado no princípio do Verão. Este facto prova a existência de actividade viral na região, apesar de baixa, uma vez que não foi detectada na amostra de mosquitos testada, mas em apenas dois equinos e um caso humano.

Em resumo, o vírus WN foi identificado em Portugal em 1969, 2004 e 2010 sem que tenham sido conhecidos exactamente os eventos ambientais importantes que levaram à introdução ou surgimento destes casos.

A vigilância epidemiológica no vector e nos reservatórios é essencial uma vez que pode levar à tomada de medidas de controlo dos vectores e ao alerta dos clínicos para novos casos humanos.

/ Bibliografia

1. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of *West Nile* virus disease. Emerg Infect Dis 2005; 11(8): 1174-9.

2. Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vázquez A, Tenorio A, Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. Emerg Infect Dis 2011; 17(5): 920-2.

3. MMWR. Investigations of *West Nile* virus infections in recipients of blood transfusions. Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51(43): 973-4.

4. MMWR. *West Nile* virus activity-United States, September 26-October 2, 2002, and investigations of *West Nile* virus infections in recipients of blood transfusion and organ transplantation. Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51(39): 884-95.

5. MMWR. Possible dialysis-related *West Nile* virus transmission-Georgia, 2003. Morb Mortal Wkly Rep 2004; 53(32): 738-9.

6. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, et al. Transmission of *West Nile* Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients . N Engl J Med 2003; 348: 2196-203.

7. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler D. *West Nile* Virus. Lancet Infect Dis 2002;2: 519-29.

8. Klein C, Kimiagar I, Pollak L, et al . Neurological features of *West Nile* virus infection during the 2000 outbreak in a regional hospital in Israel. J Neurol Sci 2002; 200: 63–66.

9. Leis AA, Stokic DS, Polk JL, Dostrov V, Winkelmann M. A poliomyelitis-like syndrome from *West Nile* virus infection. N Engl J Med 2002; 347: 1279–80.

10. Filipe AR. Anticorpos contra arbovírus na população de Portugal. O Médico 1973; 1138:731-2.

11. Filipe AR. Isolation in Portugal of *West Nile* virus from *Anopheles maculipennis* mosquitoes. Acta Virol 1972; 16: 361.

12. Filipe AR, Sobral M, Campaniço FC. Encefalomielite equina por arbovírus. A propósito de uma epizootia presuntiva causada pelo vírus *West Nile*. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias 1973; 426: 90-101.

13. Filipe AR, Pinto MR. Survey for antibodies to arboviruses in the serum of animals from southern Portugal. Amer J Trop Med Hyg 1969; 18: 423-26.

14. Alves MJ, Filipe AR. O vírus *West Nile* em Portugal. ABO, Revista de Medicina Transfusional, 2003; 14: 7-12.

15. Connell J, McKeown P, Garvey,P, Cotter S et al. Two linked cases of *West Nile* virus (WNV) acquired by Irish tourists in the Algarve, Portugal. Euro Surveill 2004; 8(32):2517.

16. Esteves A, Almeida APG, Galão RP, Parreira R et al. *West Nile* virus in southern Portugal, 2004. Vector Borne Zoonotic Dis 2005; 5(4): 410–3.

17. Alves MJ, Osório H, Zé-Zé L, Amaro F. Relatório Revive 2008/2009. Programa Nacional de Vigilância de Vectores Culicídeos. DDI, INSA (eds) ISNB: 978-972-8643-55-3, INSA, Lisboa.

18. Commission decision of 2 April 2009 amending Decision 2000/96/EC as regards dedicated surveillance networks for communicable diseases. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:091:0027:0030:EN.PDF

19. Commission decision of 28/IV/2008 amending decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision Nº 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. http://ec.europa.eu/health/ph_threats/com/docs/1589_2008_en.pdf

20. Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, et al. Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 *West Nile* virus in Hungary. J Vet Intern Med 2011; 25(3): 586-91.

21. Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, et al. Outbreak of *West Nile* virus infection in humans, Romania, July to October 2010. Euro Surveill 2011; 16(2): 19762.

22. World Organization for Animal Health OIE http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=10066

23. Barros SC, Ramos F, Fagulha T, et al. Serological evidence of *West Nile* virus circulation in Portugal. Vet Microbiol 2011; 152(3-4): 407- 10.