

VÍRUS TOSCANA NA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Vigilância Sero-Epidemiológica e Casos Clínicos

Fátima AMARO, Teresa LUZ, Paulo PARREIRA, Maria Grazia CIUFOLINI, Antonella MARCHI, Nuno JANEIRO, Alexandra ZAGALO, Paula PROENÇA, Maria Isabel RAMOS, Maria João ALVES

RESUMO

O vírus Toscana (género *Phlebovirus*, família *Bunyaviridae*) é um vírus neurotrópico que circula na Bacia do Mediterrâneo. Apesar de Portugal ter sido o segundo país onde foi relatada a sua presença, a existência deste vírus no nosso país foi apenas referida esporadicamente, existindo uma lacuna de conhecimentos em relação à prevalência de anticorpos na população portuguesa. Assim, o objectivo do presente trabalho foi estudar a prevalência de anticorpos anti-vírus Toscana na população humana no nosso país. Os inquéritos sero-epidemiológicos foram realizados utilizando as técnicas de imunofluorescência indirecta (IFI) e de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). As populações estudadas consistiam numa população controlo (dadores de sangue, n=150), uma população considerada de risco (n=236) e uma população de indivíduos com sintomatologia e solicitação de diagnóstico laboratorial de vírus transmitidos por vectores. Esta última população foi dividida em indivíduos com sintomas neurológicos (n=165) e indivíduos sem sintomas neurológicos (n=373). Foram testados, no total, soros de 924 indivíduos. A seroprevalência de anticorpos IgG foi 2% na população controlo. Na população considerada de risco, a prevalência foi de 3,4%. Na população com doença do sistema nervoso central, detectou-se uma seroprevalência de 4,2% para o mesmo tipo de anticorpos e, nos indivíduos sem doença do sistema nervoso central, a seroprevalência foi de 1,3%. Na população com sintomas neurológicos foram detectados cinco casos de infecção recente (3%), tendo sido esta infecção adquirida nos distritos de Faro, Coimbra, Lisboa e Aveiro. Os diagnósticos clínicos associados foram de meningite, meningoencefalite e exantema. As seroprevalências observadas foram, de um modo geral, mais baixas do que as reportadas em outros países endémicos. Apenas cinco dos 29 soros com resultados positivos por IFI e ELISA foram confirmados por testes de neutralização por redução em placas com a estirpe italiana ISS.Ph1.3, o que poderá significar a presença de mais do que um serótipo de vírus Toscana em circulação em Portugal e vem reforçar a necessidade da realização de mais estudos sobre este agente etiológico no nosso país.

SUMMARY

TOSCANA VIRUS IN THE PORTUGUESE POPULATION Serosurvey and Clinical Cases

Toscana virus (*Phlebovirus* genus, *Bunyaviridae* family) is a neurotropic virus which circulates in the Mediterranean Basin. Although Portugal has been the second country where its presence was reported, the existence of this virus in our country has been referred only sporadically, and there is a lack of knowledge regarding the prevalence of antibodies in the population. Thus, the objective of this study was to analyse the prevalence of antibodies anti-Toscana virus in the human population in our country. Sero-epidemiological investigations were performed with indirect immunofluorescence assay (IFA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) tests. The study population consisted of a control population (blood donors, n=150), a population considered at risk (n=236) and

F.A., T.L., P.P., M.J.A.: Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Águas de Moura. Portugal
M.G.C., A.M.: Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases. Istituto Superiore di Sanità. Rome. Italy
N.J., A.Z.: Serviço de Doenças Infecciosas. Hospital de Santa Maria. Lisboa. Portugal
P.P.: Hospital de Faro. Faro. Portugal
M.I.R.: Serviço de Doenças Infecciosas. Centro Hospitalar Universitário de Coimbra. Coimbra. Portugal

a population of individuals with symptoms and laboratory diagnostic request for vector-borne viruses. The latter population was divided into two groups: those individuals with neurological symptoms (n=165) and those without neurological symptoms (n=373). We tested sera from a total of 924 individuals. The seroprevalence of IgG antibodies in the control population was 2%. In the population considered at risk, the prevalence was 3.4%. In the population with central nervous system disease, we detected a seroprevalence of 4.2%. For the same type of antibodies and in subjects without central nervous system disease, the prevalence was 1.3%. Five cases of recent infection (3%) were detected in the population with neurological signs. Those infections have been acquired in the districts of Faro, Coimbra, Aveiro and Lisbon. The associated clinical diagnoses were meningitis, meningoencephalitis and rash. The observed seroprevalences were, in general, lower than reported in other endemic countries. Only 5 of the 29 sera which gave positive results by IFA and ELISA were confirmed by plaque reduction neutralization tests with the Italian strain ISS.Ph1.3. This can indicate the presence of more than one Toscana virus serotype circulating in Portugal and emphasizes the need for more research about this etiological agent in our country.

INTRODUÇÃO

O vírus Toscana (género *Phlebovirus*, família *Bunyaviridae*) circula em países da Bacia do Mediterrâneo e é conhecido devido ao seu neurotropismo e consequente capacidade para originar doença do sistema nervoso central sendo causa de meningites e meningoencefalites, especialmente durante os meses de Verão. Este vírus foi isolado pela primeira vez em Itália, em flebótomos da espécie *Phlebotomus perniciosus* (*Diptera, Psychodidae*) e depois em flebótomos da espécie *P. perfiliewi*, na região da Toscana¹. Doze anos mais tarde, em 1983, foi isolado numa doente internada com meningite num hospital daquela região². Ainda em 1983 o vírus foi isolado na Suécia numa amostra de um turista que adquiriu a infecção em Portugal³, tendo sido o nosso país o segundo a ser considerado como endémico para este vírus. Anos mais tarde, em 1995, outro turista regressou sintomático ao seu país de origem, a Alemanha, após ter sido infectado na região de Coimbra⁴. A terceira e última referência à presença do vírus Toscana em Portugal foi publicada em 2007, onde foi descrita a sua detecção molecular em seis indivíduos internados com meningite na região do Porto⁵.

O diagnóstico laboratorial de flebovírus é assegurado pelo Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) desde 2007⁶. Uma vez que os casos relatados de infecção por vírus Toscana foram esporádicos e dada a falta de informação existente em relação à presença de anticorpos anti-vírus Toscana no nosso país, o objectivo deste trabalho foi realizar estudos sero-epidemiológicos na população humana para detectar contactos com este vírus e caracterizar os sinais e sintomas nas infecções recentes ou activas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras Estudadas

População controlo - A população controlo consistiu num grupo de dadores de sangue, cujas amostras foram obtidas através de um protocolo estabelecido entre o CEVDI/INSA e o Instituto Português do Sangue (IPS).

População de risco - Neste trabalho foram testadas soros de quatro grupos de indivíduos com maior exposição a picada de vectores, designadamente trabalhadores ao ar livre, anilhadores de aves, técnicos de saúde ambiental e caçadores. Foram também incluídos nesta população, indivíduos com anticorpos anti-leishmania também transmitida por flebótomos.

População de indivíduos sintomáticos - Neste grupo foram considerados os soros de indivíduos com solicitação de diagnóstico laboratorial para vírus transmitidos por vectores ao CEVDI/INSA, entre os anos de 2004 e 2008 inclusive. Estes indivíduos foram divididos em dois grupos: com e sem sintomas neurológicos.

Técnicas utilizadas nos estudos seroepidemiológicos

As amostras foram testadas pela técnica imunofluorescência indirecta (IFI). As lâminas foram preparadas, no CEVDI, com células Vero E6 infectadas com vírus Toscana da estirpe italiana ISS. Ph1.3. Foi considerada positiva uma amostra com valores ≥ 32 (IgG) e ≥ 16 (IgM). Nas amostras positivas por IFI, foi utilizada também a técnica de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) comercial (*Enzywell Toscana virus IgG/IgM*, Diesse, Itália)⁷.

Nas amostras positivas, por uma ou por ambas as técnicas anteriores, foram realizados testes de neutralização por redução em placas (PRNT) de acordo com Nicoletti

et al⁸.

Cálculos estatísticos

O tratamento estatístico foi realizado com o teste exacto de Fisher efectuado com recurso ao software *R Project* (versão 2.11.0). A hipótese nula foi rejeitada sempre que $p < 0,05$.

RESULTADOS

População controlo - A população controlo foi composta por 150 indivíduos dos distritos de Lisboa (n=95), Setúbal (n=35) e Santarém (n=20). No total da amostra foram detectados três soros (2%) com anticorpos IgG. Foi detectado um soro positivo por distrito, o que se traduziu em prevalências de 4,2% para Santarém, 1,1% para Lisboa e 2,9% para Setúbal. As amostras positivas de Lisboa e Setúbal foram confirmadas por PRNT, com a estirpe ISS. Phl.3.

População de risco - O primeiro grupo da população de risco foi constituído por trabalhadores do Algarve, região onde exerciam a sua actividade profissional ao ar livre, pelo menos durante os dois anos anteriores ao estudo. A amostra consistiu numa população de 90 indivíduos, sendo 81 do género masculino e 9 do género feminino, com idades compreendidas entre os 26 e os 70 anos.

No segundo grupo de risco, composto por anilhadores de aves, estudaram-se 37 soros de indivíduos de ambos os géneros, 26 do género masculino e 11 do género feminino, com idades compreendidas entre os 17 e os 67 anos. O terceiro grupo estudado foi constituído por 37 técnicos de saúde ambiental. A população prospectada consistiu em 14 indivíduos do género masculino e 23 do género feminino, provenientes de vários pontos do país e com idades compreendidas entre os 25 e os 55 anos. O quarto grupo estudado foi composto por 39 caçadores que exerciam a actividade na região de Évora, todos do género masculino com idades compreendidas entre os

21 e os 72 anos. No quinto grupo foram estudados soros de 33 indivíduos com anticorpos anti-leishmania. As seroprevalências das populações consideradas de risco encontram-se descritas no quadro 1. No total (n=236) foram detectados anticorpos IgG anti-vírus Toscana em oito indivíduos (3,4%), não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,53$) entre as seroprevalências nas duas populações (população controlo e população de risco).

População de indivíduos sintomáticos

Grupo I: indivíduos com sinais e sintomas neurológicos
Estudaram-se 184 soros de 165 indivíduos com vários quadros de doença neurológica, entre os quais 72 (43,6%) indivíduos do género feminino e 93 (56,4%) do género masculino. A idade variou entre os dois e os 85 anos. Setenta e três (44,2%) foram clinicamente diagnosticados com meningite. As outras manifestações clínicas mais citadas pelos clínicos foram meningoencefalite em 71 indivíduos (18,8%) e encefalite em 26 (15,8%).

Neste grupo foram detectados sete soros (4,2%) com anticorpos anti-vírus Toscana do tipo IgG com títulos ≥ 32 . Um destes soros foi positivo por PRNT com o serótipo ISS.Phl.3. Segundo o relatório clínico, três dos indivíduos apresentavam encefalite, um sinais de meningite e dois foram diagnosticados com meningoencefalite. Houve ainda um indivíduo onde apenas foi referida febre com quadro neurológico. Cinco indivíduos testados no Grupo I (3%) apresentaram anticorpos IgG e IgM anti-vírus Toscana em simultâneo e, atendendo aos critérios atrás referidos, foram considerados casos de infecção recente ou activa. Em nenhum dos relatórios clínicos constava história de viagens recentes e houve evolução benigna da doença em todos eles.

O indivíduo n.º 1, género masculino, com 47 anos, de nacionalidade inglesa, estava a residir em Portugal há 11 meses, em Querença, uma zona rural no concelho de Loulé, distrito de Faro. Segundo o Serviço de Saúde onde foi atendido, apresentava um quadro de exantema

Quadro 1 – Resultados do inquérito sero-epidemiológico da população considerada de risco.

Grupo	Positivos IgG/n	(%)
Trabalhadores no exterior (Algarve)	3*/90	(3,3)
Caçadores (Évora)	1/39	(2,6)
Anilhadores (Nacional)	1/37	(2,7)
Técnicos de Saúde Ambiental (Nacional)	1/37	(2,7)
Indivíduos com anticorpos anti-leishmania (Nacional)	2/33	(6,1)
Total	8/236	(3,4)

* Um destes confirmado por PRNT

cutâneo generalizado, com cerca de 48 horas de evolução, acompanhado de cefaleias intensas, alteração do nível de consciência e alterações do comportamento. No exame objectivo, à entrada do Serviço de Saúde, em Junho de 2005, encontrava-se apirético, consciente mas confuso e obnubilado, com *rash* maculo-papular generalizado. O diagnóstico de alta foi de meningoencefalite de etiologia por esclarecer.

O indivíduo n.º 2, género masculino, residia em Penha Garcia em meio semi-rural e tinha 52 anos. Segundo o Serviço de Saúde, o início dos sintomas deu-se em finais de Setembro de 2005. Apresentava febre, vômitos, mialgias e cefaleias holocraneanas. O diagnóstico de alta foi de meningite tuberculosa. Cumpriu com 12 meses de terapêutica antibacilar. Este soro revelou-se positivo por PRNT (ISS.Phl.3).

O indivíduo n.º 3, género masculino, tinha 14 anos e residia em Coimbra. Segundo o Serviço de Saúde onde foi acompanhado em Junho de 2006 apresentava cefaleias retro-orbitais e síndrome febril com 2 dias de evolução mas estava apirético. O diagnóstico de saída foi de meningite linfocitária viral.

O indivíduo n.º 4, do género feminino, tinha 17 anos, residia no distrito de Lisboa e, segundo as informações obtidas, em Agosto de 2006 apresentava síndrome febril com cefaleias. Tinha estado no Algarve por tempo indeterminado, local onde poderá ter adquirido a infecção. O diagnóstico de alta foi de meningite aguda viral.

O indivíduo n.º 5, do género feminino, tinha 62 anos e residia em meio rural no distrito de Aveiro. Segundo o Serviço de Saúde onde foi atendido, o quadro clínico inicial era sugestivo de gastroenterite aguda (febre, diarreia

e vômitos) com cerca de cinco dias de evolução à data do internamento, em Agosto de 2006. Posteriormente desenvolveu um quadro sugestivo de meningoencefalite (agitação psicomotora, desorientação temporo-espacial). No quadro 2 apresenta-se o resumo dos dados clínicos e laboratoriais dos cinco casos descritos com infecção recente por vírus Toscana.

Grupo II: indivíduos sem sinais ou sintomas neurológicos

No grupo dos indivíduos sem quadro neurológico foram estudados 408 soros correspondentes a 373 indivíduos provenientes de vários distritos de Portugal Continental. Foram também testadas amostras de dez indivíduos do arquipélago dos Açores e oito do arquipélago da Madeira. Estas amostras representaram 4,8% do total estudado neste grupo. No total, 180 indivíduos eram do género feminino (48,3%) e 193 do género masculino (51,7%). As idades destes indivíduos estavam compreendidas entre os cinco meses e os 94 anos.

Em relação aos sinais e sintomas apresentados pelos indivíduos neste grupo, verificou-se que a manifestação mais referida foi a síndrome febril, em 125 casos (33,5%). Neste grupo, cinco amostras (1,3%) apresentaram anticorpos do tipo IgG com títulos ≥ 32 para o vírus Toscana. Um dos indivíduos testados, do género masculino, com 36 anos, originário do distrito de Lisboa, que tinha regressado de uma viagem ao Gabão, com quadro febril, apresentou anticorpos dos tipos IgG e IgM por IFI, mas não por ELISA. Na suspeita de infecção por outros flebovírus, esta amostra foi também testada para o vírus do Vale do Rift, tendo-se revelado negativa.

Quadro 2 – Diagnóstico, manifestações clínicas e resultados serológicos com as técnicas de IFI e de PRNT nos doentes com infecções recentes por vírus Toscana.

N.º do doente	Diagnóstico (manifestações clínicas)	Título IFI IgG	Título IFI IgM	Título PRNT
1	Meningoencefalite de etiologia por esclarecer (exantema cutâneo generalizado, cefaleias intensas, alterações de consciência e de comportamento)	1024	256	neg
2	Meningite tuberculosa (febre, vômitos, mialgias e cefaleias holocraneanas)	64	256	≥ 160
3	Meningite linfocitária viral (síndrome febril, cefaleias retro-orbitais,)	256	32	neg
4	Meningite aguda viral (síndrome febril e cefaleias)	256	128	neg
5	Meningoencefalite (síndrome febril, diarreia, vômitos, agitação psicomotora, desorientação temporo-espacial)	64	128	neg

neg- negativo

DISCUSSÃO

A detecção de anticorpos IgG anti-vírus Toscana nos inquéritos sero-epidemiológicos na população controlo e nas populações consideradas de risco sugere a circulação do vírus no nosso país.

Na população controlo a seroprevalência foi baixa (2%) considerando o total mas se encarmos as amostras separadamente, por distrito, observamos uma maior seroprevalência no distrito de Santarém (4,2%). Assim e, apesar de no total a seroprevalência de anticorpos na população de risco ser superior à da população controlo, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas nestes dois grupos. Em Itália, na Toscana por exemplo, trabalhadores florestais (população de risco) apresentaram uma seroprevalência de 77,2% enquanto que na população urbana (população controlo) observou-se o valor de 22,7%⁹. Várias determinantes como a exposição à picada por flebotomos e factores genéticos ou comportamentais influenciam a taxa de seroprevalência¹⁰, o que poderá explicar a grande variação de valores nas populações controlo e de risco não só entre os vários países endémicos como também de região para região.

Nos grupos de risco nenhum dos indivíduos referiu qualquer episódio anterior de doença do SNC, o que poderá indiciar a probabilidade da circulação de estirpes menos virulentas de vírus Toscana que explica a benignidade ou, até mesmo, a ausência de manifestações clínicas em caso de infecção. É também possível que a sintomatologia com baixa severidade possa estar relacionada com factores imunológicos ou genéticos, ainda por esclarecer, e que possam ser intrínsecos na população portuguesa, uma vez que o vírus circula em Portugal, pelo menos, desde 1983³. Em relação à possível co-infecção vírus Toscana/leishmania, até ao presente, não há conhecimento da existência de trabalhos semelhantes para comparação de resultados, no entanto, é provável que ambos os agentes possam coexistir na mesma população de vectores e daí a elevada prevalência de anticorpos.

No total dos 538 indivíduos com sintomatologia (neurológica e não neurológica), 12 apresentaram evidência de contacto prévio com o vírus. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que, pelo menos, nos distritos de Faro, Coimbra e Aveiro, locais de proveniência das cinco infecções recentes, o vírus Toscana será endémico e que, provavelmente de acordo com a distribuição geográfica de *P. perniciosus*, o vírus poderá encontrar-se amplamente distribuído pelo território continental. Nas amostras provenientes dos arquipélagos da Madeira e Açores não foram detectados anticorpos anti-vírus Toscana.

No que diz respeito às manifestações clínicas, os indivíduos com infecções recentes apresentaram meningite e meningoencefalite. Num dos casos foi também referido exantema. As manifestações cutâneas não são comuns

nos casos de infecção por vírus Toscana, no entanto, têm sido descritas infecções com manifestações raras como surdez temporária ou permanente^{11, 12}, encefalite não associada a meningite¹³ ou até mesmo hidrocefalia¹⁴ (Baldelli *et al.*, 2004). Valentini e colaboradores¹⁵ sugeriram que diferenças nos serótipos do vírus possam talvez ser traduzidas em diferentes quadros patológicos nas pessoas infectadas. No presente estudo, no total de 29 amostras positivas, apenas cinco foram confirmadas por PRNT com a estirpe ISS. Ph1.3, o que sugere a possibilidade de co-circulação de diferentes serótipos do flebovírus, como reportado anteriormente em estudos realizados em outros países da bacia do Mediterrâneo (França, Tunísia)^{16,17}.

A prevalência de 3% para as infecções activas ou recentes por vírus Toscana observadas no presente trabalho é inferior à reportada noutros países como a Espanha, em que numa análise semelhante se obteve uma prevalência de 5,6%¹⁸, ou a Itália onde as prevalências encontradas variam entre os 5,6¹⁹ e os 81%²⁰, consoante as regiões.

Em nenhum dos casos de infecção recente detectados neste estudo foi solicitado especificamente o diagnóstico para vírus Toscana mas sim para o vírus *West Nile* (família *Flaviviridae*) e vírus da coriomeningite linfocitária (família *Arenaviridae*).

CONCLUSÕES

Este foi o primeiro estudo serológico retrospectivo com vista à detecção de anticorpos anti-vírus Toscana na população portuguesa. Os dados apontam para a presença endémica deste flebovírus em Portugal apesar de se verificar uma seroprevalência inferior à de outros países considerados endémicos, tais como Espanha e Itália. Estes resultados deverão no entanto ser mais aprofundados com a realização de uma investigação prospectiva alargada no tempo e no espaço para se avaliar a situação actual no nosso país. É de salientar ainda que o estudo da população humana deverá ser complementado com trabalhos de detecção do vírus ao nível das populações de flebotomos vectores para a percepção das zonas com maior risco de se adquirir a infecção.

O facto de o número de solicitações de diagnóstico laboratorial para vírus Toscana ser tão baixo no nosso país indica que este ainda não é suficientemente reconhecido como agente etiológico. Contudo, os dados obtidos levam a crer que deveria ser considerado, pelo menos nos meses de Verão, em caso de doença neurológica ou síndrome febril de origem desconhecida.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

REFERÊNCIAS

1. VERANI P, LOPES MC, NICOLLETTI L, BALDUCCI M: Studies on Phlebotomus-transmitted viruses in Italy: I. Isolation and characterization of a sandfly fever Naples-like virus. Arboviruses in the Mediterranean countries, Zlb Bakt 1980. Suppl.9, Gustav Fisher Verlag. Stuttgart-New York. 195-201.
2. LEONCINI F, BARTOLOZZI D, BANCHI S: Il virus Toscana: un nuovo *Phlebovirus* causa di malattie infiammatorie acute del SNC nell'uomo. Giorn Mal Inf Parass 1986;38: 649-652
3. EHRNST A, PETERS CJ, NIKLASSON B, SVEDMIR A, HOLMGREN B: Neurovirulent Toscana virus (a sand fly fever virus) in swedish man after visit to Portugal. Lancet 1985; 1212-3
4. SCHWARZ TF, JÄGER G, GILCH S, PAULI: Serosurvey and laboratory diagnosis of imported sandfly fever virus, serotype Toscana, infection in Germany. Epidemiol Infect 1995; 114 (3): 501-510
5. SANTOS, SIMÕES J, COSTA R, MARTINS S, LECOUR H: Toscana virus meningitis in Portugal, 2002-2005. Euro Surveill 2007; 12 (6): 126-8.
6. AMARO F, CIUFOLINI MG, FIORENTINI C, VENTURI G, ALVES MJ: Diagnóstico de flebovirus (vírus Toscana). Acta Med Port 2007; 20: 341-5
7. SOLDATESCHI D, DAL MASO GM, VALASSINA M, SANTINI L, BIANCHI S, CUSI MG: Laboratory diagnosis of Toscana virus infection by enzyme immunoassay with recombinant viral nucleoprotein. J Clin Microbiol 1999; 37 (3): 649-652
8. NICOLETTI L, CIUFOLINI MG, VERANI P: Sandfly fever viruses in Italy. Arch Virol 1996; 11: 41-7
9. VALASSINA M, VALENTINI M, PUGLIESE A, VALENSIN PE, CUSI MG: Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 May;10 (3): 483-4
10. D'OIDIO MC, VENTURI G, FIORENTINI et al: Occupational risk associated with Toscana virus infection in Tuscany, Italy. Occup Med (Lond). 2008; 58(8): 540-4
11. PAULI C, SCHWARZ TF, MEYER CG, JÄGER G: Neurological symptoms after an infection by the sandfly fever virus. Dtsch Med Wochenschr 1995; 120 (43): 1468-1472
12. MARTÍNEZ-GARCIA FA, MORENO-DOCÓN A, SEGOVIA-HERNÁNDEZ M, FERNÁNDEZ-BARREIRO A. Med Clin (Barc). Deafness as a sequela of Toscana virus meningitis. Med Clin. 2008; 130 (16): 639
13. DIONISIO D, VALASSINA M, CIUFOLINI MG et al: Encephalitis without meningitis due to sandfly fever virus serotype toscana. Clin Infect Dis 2001; 32 (8): 1241-3
14. BALDELLI F, CIUFOLINI MG, FRANCISCI D et al: Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. Clin Infect Dis 2004; 38 (4): 515-520
15. VALENTINI M, VALASSINA M, SAVELLINIG, CUSI: Nucleotide variability of Toscana virus M segment in strains isolated from clinical cases. Virus Res. 2008; 135 (1): 187-190
16. CHARREL RN, MOUREAU G, TEMMAM S et al: Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. Vector Borne Zoonotic Dis 2009; 9 (5): 519-530
17. ZHIOUA E, MOUREAU G, CHELBI I et al: Punique virus, a novel phlebovirus, related to Sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. J. Gen. Virol. 2010; 91: 1275-1283
18. DE ORY F, GEGÚNDEZ MI, FEDELE CG, SÁNCHEZ-SECO MP: Toscana virus, West Nile virus and lymphochoriomeningitis virus as causing agents of aseptic meningitis in Spain. Medicina Clinica 2009; 132 (15): 587-590
19. DI NICUOLO G, PAGLIANO P, BATTISTI S et al: Toscana virus central nervous system infections in southern Italy. J Clin Microbiol. 2005; 43 (12): 6186-8
20. VALASSINA M, MEACCI F, VALENSIN PE et al: Detection of neurotropic viruses circulating in Tuscany: the incisive role of Toscana virus. J Med Virol. 2000; 60 (1): 86-90