

## \_Monitorização do mosquito invasor *Aedes albopictus* em Portugal pela Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE), 2017-2019

*Monitoring of the invasive mosquito Aedes albopictus in Portugal by the Vector Surveillance Network (REVIVE), 2017-2019*

Hugo Costa Osório<sup>1</sup>, Fátima Amaro<sup>1</sup>, Líbia Zé-Zé<sup>1</sup>, Manuel Silva<sup>1</sup>, Maria João Alves<sup>1</sup>; Equipa REVIVE<sup>2</sup>

hugo.osorio@insa.min-saude.pt

(1) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte; Instituto dos Assuntos Sociais e da Saúde da Madeira, Portugal

### \_Resumo

O mosquito *Aedes albopictus*, conhecido vulgarmente como Mosquito Tigre Asiático, é um mosquito invasor procedente da região Ásia-Pacífico. Esta espécie é importante em saúde pública e veterinária devido ao seu papel na transmissão de diversos agentes patogénicos, nomeadamente os arbovírus chikungunya, dengue e Zika. Introduzido e estabelecido ao longo da costa mediterrânica europeia, incluindo Espanha desde 2004, este mosquito vetor tem sido responsável pelos surtos autóctones de arbovírus que têm ocorrido na Europa desde 2007. Em Portugal, o *Ae. albopictus* foi detetado pela primeira vez no âmbito da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) em dois eventos de introdução independentes, na região norte em 2017 e no Algarve em 2018. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a distribuição geográfica e atividade sazonal da espécie invasora *Ae. albopictus* em Portugal. A vigilância ativa foi significativamente incrementada pela REVIVE após estas deteções. Foram utilizadas armadilhas específicas para mosquitos adultos (*Biogents Sentinel traps*) e para as fases imaturas (*Ovitrap*s) para determinar a sua distribuição geográfica e sazonal, abundância e avaliar o processo de estabelecimento e dispersão da espécie a nível regional e nacional. Estes dados são indispensáveis no planeamento estratégico de medidas de controlo vetorial para evitar a dispersão das populações de mosquitos vetores e prevenir surtos de doenças associadas a *Ae. albopictus*.

### \_Abstract

The mosquito *Aedes albopictus*, also known as the Asian Tiger Mosquito, is an invasive mosquito from the Asia-Pacific region. This species is important in public and veterinary health due to its role in the transmission of several pathogens, namely the arboviruses chikungunya, dengue and Zika. Introduced and established along the European Mediterranean coast, including Spain since 2004, this vector mosquito has been responsible for the autochthonous arboviruses outbreaks that have been occurring more and more frequently in the European region since 2007. In Portugal, *Ae. albopictus* was detected for the first time by the Vector Surveillance Network (REVIVE) in two independent introduction events, in the northern region in 2017 and Algarve in 2018. The aim of the present study was to characterize the geographic distribution and seasonal activity of the invasive species *Ae. albopictus* in Portugal. Active surveillance was significantly increased by the REVIVE after these detections. Specific traps were used for adult mosquitoes (*Biogents Sentinel traps*) and for the immature

stages (*ovitrap*s) to determine its geographical and seasonal distribution, abundance and evaluate its way of establishment and dispersion at a regional and national level. These data are necessary in the strategic planning of vector control measures to avoid the dispersion of these populations of vectors and prevent outbreaks of vector-borne diseases.

### \_Introdução

A importância dos mosquitos e doenças associadas tem vindo a aumentar nas últimas duas décadas na Europa, principalmente devido à introdução e estabelecimento de mosquitos invasores exóticos do género *Aedes*. Estes mosquitos vetores são competentes na transmissão de agentes patogénicos, como os vírus chikungunya, dengue e Zika, para os quais os mosquitos autóctones, reconhecidos na fauna natural da região, não são competentes. As espécies de mosquitos invasores têm uma elevada capacidade de colonizar novos territórios e estão extremamente bem-adaptadas às atividades humanas. São introduzidas em novas regiões pelo transporte global de bens comerciais, nomeadamente o comércio internacional de pneus para recauchutagem e plantas.

O mosquito *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) representa um exemplo de como uma espécie exótica pode ser introduzida e disseminada numa nova região geográfica. Nas últimas décadas, esta espécie foi disseminada pelo mundo, encontrando-se atualmente amplamente distribuída (1,2). O sucesso desta expansão resultou principalmente das atividades de transporte de mercadorias no comércio global, através das quais os ovos de *Ae. albopictus* foram passivamente transportados em pneus usados e plantas ornamen-



tais de regiões infestadas para novas regiões. O transporte de mosquitos adultos por via terrestre proporcionou, posteriormente, um modo de dispersão passiva após o estabelecimento do mosquito nas novas regiões (3,4).

Na Europa, *Ae. albopictus* foi detetado, pela primeira vez, na Albânia em 1979 (5) e após introdução e estabelecimento na Itália, na década de 90, rapidamente disseminou pela maioria dos países da orla mediterrânea, já se tendo estabelecido em 19 deles (6,7). Portugal esteve sempre na lista das regiões com condições apropriadas para a sua introdução e estabelecimento (2). No âmbito da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE), o *Ae. albopictus* foi detetado pela primeira vez, em dois eventos de introdução independentes, na região norte em 2017 e no Algarve em 2018 (8,9).

Na Europa, a transmissão autóctone de arbovírus, como chikungunya e dengue, relacionada com a presença de *Ae. albopictus*, ocorre desde 2007 (10,11). Mais recentemente, surtos de chikungunya foram relatados em França em 2010 (12,13), 2014 (14) e 2017 (15), e novamente, em Itália em 2017 (16). Casos de dengue autóctone causados pelos serótipos 1 e 2 de dengue também foram relatados em 2010 na Croácia e na França (17,18) e na França em 2013 (19), 2014 (20) e 2015 (21). Em 2018, foram confirmados 12 casos de dengue autóctone na União Europeia, seis na Espanha (cinco na região de Múrcia e um na Catalunha) e seis na França (cinco casos em Saint Laurent du Var, e um caso em Montpellier) (22). Mais recentemente, em agosto de 2020, foi registado o primeiro surto autóctone de dengue em Itália (23). Em Portugal ainda não foram reportados casos de doença associados a transmissão de agentes por *Ae. albopictus*.

A prevenção de doenças associadas a vetores depende, em grande parte, de controlo vetorial eficaz e sustentável. As evidências têm mostrado que o envolvimento da comunidade nas políticas de saúde ambiental é também um fator crucial para a obtenção de melhores resultados na supressão das populações de vetores. No entanto, a caracterização espacial (geográfica) e temporal (sazonal) das populações de *Ae. albopictus* que é obtida pelas atividades de monitorização ativa é necessária antes de qualquer estratégia de intervenção. Estes dados são obtidos através de monitorização ento-

mológica contínua e permanente, com o objetivo de caracterizar a fenologia e a distribuição das populações-alvo de vetores e permitem a elaboração de estratégias de controlo ajustadas que suprimindo a população de mosquitos previnem surtos de doenças associadas (16,24,25).

Em Portugal, a REde de Vigilância de Vetores (REVIVE) criada em 2008 por protocolo entre as Administrações Regionais de Saúde, Direção-Geral da Saúde e Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, é responsável pela monitorização de mosquitos vetores e pesquisa de arbovírus com impacto em saúde pública. A vigilância de mosquitos é realizada de maio a outubro e, para dar cumprimento ao Regulamento Sanitário Internacional, em pontos de entrada, como aeroportos, portos, áreas de armazenamento, empresas de recauchutagem de pneus e regiões fronteiriças, onde a monitorização decorre todo o ano (26).

### **\_Objetivo**

Caracterização da distribuição geográfica e atividade sazonal da espécie invasora *Aedes albopictus* em Portugal entre 2017-2019, no âmbito da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE).

### **\_Materiais e métodos**

#### *Monitorização da REVIVE nas áreas-alvo e colheita de mosquitos*

As colheitas de mosquitos vetores foram realizadas no âmbito do REVIVE em propriedades públicas e privadas com conhecimento e permissão do responsável. As amostras de vetores foram enviadas para o Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas e identificadas usando as chaves de identificação de Ribeiro e Ramos (27) e Schaffner e colaboradores (28). Após a deteção da espécie *Ae. albopictus*, foram estabelecidas estações de monitorização permanentes, em ambas as regiões-alvo. Na região Norte – Penafiel foram utilizadas sete *Biogents sentinel traps* (BGS) e 34-73 armadilhas de ovos (*ovitrap*s) durante o período 2017-2019. Na região Algarve – Loulé (LAO 1), freguesias de Quarteira e Almancil – foram utilizadas oito BGS e 30-36 *ovitrap*s durante o mesmo



período. As armadilhas foram inspecionadas semanalmente durante todo o ano para a presença de mosquitos adultos e ovos. Nas *ovitraps* positivas, o papel de oviposição ou os imaturos de mosquito identificados, larvas e pupas, foram colocados em tubos de colheita e enviados ao laboratório para processamento. No local, um novo papel de oviposição e água foram colocados após a limpeza da *ovitrapp*. Relativamente aos mosquitos adultos capturados nas armadilhas BGS, estes foram aspirados, transferidos vivos para tubos de colheita e enviados ao laboratório.


### Pesquisa de arbovírus

Considerando sua importância como vetores para vários arbovírus importantes, os mosquitos adultos foram selecionados e analisados por PCR em tempo real para chikungunya, dengue e vírus Zika usando os *kits* RealStar<sup>®</sup> RT-PCR (Altona Diagnostics GmbH, Hamburgo, Alemanha) e por

Pan-flavi NS5 RT-PCR convencional para incluir outros flavivírus (29,30).

### \_Resultados

Na região norte, o mosquito *Aedes albopictus* foi identificado no concelho de Penafiel (LAU 1), nas freguesias de Guilhufe e Urrô (LAU 2), numa fábrica de recauchutagem de pneus com comércio internacional. Na região do Algarve, o mosquito *Ae. albopictus* foi identificado no concelho de Loulé (LAU 1), inicialmente em Vilamoura (Quarteira, LAU 2) e posteriormente em Vale do Garrão, Vale do Lobo e Quinta do Lago (Almancil, LAU 2) (figura 1).

Figura 1:  Regiões onde foi identificada a presença e atividade do mosquito *Aedes albopictus* em Portugal desde a sua primeira deteção em 2017: concelho de Penafiel (LAU 1), nas freguesias de Guilhufe e Urrô (LAU 2) e Loulé (LAU 1), nas freguesias de Quarteira e Almancil (LAU 2).

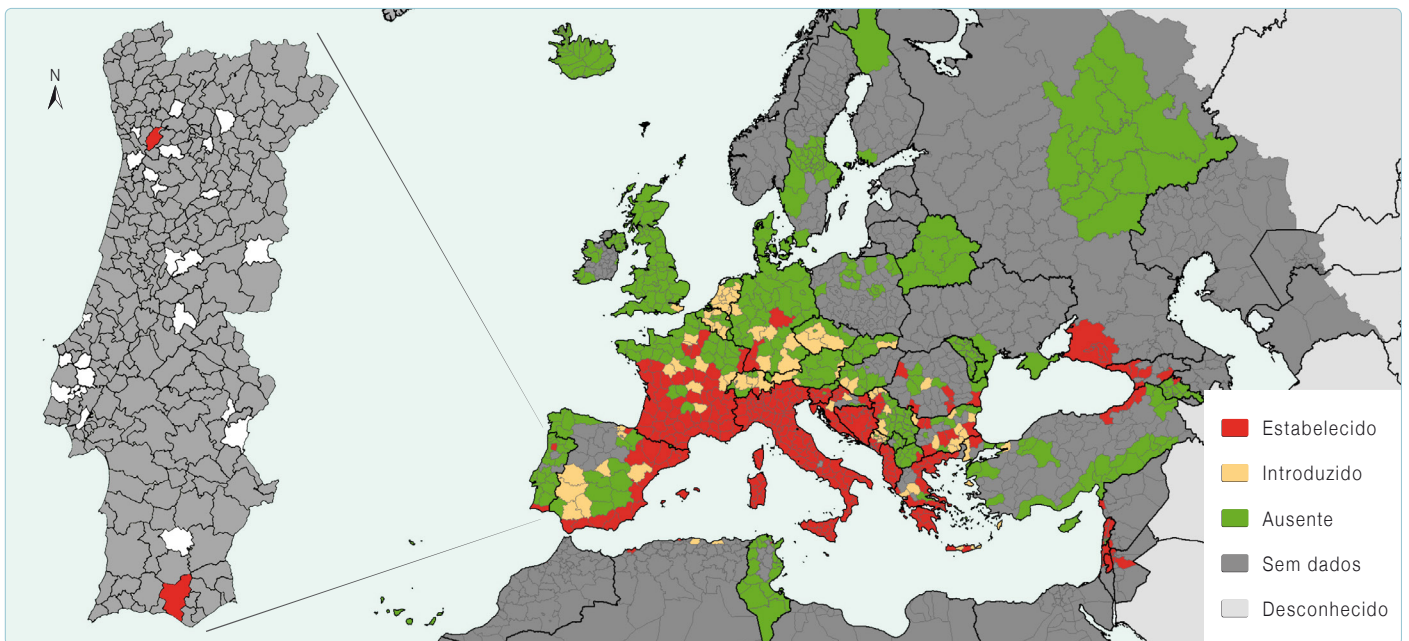


Figura adaptada de: ECDC, 2020, <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>; Relatório REVIVE 2019, <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7107>



### Região Norte

A primeira deteção na região norte foi a 4 de setembro de 2017. No período 2017-2019 foram identificados um total de 147 mosquitos adultos e 342 imaturos. O período de atividade sazonal do mosquito corresponde a maio-outubro, com picos de abundância entre agosto e outubro. No período novembro-abril não foi detetada atividade por dois anos consecutivos (gráfico 1).

Relativamente à sua distribuição geográfica, em 2017, o mosquito *Ae. albopictus* foi encontrado apenas no interior do perímetro da fábrica. Em 2018, foi detetado fora do perímetro da fábrica pela primeira vez, situação que se manteve em 2019 (figura 2).

Gráfico 1: Número total de *Aedes albopictus* (larvas e adultos) coletados na região norte de Portugal, no período 2017-2019.

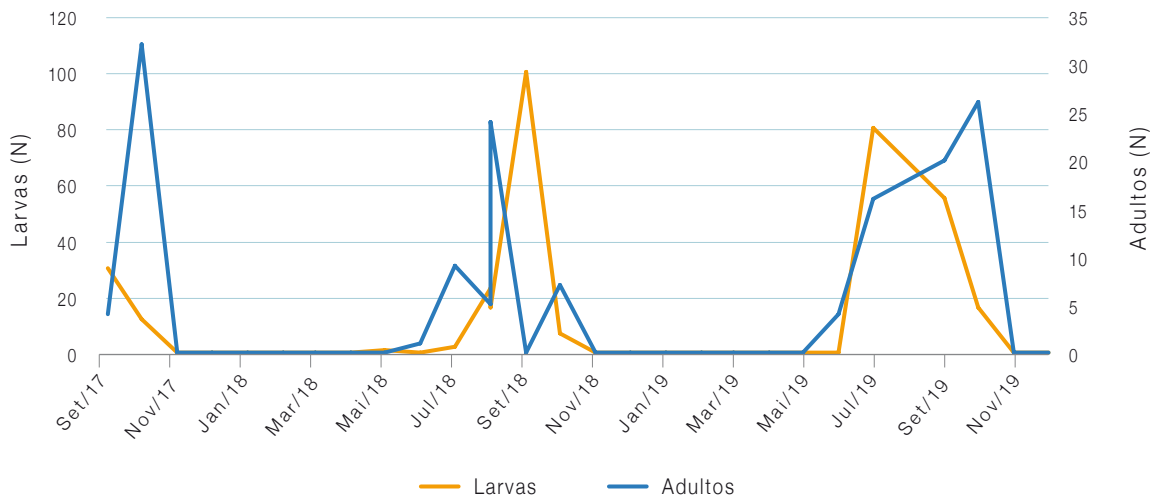
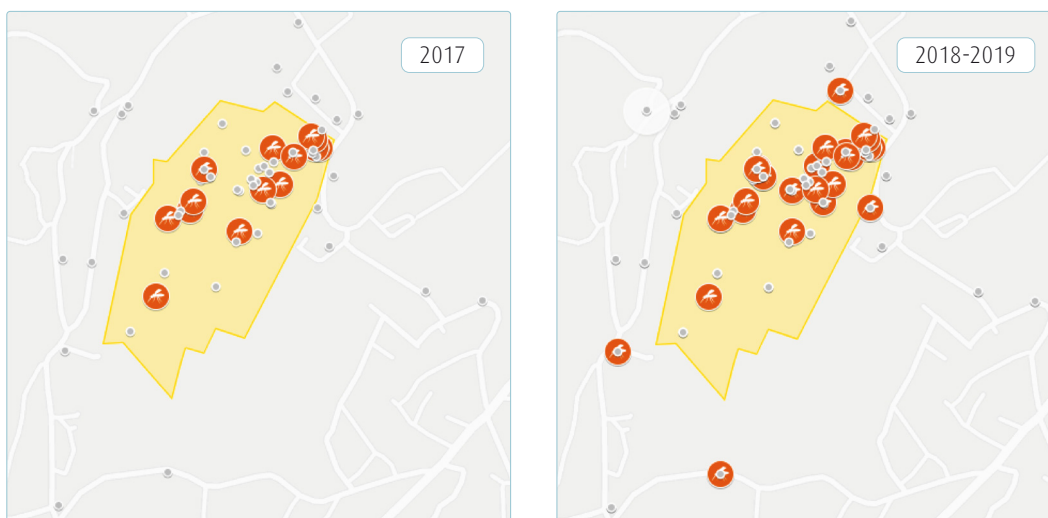


Figura 2: Dispersão do mosquito *Ae. albopictus* para fora do perímetro das instalações da fábrica de recauchutagem de pneus, no período 2017-2019.



A amarelo, área da fábrica; pontos cinzentos, locais de monitorização (negativos); círculos laranja, locais de monitorização (positivos).



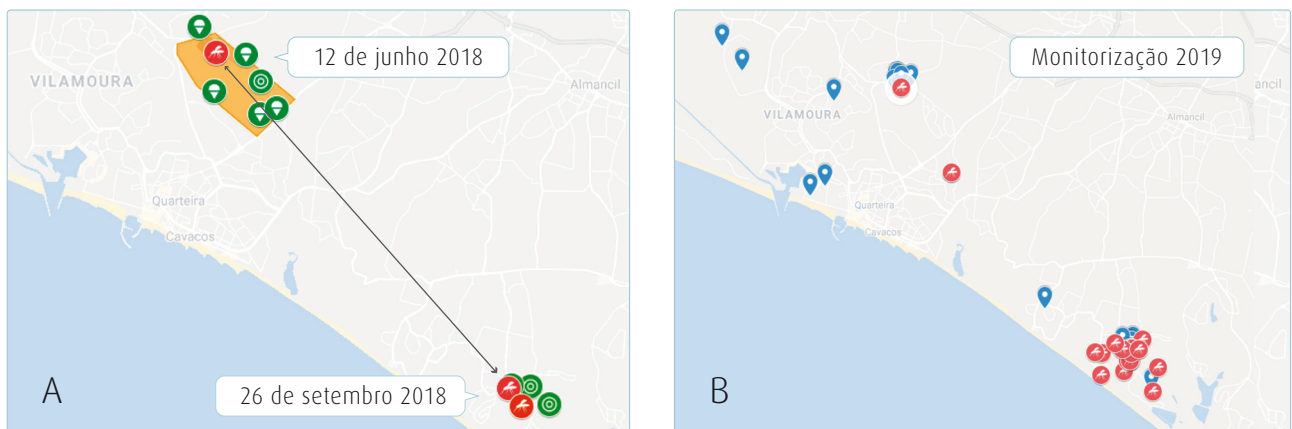
### Região do Algarve

No âmbito da REVIVE, o mosquito *Ae. albopictus* foi detetado pela primeira vez a 12 de julho de 2018 em Quarteira, Loulé e foram coletados um total de 453 mosquitos adultos, 530 larvas e 19004 ovos no período 2018-2019. A 26 de setembro de 2018 o mosquito foi detetado pela primeira vez em Almancil (figura 3).

Durante 2019, foi avaliada a sazonalidade e abundância da população de *Ae. albopictus* com base no número de ovos e de mosquitos adultos coletados. Foram identificados 19004

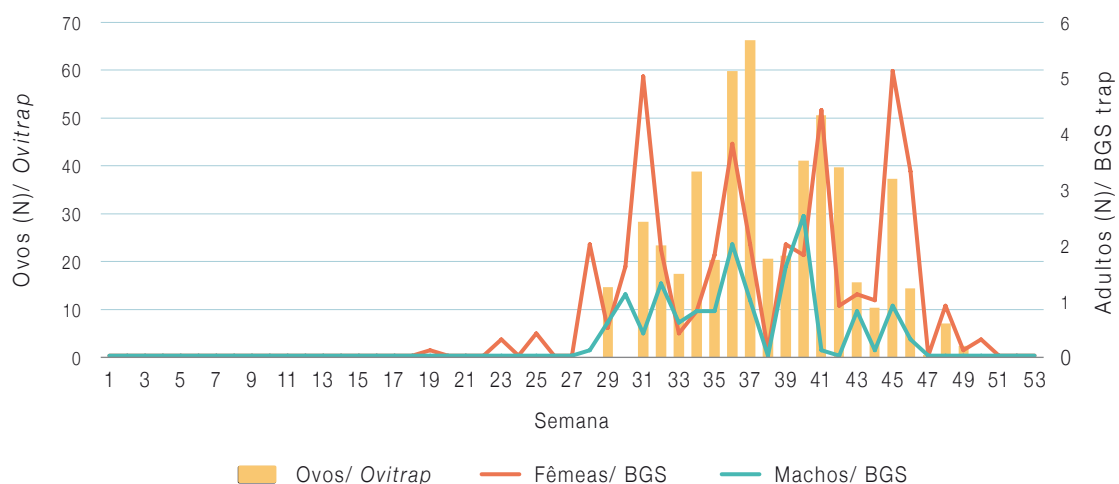
ovos e 449 adultos, 330 fêmeas e 119 machos. O primeiro dia em que se detetou atividade de *Ae. albopictus* foi 9 de maio (semana 19) e o último registo a 16 de dezembro (semana 50) (gráfico 2). O pico de abundância de *Ae. albopictus* foi identificado nos meses de setembro a novembro, correspondendo setembro ao mês com maior número de ovos contados nas *ovitrap*s (semana 36-39, n=6949) e novembro o mês com maior número de mosquitos adultos coletados nas armadilhas BGS (semana 45-48, n=74 fêmeas).

Figura 3: A – Detecção do mosquito *Ae. albopictus* inicialmente em Quarteira (12 de junho) e posteriormente em Almancil (LAU 2) a 26 de setembro 2018. B – Estações de monitorização e atividade de *Ae. albopictus* em 2019.



A amarelo, a área inicialmente monitorizada; Estações de monitorização (8 *Biogents sentinel traps* (BGS) e 30-36 *ovitrap*s): Negativos à presença de *Ae. albopictus* – pontos verdes (A - 2018) e azuis (B - 2019); Positivos à presença de *Ae. albopictus* – pontos vermelhos.

Gráfico 2: Número de *Aedes albopictus* (fêmeas, machos e ovos) por armadilha, por semana durante 2019.





Em relação à pesquisa de arbovírus, foram analisados 160 mosquitos fêmeas, 53 da região norte e 107 da região do Algarve. O vírus chikungunya e flavivírus patogénicos não foram detetados nas amostras testadas. No entanto, no Algarve foram detetados flavivírus específicos de inseto (ISF) em três *pools*.

### **\_Discussão**

O mosquito *Aedes albopictus* encontra-se atualmente estabelecido e em expansão geográfica nas regiões identificadas. Os dados obtidos pela REVIVE promovem, a nível nacional e internacional, a análise do processo de estabelecimento e dispersão no sentido de identificar áreas de risco para a ocorrência de surtos autóctones associados à presença do mosquito. De acordo com o que temos vindo a observar nos últimos dez anos na Europa, a área de distribuição desta espécie vai não só rapidamente aumentar a nível nacional, com a infestação de outras regiões, como também vai aumentar a sua abundância, caso não sejam tomadas medidas de controlo vetorial que suprimam as populações de mosquitos e atrasem ou impeçam a sua dispersão.

Um estudo filogeográfico baseado na análise do mitogenoma e no gene da Citocromo C oxidase (COI) de mosquitos coletados em Portugal em 2017 e 2018, permitiu identificar uma elevada variabilidade genética, dentro e entre as populações de mosquitos a norte e sul do país, compatível com as populações de mosquitos existentes na Europa (31). Estes resultados sustentam a ocorrência de vários eventos de introdução, e a análise da sequência do mitogenoma indica ainda uma possível migração de *Ae. albopictus* dentro do país, da localidade de introdução a norte para a região do Algarve.

Os dados de monitorização em ambas as regiões mostram que os meses de setembro a novembro são quando a população se encontra mais abundante e em maior atividade, sendo conseqüentemente maior o risco de transmissão de agentes e ocorrência de surtos de doença. O período de atividade na região do Algarve é maior (até dezembro) que na região norte, o que muito provavelmente se deve às condições ambientais, particularmente ao efeito da temperatura

na atividade do mosquito. Estudos indicam que quando a média da temperatura mínima aumenta para valores superiores a 13°C as populações de mosquitos na Europa entram em atividade (32). Este marcador ambiental pode facilitar as tomadas de decisão relativamente à determinação do período de monitorização e atividades de controlo vetorial.

Portugal é uma região de risco para a circulação de doenças associadas a mosquitos, podendo o vírus ser introduzido por um viajante infetado regressado de uma região endémica e posteriormente transmitido localmente pelas populações de *Ae. albopictus*. No Algarve, devido a ser um ponto turístico de grande afluência, recebendo visitantes potencialmente infetados, esta preocupação é acrescida. O risco de ocorrência das doenças associadas a estas espécies de mosquito invasoras aumenta inevitavelmente com a sua presença. No entanto, outros fatores condicionam a circulação dos agentes patogénicos, como a abundância das populações de mosquitos e as condições ambientais, significando que a presença do mosquito por si só não é determinante para a ocorrência de surtos de doença. Mas, em concordância com os exemplos que temos vindo a assistir em vários países europeus, tem de ser feito um esforço considerável e de acordo com uma gestão integrada de ações de monitorização entomológica, vigilância epidemiológica e controlo vetorial (4). O envolvimento comunitário, com informação e esclarecimento às populações, como também com a promoção de ações que envolvam a comunidade no controlo dos mosquitos, são indispensáveis nesta lógica de gestão integrada de vetores (33). A primeira abordagem em qualquer programa de controlo de mosquitos baseia-se na eliminação/ redução de criadouros que é acessível e deve ser praticada pela comunidade. O controlo de mosquitos, particularmente das espécies invasoras, depende de todos. Só com vigilância entomológica e epidemiológica, ações de controlo vetorial efetivas e envolvimento comunitário será possível manter baixo o risco de doenças associadas a mosquitos em Portugal e noutros países europeus.

A monitorização das populações de vetores pela REVIVE é indispensável no processo de prevenção de doenças associadas a mosquitos. O REVIVE tem contribuído, desde 2008,



para o conhecimento sobre as espécies de vetores presentes nas regiões, a sua distribuição e abundância, assim como para o esclarecimento do seu papel como vetor de agentes de doença e monitorizar as espécies invasoras com importância em saúde pública.

## Conclusões

A monitorização pela rede REVIVE é essencial para a deteção atempada e monitorização de mosquitos invasores que promova a ação imediata das autoridades de saúde locais. A presença do mosquito vetor *Ae. albopictus*, espécie exótica e com características invasoras, nas regiões norte e sul de Portugal, representa uma situação de risco acrescido para a saúde pública que vai exigir um esforço de monitorização constante e medidas de controlo eficazes que impeçam a dispersão deste mosquito para outras regiões.

## Agradecimento:

A todos os profissionais do País envolvidos no projeto REVIVE, pela colaboração no trabalho de campo e de registo. Lista completa da equipa em: REVIVE – Culicídeos e Ixodídeos: relatório 2019, pp. 55-60. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7107>

## Referências bibliográficas:

- (1) Paupy C, Delatte H, Bagny L, et al. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect.* 2009;11(14-15):1177-85. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- (2) Kraemer MUG, Reiner RC Jr, Brady OJ, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol.* 2019;4(5):854-63. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>
- (3) Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, et al. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(1):76-85. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>
- (4) Vaux A, Johnston C, Dallimore T, et al. Working towards a co-ordinated approach to invasive mosquito detection, response and control in the UK. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(14):5166. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145166>
- (5) Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998;14(3):340-43.
- (6) European Centre for Disease Control. Development of *Aedes albopictus* risk maps. Stockholm: ECDC, 2009. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/development-aedes-albopictus-risk-maps>
- (7) Medlock JM, Hansford KM, Versteirt V, et al. An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bull Entomol Res.* 2015;105(6):637-63. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000103>
- (8) Osório HC, Zé-Zé L, Neto M, et al. Detection of the Invasive Mosquito Species *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Portugal. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(4):820. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040820>
- (9) Marabuto E, Rebelo MT. The Asian tiger mosquito, *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a vector of dengue, chikungunya and zika viruses, reaches Portugal (Diptera: Culicidae). *Zootaxa.* 2018;4413(1):197-200. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4413.1.10>
- (10) Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, et al. Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. *Euro Surveill.* 2007;12(11):e071122.2. <https://doi.org/10.2807/esw.12.47.03313-en>
- (11) Rezza R, Nicoletti L, Angelini R, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 2007;30:1840-6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6)
- (12) Grandadam M, Caro V, Plumet S, et al. Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):910-13. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101873>
- (13) Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One.* 2013;8(3):e59716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>
- (14) Delisle E, Rousseau C, Broche B, et al. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill.* 2015;20(17):21108. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.17.21108>
- (15) Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, et al. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(39):17-00647. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00647>
- (16) Manica M, Guzzetta G, Poletti P, et al. Transmission dynamics of the ongoing chikungunya outbreak in Central Italy: from coastal areas to the metropolitan city of Rome, summer 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(44):17-00685. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.44.17-00685>
- (17) Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill.* 2011;16(9):19805. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19805>
- (18) La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(39):19676. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19676>
- (19) Marchand E, Prat C, Jeannin C, et al. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill.* 2013;18(50):20661. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.50.20661>
- (20) Giron S, Rizzi J, Leparc-Goffart I, et al. New occurrence of autochthonous cases of dengue fever in southeast France, August-September 2014. *Bull Epidemiol Hebd (Paris).* 2015;13-14:217-23.
- (21) Succo T, Leparc-Goffart I, Ferré JB, et al. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015. *Euro Surveill.* 2016;21(21):30240. doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30240>
- (22) European Centre for Disease Control. Dengue - Annual Epidemiological Report for 2018. Stockholm: ECDC, 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/dengue-annual-epidemiological-report-2018>
- (23) Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, et al. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(36):2001606. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2001606>
- (24) Tisseuil C, Velo E, Bino S, et al. Forecasting the spatial and seasonal dynamic of *Aedes albopictus* oviposition activity in Albania and Balkan countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12:e0006236. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006236>
- (25) Heinisch M, Diaz-Quijano FA, Chiaravallotti-Neto F, et al. Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in São Paulo, SP, Brazil. *Acta trop.* 2019;189:104-13. Epub 2018 Sep 30. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.011>
- (26) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac. Relatório REVIVE 2019 – Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7107>
- (27) Ribeiro H, Ramos, HC. Identification Keys of the Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Continental Portugal, Açores and Madeira. *Eur Mosq Bull.* 1999;3:1-11.



- (28) Schaffner F, Angès G, Geoffroy B, et al (eds). The mosquitoes of Europe: an identification and training programme. Paris: IRD éditions, 2001.
- (29) Briese T, Jia XY, Huang C, et al. Identification of a Kunjin/ West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *Lancet*. 1999;354(9186):1261-62. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)04576-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)04576-6) [Erratum in: *Lancet* 1999 Nov 6;354(9190):1650]
- (30) Briese T, Rambaut A, Pathmajeyan M, et al. Phylogenetic analysis of a human isolate from the 2000 Israel West Nile virus epidemic. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(5):528-31. <https://doi.org/10.3201/eid0805.010324>
- (31) Zé-Zé L, Borges V, Osório HC, et al. Mitogenome diversity of *Aedes (Stegomyia) albopictus*: detection of multiple introduction events in Portugal and potential within-country dispersal. *bioRxiv*. Epub 2020.02.12. <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.945741>
- (32) Roiz D, Rosà R, Arnoldi D, et al. Effects of temperature and rainfall on the activity and dynamics of host-seeking *Aedes albopictus* females in northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10(8):811-16. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0098>
- (33) Bartumeus F, Oltra A, Palmer JRB. Citizen Science: a Gateway for Innovation in Disease-Carrying Mosquito Management? *Trends Parasitol*. 2018;34(9):727-29. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.04.010>