

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ESTUDO DE INSETOS POTENCIAIS VETORES DE AGENTES INFECCIOSOS NA ÁREA DE
ATIVIDADE DO CENTRO DE ESTUDOS E RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS DE
CASTELO BRANCO

INÊS DE MAGALHÃES FEIJOO SILVEIRA

ORIENTADOR:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

TUTORA:

Dr.ª Ana Filipa Lopes

2023

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ESTUDO DE INSETOS POTENCIAIS VETORES DE AGENTES INFECIOSOS NA ÁREA DE
ATIVIDADE DO CENTRO DE ESTUDOS E RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS DE
CASTELO BRANCO

INÊS DE MAGALHÃES FEIJOO SILVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca Sampaio

VOGAIS:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Doutor Virgílio da Silva Almeida

ORIENTADOR:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

TUTORA:

Dr.^a Ana Filipa Lopes

2023

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Inês de Magalhães Feijoo Silveira

Título da Tese ou Dissertação: ESTUDO DE INSETOS POTENCIAIS VETORES DE AGENTES INFECIOSOS NA
ÁREA DE ATIVIDADE DO CENTRO DE ESTUDOS E RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS
SELVAGENS DE CASTELO BRANCO

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2023

Designação do curso de
Mestrado ou de
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 14 de fevereiro de 2023

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: _____

Inês Silveira

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Fernando Boinas, pelo apoio, disponibilidade e preciosa contribuição na realização desta dissertação.

À Mestre Sara Madeira, pela forma generosa e paciente com que sempre me ajudou, com a sua partilha de conhecimentos que constituiu uma mais-valia fundamental para o trabalho desenvolvido.

À minha tutora, Dra. Ana Filipa Lopes, não só por me ter proporcionado um excelente estágio curricular, que excedeu todas as minhas expectativas, mas, particularmente, por todas as oportunidades e ensinamentos prestados desde o primeiro dia. Agradeço toda a confiança depositada, a atenta orientação, o acompanhamento permanente, os conselhos constantes em todos os momentos para além desta dissertação, e o exemplo a seguir do que é ser uma verdadeira médica veterinária. Muito obrigada!

A toda a restante equipa do CERAS, em especial à Sofia e à Mariana, por terem tornado o meu estágio único. Agradeço todo o apoio, cumplicidade e amizade que se formou e ficou. Um agradecimento muito especial à Mariana pelo olhar atento e por acreditar e confiar sempre nas minhas capacidades.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pela disponibilidade e receptividade a todos os pedidos para a realização deste estudo.

Ao Professor João Barcelos, por todo o cuidado que nunca esquecerei.

Aos meus amigos lisboetas, pela receção calorosa à FMV e pela amizade e companheirismo sempre presentes.

Aos meus queridos grandes amigos açorianos, por me levarem a viver a vida académica ao mais alto nível. Obrigada por me fazerem sempre rir, por todas as memórias, pela entreeajuda durante todos os passos deste curso, pelo apoio incondicional e por todo o carinho desde o primeiro dia. Saiu-me realmente a sorte grande.

Às minhas primas Joana e Margarida, por estarem sempre pertinho de mim.

Ao meu Avô José Eduardo, pela correção desta dissertação e por partilhar sempre comigo a sua sabedoria da forma mais meiga que existe.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por todos os mimos, paciência e esforço. Obrigada por acreditarem sempre nos meus sonhos. Sem vocês nada seria possível.

ESTUDO DE INSETOS POTENCIAIS VETORES DE AGENTES INFECIOSOS NA ÁREA DE ATIVIDADE DO CENTRO DE ESTUDOS E RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS DE CASTELO BRANCO

RESUMO

A globalização e as alterações climáticas influenciam o aparecimento e ressurgimento de doenças transmitidas por mosquitos. Na Europa, seis espécies de mosquitos foram demonstradas como vetores competentes para o vírus do Nilo Ocidental (VNO), nomeadamente *Culex pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. perexiguus*, *Cx. torrentium*, *Aedes albopictus*, e *Ae. detritus*. *Culex pipiens* é considerado o principal vetor de transmissão do VNO no nosso país. Em Portugal, bem como se verifica noutros países, parecem estar presentes as condições ecológicas essenciais à circulação e manutenção do VNO no ecossistema.

No período de outubro de 2021 a fevereiro de 2022, no Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens de Castelo Branco (CERAS), foram instaladas duas armadilhas luminosas miniatura CDC, utilizando dióxido de carbono (CO₂) como atrativo, para a captura de mosquitos. Utilizou-se também um aspirador de insetos portátil, para captura de mosquitos em instalações de animais selvagens e em contacto direto com o corpo dos animais. Complementarmente, foram obtidos dados acerca da temperatura do ar, humidade relativa e quantidade de precipitação, através do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), para posterior interpretação juntamente com os resultados obtidos.

No presente estudo foram capturados, através das armadilhas, 70 mosquitos, não tendo sido capturado nenhum mosquito utilizando o aspirador. Capturaram-se, pelo menos, cinco espécies diferentes incluindo *Anopheles maculipennis* s.l., *Culex pipiens*, *Culex theileri*, *Culiseta annulata* e *Culiseta longiareolata*, dois mosquitos identificados como *Aedes* spp. e dois identificados como *Anopheles* spp.. Na totalidade da amostra verificou-se em maior quantidade a espécie *Culex pipiens* e observaram-se 53% (37/70) de machos e 47% (33/70) de fêmeas. Capturaram-se três fêmeas com abdómen engorgitado em outubro, novembro e mesmo no inverno, em janeiro.

A realização do estudo neste período permitiu englobar os meses de outubro e novembro, em que ainda se verifica atividade de mosquitos, e os meses de dezembro, janeiro e fevereiro, permitindo realizar um estudo preliminar da atividade dos mosquitos no período de *overwintering*.

Palavras-chave: mosquitos, vírus do Nilo Ocidental, armadilhas CDC, *Culex pipiens*, *overwintering*.

STUDY OF POTENTIAL INSECT VECTORS OF INFECTIOUS AGENTS IN THE ACTIVITY AREA OF THE WILDLIFE REHABILITATION CENTER OF CASTELO BRANCO

ABSTRACT

Globalization and climate change influence the emergence and resurgence of mosquito-borne diseases. In Europe, six mosquito species have been shown to be competent vectors for West Nile virus (WNV), namely *Culex pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. perexiguus*, *Cx. torrentium*, *Aedes albopictus*, and *Ae. detritus*. *Culex pipiens* is considered to be the main vector for WNV transmission in this country. In Portugal, as well as in some other countries, the ecological conditions essential for the circulation and maintenance of the WNV in the ecosystem seem to be present.

During the period from October 2021 to February 2022, at the Wildlife Rehabilitation Center of Castelo Branco, two miniature CDC light traps were placed, using carbon dioxide (CO₂) as an attractant, to capture mosquitoes. A portable insect vacuum was also used to capture mosquitoes in wild animal enclosures and on direct contact with the animals. In addition, data on air temperature, relative humidity and rainfall amount were obtained from the Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), for further interpretation along with the results obtained.

During the study, 70 mosquitoes were captured by the traps, and no mosquitoes were captured using the vacuum. At least five different species were captured including *Anopheles maculipennis* s.l., *Culex pipiens*, *Culex theileri*, *Culiseta annulata* and *Culiseta longiareolata*, two mosquitoes identified as *Aedes* spp. and two identified as *Anopheles* spp. In the entire sample, the species *Culex pipiens* was found in higher quantities and were detected 53% (37/70) of males and 47% (33/70) of females. Three females with engorged abdomens were captured in October, November and even in winter, in January.

This study enabled us to comprise the months of October and November, when mosquitoes are still active, and the months of December, January and February, allowing a preliminary study of overwintering mosquitoes.

Keywords: mosquitoes, West Nile virus, CDC traps, *Culex pipiens*, overwintering.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES	xiii
APRESENTAÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	1
1. Relatório de estágio.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Introdução.....	4
2. Mosquitos	4
2.1. Caracterização dos mosquitos (Diptera, Culicidae).....	4
2.1.1. Adultos	5
2.1.2. Ovos.....	6
2.1.3. Larvas.....	6
2.1.4. Pupas	6
2.2. Ciclo de vida da família Culicidae	7
2.3. Mosquitos vetores de agentes infecciosos em Portugal	8
2.3.1. Espécies mais comuns (REVIVE, 2021).....	9
2.3.1.1. <i>Anopheles maculipennis</i> s.l.....	9
2.3.1.2. <i>Culex modestus</i>	9
2.3.1.3. <i>Culex pipiens</i>	9
2.3.1.4. <i>Culex theileri</i>	10
2.3.1.5. <i>Culex univittatus</i>	10
2.3.1.6. <i>Culiseta longiareolata</i>	10
2.3.1.7. <i>Aedes (Ochlerotatus) caspius</i>	10
2.3.2. Outras espécies identificadas (REVIVE 2021).....	11
2.3.2.1. <i>Anopheles claviger</i>	11
2.3.2.2. <i>Culex hortensis</i>	11
2.3.2.3. <i>Culex laticinctus</i>	11

2.3.2.4. <i>Culex territans</i>	11
2.3.2.5. <i>Culiseta annulata</i>	12
2.3.2.6. <i>Aedes (Ochlerotatus) detritus</i>	12
2.3.2.7. <i>Aedes aegypti</i>	12
2.3.2.8. <i>Aedes albopictus</i>	12
3. Vírus do Nilo Ocidental	13
3.1. Etiologia.....	13
3.2. Epidemiologia	14
3.2.1. Hospedeiros	14
3.2.2. Transmissão.....	15
3.2.2.1. Barreiras à infeção e transmissão	16
3.2.3. Vetores.....	17
3.2.3.1. Os Mosquitos enquanto Vetores	17
3.2.3.1.1. Outros potenciais vetores	18
3.2.3.2. Transmissão intra-vetorial.....	18
3.3. Patogenia e Sinais Clínicos	18
3.3.1. Aves	18
3.3.2. Equídeos	19
3.3.3. Homem.....	19
3.4. Lesões anatomopatológicas	19
3.5. Diagnóstico.....	20
3.6. Profilaxia médica e sanitária	21
3.6.1. Plano de Vigilância Português para a FNO.....	21
3.6.1.1. Vigilância em aves	21
3.6.1.2. Vigilância entomológica	21
3.6.1.3. Vigilância em equinos	21
3.6.1.3.1. Medidas em caso de suspeita clínica em equinos	22
3.6.1.3.2. Medidas em caso de confirmação da doença em equinos.....	22
3.7. Casos em Portugal	22
3.7.1. Prováveis casos de febre do Nilo Ocidental no CERAS.....	23
ESTUDO DE INSETOS POTENCIAIS VETORES DE AGENTES INFECIOSOS NA ÁREA DE ATIVIDADE DO CENTRO DE ESTUDOS E RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS DE CASTELO BRANCO	25
1. Objetivos.....	25
2. Materiais e métodos	25
2.1. Captura de mosquitos com armadilhas.....	25

2.1.1.	Funcionamento das armadilhas	25
2.1.2	Caracterização dos locais.....	27
2.2.	Captura de mosquitos com aspirador	32
2.3.	Conservação e identificação dos mosquitos	33
2.4.	Recolha de dados da estação meteorológica de Castelo Branco	33
3.	Resultados.....	33
3.1.	Armadilhas de mosquitos.....	33
3.2.	Aspirador de mosquitos	38
3.3.	Análise da relação entre os dados meteorológicos e as capturas de mosquitos.....	38
4.	Discussão	41
5.	Conclusão.....	48
6.	Limitações do estudo e sugestões futuras	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
	ANEXOS	59
	Anexo 1 – Poster “Cuidados de enfermagem veterinária a uma cria de doninha (<i>Mustela nivalis</i>) em centro de recuperação de animais selvagens”	59
	Anexo 2 - First Report of Oral Candidiasis by <i>Candida lusitaniae</i> in a Red Kite (<i>Milvus milvus</i> , Lineu 1758).....	60
	Anexo 3 - Lesões observadas em aves infetadas, naturalmente e experimentalmente, com o vírus do Nilo Ocidental (Adaptado de Byas and Ebel 2020).....	63
	Anexo 4 - Resultados obtidos nas colheitas efetuadas durante os meses de outubro a fevereiro, inclusive, especificando a espécie de mosquito capturada e o respetivo sexo, a quantidade de mosquitos em cada colheita e a presença/ausência de refeição sanguínea.....	65
	Anexo 5 – Dados diários, provenientes da estação meteorológica de Castelo Branco, de outubro de 2021 a fevereiro de 2022 inclusive, acerca da temperatura do ar, humidade relativa e quantidade de precipitação.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia do mosquito adulto (fêmea de <i>Culex pipiens</i>) (Adaptado de ECDC 2022).....	5
Figura 2 - Morfologia da larva da subfamília Culicinae (Ilustração original criada a partir de BioRender®).....	6
Figura 3 – Morfologia da pupa da família Culicidae (Ilustração original criada a partir de BioRender®).....	6
Figura 4 - Ciclo de vida do mosquito <i>Culex</i> spp. (CEVDI 2022).	7
Figura 5 - Organização do genoma do vírus do Nilo Ocidental e composição do respetivo virião. (Adaptado de Chancey et al. 2015).....	14
Figura 6 - Ciclo de transmissão do vírus do Nilo Ocidental (Ilustração original criada a partir de BioRender®).....	15
Figura 7 - Distribuição das infeções de VNO reportadas em Humanos, na Europa, de 2011 a 22 de agosto de 2022 (Adaptado de ECDC 2022).	23
Figura 8 - Armadilha utilizada para a captura de mosquitos (Fotografia original).	25
Figura 9 – Ilustração esquemática dos componentes das armadilhas utilizadas (Ilustração original).....	27
Figura 10 - Localização das armadilhas de mosquitos (Imagem adaptada do Google Maps).....	29
Figura 11 - Esquema ilustrativo da planta do CERAS, assinalando os locais onde foram colocadas as armadilhas no Centro (Ilustração original criada a partir de BioRender®).....	30
Figura 12 - Armadilha de mosquitos instalada no Local 4, no CERAS (Fotografia original).....	31
Figura 13 – Ilustração esquemática do aspirador de insetos portátil (Ilustração original).....	32
Figura 14 - Macho de <i>Aedes</i> spp. (Fotografia original).....	35
Figura 15 - Fêmea de <i>Anopheles maculipennis</i> s.l. (Fotografia original).....	35
Figura 16 - Macho de <i>Anopheles</i> spp. (Fotografia original).	35
Figura 17 - Fêmea de <i>Culex pipiens</i> (Fotografia original).....	35
Figura 18 - Fêmea de <i>Culex theileri</i> (Fotografia original).	36
Figura 19 - Fêmea de <i>Culiseta annulata</i> com abdómen engorgitado (Fotografia original).....	36
Figura 20 - Macho de <i>Culiseta longiareolata</i> (Fotografia original).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos focos nacionais reportados em equinos desde 2015 (Adaptado de DGAV 2022a; DGAV 2022b).....	23
Tabela 2 - Resultados obtidos nas colheitas efetuadas durante os meses de outubro de 2021 a fevereiro de 2022, inclusive, especificando a quantidade de mosquitos capturados de cada espécie ou género, com distinção do sexo.....	34
Tabela 3 - Local de captura de cada espécie.....	34
Tabela 4 - Quantidade de mosquitos obtidos em cada um dos locais onde foi colocada a armadilha, consoante a quantidade de dias em que a armadilha foi instalada nesse local no período de outubro a dezembro.....	37
Tabela 5 - Quantidade de mosquitos capturados por mês.....	38
Tabela 6 - Quantidade de mosquitos capturados por mês, consoante o local onde estava instalada a armadilha.	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Causas de entrada de animais no CERAS, de 6 de setembro de 2021 a 28 de fevereiro de 2022.	1
Gráfico 2 - Quantidade de mosquitos capturados, por semana, no CERAS e no Picadeiro.	37
Gráfico 3 - Relação entre a quantidade de mosquitos capturados semanalmente e a temperatura do ar a 1,5m.	39
Gráfico 4 – Relação entre a quantidade de mosquitos capturados semanalmente e a umidade relativa (%).	39
Gráfico 5 - Relação entre a quantidade de mosquitos capturados semanalmente e a média da quantidade de precipitação (mm) semanal.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Ae. - *Aedes* spp.

An. – *Anopheles* spp.

CDC – Center for Disease Control

CERAS – Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens

CHIKV – Vírus Chikungunya

Cs. – *Culiseta* spp.

Cx. – *Culex* spp.

DENV – Vírus da Dengue

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DSAVR – Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regional

Dpi – Dias pós-infeção

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESA-IPCB – Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Castelo Branco

FNO – Febre do Nilo Ocidental

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

REVIVE – Rede de Vigilância de Vetores

RNCRF – Rede Nacional de Centros de Recuperação de Fauna

RT-qPCR – Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SINV – Vírus Sindbis

USUV – Vírus Usutu

UV – Ultravioleta

VFVR – Vírus da febre do Vale do Rift

VNO – Vírus do Nilo Ocidental

ZIKV – Vírus Zika

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

°C – Grau Celsius

km – Quilómetro

® – Marca Registrada

m – Metro

m/s – Metros por segundo

N/A – Não Aplicável

V – Volt

W – Watt

APRESENTAÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

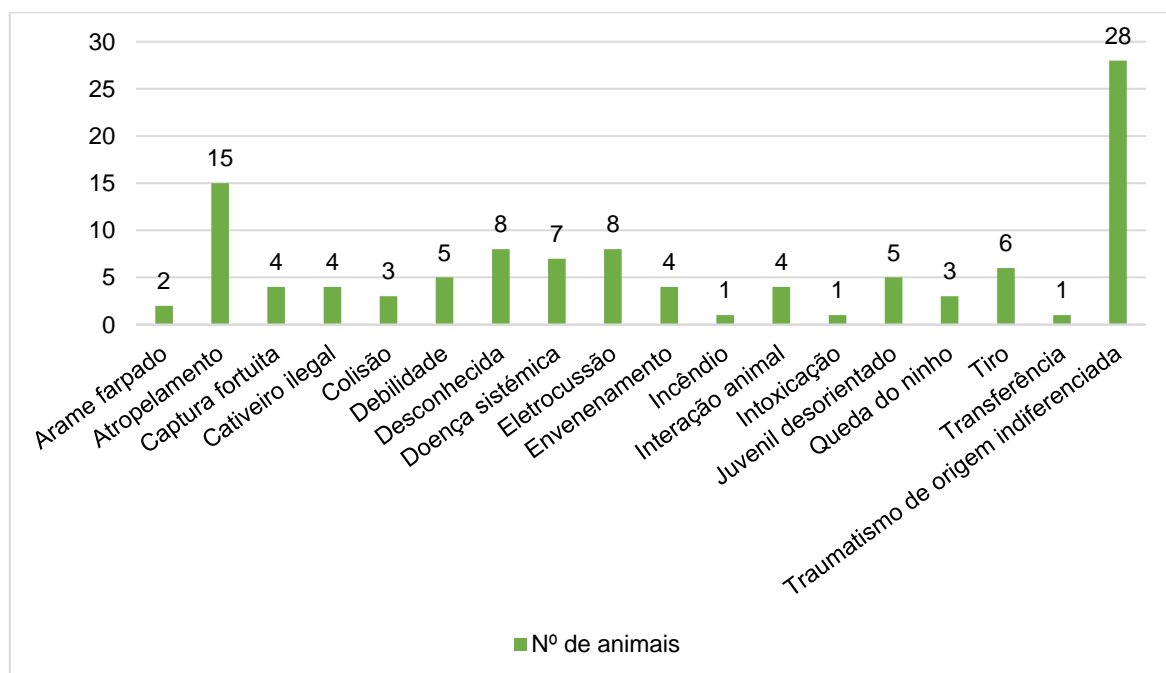
1. Relatório de estágio

No ano letivo 2021/2022, no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV), foi realizado o estágio curricular no Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens (CERAS) de Castelo Branco, sob a tutoria da Dr^a Ana Filipa Lopes. O estágio teve início no dia 6 de setembro de 2021, terminando no dia 28 de fevereiro de 2022 e contabilizando aproximadamente 1016 horas.

O CERAS é um projeto da Associação Nacional de Conservação da Natureza (Quercus), pertencendo à Rede Nacional de Centros de Recuperação de Fauna (RNCRF). As instalações do centro situam-se na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco (ESA - IPCB).

Durante o período anteriormente mencionado, ingressaram no CERAS 109 novos animais. As causas mais comuns de entrada no centro, apresentadas no gráfico 1, foram situações de traumatismo de origem indiferenciada, atropelamento e eletrocussão.

Gráfico 1 - Causas de entrada de animais no CERAS, de 6 de setembro de 2021 a 28 de fevereiro de 2022.



No período de estágio, foram obtidos conhecimentos em diversas áreas da Medicina da Conservação, tendo estes sido aplicados diariamente nas atividades do centro. Neste contexto, houve a oportunidade de receber os novos animais ingressados no centro e identificar a respetiva espécie, bem como efetuar a contenção e o exame físico. Foram discutidos casos clínicos, diagnósticos e terapias (de suporte, manejo da dor, antibioterapia,

antiparasitários, entre outras), tendo sido efetuados os respetivos cálculos e administrações. Adicionalmente, foi possível participar na resolução de traumas, fraturas e luxações, por meio de método conservativo (promoção da correta cicatrização através da desinfeção e aplicação de pomadas e elaboração de pensos e ligaduras) e de método cirúrgico. Em cirurgia surgiu a possibilidade de intervir como circulante, anestesista e ajudante de cirurgião, principalmente na área da ortopedia (introdução de cavilhas intramedulares, pins transversais e fixadores externos). Foi ainda efetuada a monitorização de todos os animais internados e a alimentação forçada de animais debilitados e de crias, entre muitos outros procedimentos.

Desenvolveram-se competências necessárias na atuação e avaliação de situações de emergência e na execução de eutanásias.

Relativamente a exames complementares de diagnóstico, foi adquirida experiência acerca do correto posicionamento dos animais aquando da realização de radiografias digitais e na análise das imagens obtidas.

Tanto nos casos em que foram entregues cadáveres, como nos animais que não sobreviveram, efetuaram-se necrópsias que permitiram não só obter uma melhor compreensão sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na causa da morte, mas também aprofundar conhecimentos de anatomia e diferenças entre espécies. Em algumas situações, foi necessária a realização de necrópsias forenses, tendo-se colaborado na realização dos respetivos relatórios técnicos.

Complementarmente, foram realizadas atividades de apoio ao centro, nomeadamente a gestão do biotério de roedores e insetos, preparação e distribuição das alimentações e manutenção das instalações. Aplicaram-se práticas de enriquecimento ambiental com o objetivo de aproximar as condições das instalações ao respetivo habitat natural, contribuindo para o processo de reabilitação. Processo este que é iniciado ainda antes da alta clínica e é fundamental para a recuperação do animal. Nos casos de sucesso clínico, houve também a possibilidade de auxiliar na libertação dos animais recuperados e assistir na anilhagem de aves.

A experiência adquirida no estágio foi partilhada com voluntários, alunos da Escola Superior Agrária de Castelo Branco e com outros estagiários que foram integrando a equipa, permitindo assim a consolidação de toda a aprendizagem obtida ao longo do estágio e culminando numa troca de conhecimentos, que tornou a experiência ainda mais enriquecedora.

Por fim, surgiu a oportunidade de participar, como coautora, na elaboração de um *poster* para o XVII Congresso Internacional Veterinário Montenegro, com o título de “Cuidados de enfermagem veterinária a uma cria de doninha (*Mustela nivalis*) em centro de recuperação de animais selvagens”, e na elaboração de três artigos científicos. Um dos artigos já publicado

com o título “First Report of Oral Candidiasis by *Candida lusitanae* in a Red Kite (*Milvus milvus*, Lineu 1758)”.

Em retrospectiva, realizar o estágio no CERAS foi uma oportunidade única de ganhar experiência numa área de difícil acesso profissional em Portugal e uma mais-valia pela enorme disponibilidade dos profissionais no acompanhamento e transmissão de conhecimentos e pela liberdade e confiança depositadas para executar todos os procedimentos médico-veterinários.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução

A globalização e as alterações climáticas influenciam o aparecimento e ressurgimento de doenças transmitidas por mosquitos, muitas com impacto na saúde humana. Estima-se que tal aconteça, entre outros motivos, devido ao prolongamento da época de reprodução dos culicídeos, resultando num aumento da densidade dos mosquitos, e do período propício ao desenvolvimento dos agentes patogénicos (Almeida 2011; Ruiz-Arrondo et al. 2019). Deste modo, presume-se que possa ocorrer a manifestação de agentes patogénicos como são exemplo os vírus Chikungunya, Zika, da dengue e do Nilo Ocidental (Barzon 2018). Em Portugal, bem como se verifica noutros países, parecem estar presentes as condições ecológicas essenciais à circulação e manutenção do VNO no ecossistema. A presença das espécies de mosquitos vetores deste flavivírus e o elevado fluxo de aves migratórias provenientes de África contribuem para a potencial expansão do vírus no nosso país e na Europa (Formosinho et al. 2006).

No continente europeu, o aumento da prevalência deste tipo de doenças, com a presença de espécies exóticas e nativas de mosquitos, levou à implementação de programas integrados de vigilância de culicídeos e de arbovírus, de forma a reduzir o impacto das doenças transmitidas por estes vetores na saúde pública. A adoção de medidas de controlo adequadas requer a abordagem de “Uma Só Saúde” integrando e relacionando a saúde dos seres humanos, dos animais (principalmente animais de produção e fauna selvagem), e dos ecossistemas, numa tentativa de evitar a ocorrência de surtos. Para avaliar o risco da incidência de doenças transmitidas por mosquitos é fundamental integrar programas de vigilância entomológica para estudar a distribuição, a abundância e a composição das espécies de culicídeos numa determinada região (Ruiz-Arrondo et al. 2019).

2. Mosquitos

2.1. Caracterização dos mosquitos (Diptera, Culicidae)

Relativamente à taxonomia, os mosquitos estão integrados no Filo Arthropoda, na Classe Insecta, na Ordem Diptera, na Subordem Nematocera e na Família Culicidae (Lane and Crosskey 1993).

A Família Culicidae divide-se nas subfamílias Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. Na última as fêmeas não são hematófagas, não sendo relevante para a saúde pública (Almeida 2011). Nas subfamílias Anophelinae e Culicinae encontram-se as espécies de mosquitos com maior interesse em medicina humana e veterinária, ambas possuindo capacidade vetorial (CEVDI 2022).

2.1.1. Adultos

As formas adultas dos mosquitos têm entre 2 e 10 mm de comprimento, possuindo corpos delgados, olhos proeminentes e patas longas e finas. As peças bucais são constituídas por uma probóscide proeminente e alongada, adaptada à perfuração e sucção. Possuem ainda um lábio em forma de “U” contendo as maxilas, as mandíbulas e a hipofaringe, que contém um ducto salivar responsável por inocular anticoagulantes nos tecidos do hospedeiro, durante a refeição hematófaga. Nos machos as maxilas e mandíbulas são reduzidas ou ausentes (Taylor et al. 2016). Ambos os sexos têm longas antenas, filamentosas e segmentadas, apresentando dimorfismo sexual e sendo, geralmente, pilosas nas fêmeas e plumosas nos machos. Os culicídeos apresentam, no tórax, um par de longas asas membranosas e estreitas, e um segundo par posterior reduzido a halteres, que auxiliam na estabilidade do voo. As asas são mantidas cruzadas sobre o abdômen, quando o inseto se encontra em repouso e contêm escamas ao longo das nervuras, que se projetam como uma franja no bordo posterior. Adicionalmente, no tórax, inserem-se três pares de patas e dois espiráculos. O abdômen contém na sua extremidade distal a genitália, relevante nos machos para sua identificação (Almeida 2011; Taylor et al. 2016). Na figura 1 pode ser observada a morfologia do mosquito adulto.

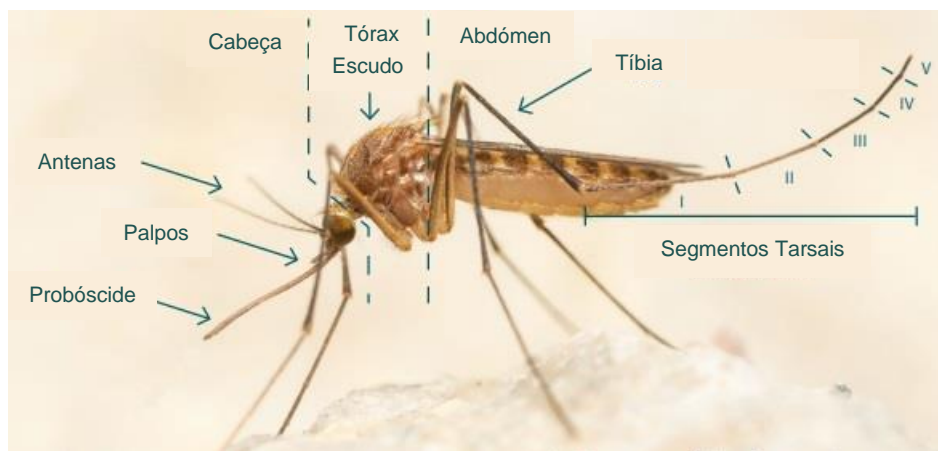


Figura 1 - Morfologia do mosquito adulto (fêmea de *Culex pipiens*) (Adaptado de ECDC 2022).

Os adultos de Anophelinae vivos podem ser distinguidos dos Culicinae, como *Aedes* spp. e *Culex* spp., quando repousam numa área plana. Quando pousam, os mosquitos Anophelinae, encontram-se com a probóscide, cabeça, tórax e abdômen em linha reta, formando um ângulo com a superfície, ao passo que os adultos de Culicinae mantêm o corpo angulado e o abdômen direcionado para a superfície. Os palpos das fêmeas Culicinae são, geralmente, cerca de um quarto do comprimento da probóscide, enquanto os palpos das fêmeas Anophelinae são do mesmo comprimento que a probóscide. O abdômen de *Anopheles* spp. apresenta pelos, mas não tem escamas (Taylor et al. 2016).

2.1.2. Ovos

Os ovos de mosquito exibem coloração escura e forma elíptica ou oval nos culicíneos e forma de barco nos anofelíneos. Ambos não sobrevivem à dessecação (Taylor et al. 2016). Os ovos dos anofelíneos possuem flutuadores e são colocados separadamente. Os ovos dos culicíneos não possuem flutuadores e podem ser colocados separadamente, no caso de *Aedes* spp., ou em conjunto formando uma jangada, no caso de *Culex* spp. (Almeida 2011).

2.1.3. Larvas

As larvas apresentam cabeça distinta com um par de antenas, olhos compostos e escovas bucais proeminentes (Taylor et al. 2016). Esta forma imatura exhibe um tórax globoso e abdômen mais delgado contendo 8 segmentos. Na subfamília Culicinae as larvas possuem sifão respiratório e na Anophelinae exibem um par de espiráculos no penúltimo segmento abdominal (Almeida 2011). Na figura 2 pode ser observada a morfologia da larva.

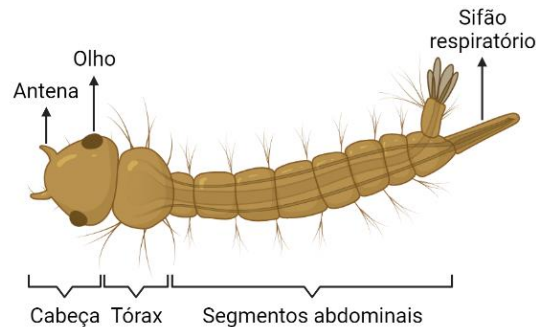


Figura 2 - Morfologia da larva da subfamília Culicinae (Ilustração original criada a partir de BioRender®).

2.1.4. Pupas

As pupas são organismos aquáticos e em forma de vírgula que apresentam um cefalotórax volumoso, onde se encontram as trompetas (estruturas respiratórias) e um longo abdômen que termina em paletas natatórias (Almeida 2011; Bowman 2014). Com o desenvolvimento da pupa as estruturas do mosquito adulto tornam-se mais evidentes (Bowman 2014). Na figura 3 pode ser observada a morfologia da pupa.

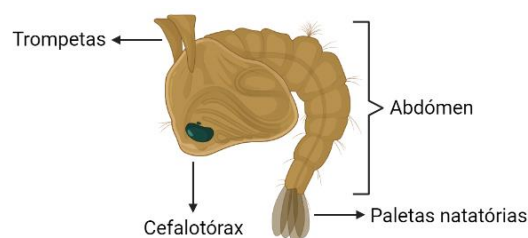


Figura 3 – Morfologia da pupa da família Culicidae (Ilustração original criada a partir de BioRender®).

2.2. Ciclo de vida da família Culicidae

Os culicídeos são holometabólicos, isto é, passam por metamorfoses completas, atravessando as diferentes fases do ciclo, em que as formas imaturas (ovo, estádios larvares e pupa), diferem do mosquito adulto no tipo de alimentação, meio ambiente e morfologia (CEVDI 2022). Na figura 4 está representado o ciclo de vida do mosquito *Culex* spp..

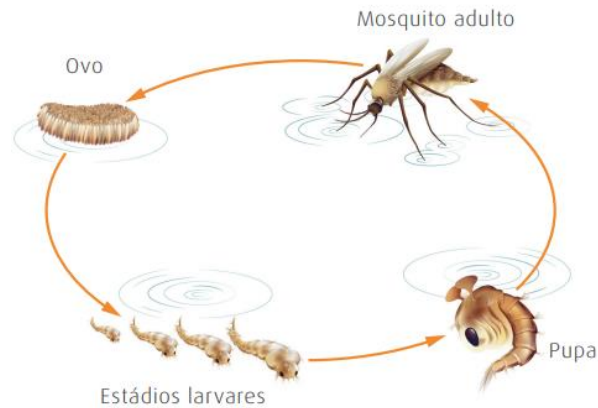


Figura 4 - Ciclo de vida do mosquito *Culex* spp. (CEVDI 2022).

Na subfamília Culicinae, a fêmea, após uma refeição de sangue, deposita até 300 ovos. A maioria das espécies de *Aedes* deposita os seus ovos em substratos húmidos, onde se desenvolvem e aguardam a presença da água necessária para estimular a eclosão. Nalguns casos, os ovos podem permanecer viáveis até 3 anos. Nas espécies do género *Culex*, os ovos são colocados em grupo, formando “jangadas”. Quando os ovos maturam, as larvas eclodem, independentemente da disponibilidade de água. A eclosão é dependente da temperatura e ocorre após vários dias ou semanas, mas em algumas espécies de clima temperado os ovos podem realizar diapausa invernal (Taylor et al. 2016).

Na subfamília Anophelinae os ovos dispõem de flutuadores laterais que evitam a submersão e preservam a orientação na água. As larvas eclodem, geralmente, dentro de dois ou três dias (Taylor et al. 2016).

Os quatro estádios larvares requerem, geralmente, duas semanas para se completarem (Bowman 2014), são aquáticos e desenvolvem-se numa grande variedade de criadouros, desde áreas extensas como pântanos a áreas mais reduzidas como a margem de poças (Taylor et al. 2016). No entanto, estão normalmente ausentes em grandes massas de água, tais como lagos ou rios com corrente. Várias espécies, em zonas temperadas, realizam diapausa invernal no estágio larvar. (Taylor et al. 2016).

Após a muda larvar final, ocorre a fase de pupa. As pupas permanecem geralmente à superfície da água, mas quando sofrem perturbações podem ser extremamente móveis (Taylor et al. 2016). De um modo geral, a fase de pupa tem uma duração de 2 dias a uma semana, mas algumas horas podem ser suficientes em climas secos (Bowman 2014).

O mosquito adulto emerge através de um orifício em forma de "T". Após 24 horas, as asas expandem-se e a cutícula endurece, tornando-se o mosquito apto a voar (Bowman 2014).

Os mosquitos são noturnos ou crepusculares. Apenas as fêmeas de mosquito, para além de se alimentarem de néctar e sucos vegetais, são hematófagas e na seleção de um hospedeiro adequado utilizam sinais olfativos (odor) e visuais (luz), a orientação da direção do vento e estímulos como a temperatura corporal do hospedeiro e a humidade (Almeida 2011; Taylor et al. 2016). As proteínas presentes no sangue são necessárias para o desenvolvimento inicial dos ovários e devem alimentar-se novamente entre cada lote de ovos amadurecidos. Uma inseminação é normalmente suficiente para a fertilização de todos os ovos. Depois da oviposição, a fêmea procura outro hospedeiro. Os machos alimentam-se de néctar e sucos vegetais (Bowman 2014; Taylor et al. 2016).

A fêmea de mosquito vive em média duas a três semanas, enquanto o macho vive, geralmente, apenas uma semana (Bowman 2014; Taylor et al. 2016). Apesar do tempo médio de vida dos mosquitos adultos ser geralmente curto, quando as temperaturas decrescem acentuadamente, algumas espécies realizam diapausa invernal, suspendendo as refeições sanguíneas (Almeida 2011; Taylor et al. 2016). Em alternativa, pode ocorrer a dissociação gonotrófica, ou seja, as fêmeas não realizam posturas, mas continuam a alimentar-se (Almeida 2011).

A realização de repetidas refeições sanguíneas, por parte das fêmeas adultas, em diferentes hospedeiros, torna os mosquitos em eficientes vetores de doença (Bowman 2014).

2.3. Mosquitos vetores de agentes infecciosos em Portugal

O programa REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores) resulta da cooperação entre a Direção-Geral da Saúde, as Administrações Regionais de Saúde e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Neste programa realiza-se, em todo o país, a vigilância entomológica de mosquitos (*Culicidae*), carraças (*Ixodidae*) e flebótomos (*Psychodidae*) e a pesquisa de flavivírus nos mosquitos (CEVDI 2022).

Segundo o programa REVIVE de 2021, as espécies de mosquitos mais comumente identificadas em Portugal incluem *Anopheles maculipennis* s.l., *Culex modestus*, *Culex pipiens*, *Culex theileri*, *Culex univittatus*, *Culiseta longiareolata* e *Ochlerotatus caspius*. Ainda foram identificadas neste projeto, embora com menor expressão, *Anopheles claviger*, *Culex hortensis*, *Culex laticinctus*, *Culex territans*, *Culiseta annulata* e *Ochlerotatus detritus* (CEVDI 2022).

As espécies exóticas *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* também foram identificadas em Portugal. A primeira espécie é detetada, continuamente, na ilha da Madeira e a segunda já foi identificada nos concelhos de Penafiel, Loulé, Faro e Tavira (CEVDI 2022).

2.3.1. Espécies mais comuns (REVIVE, 2021)

2.3.1.1. *Anopheles maculipennis* s.l.

O complexo *Anopheles maculipennis* s.l. engloba um conjunto de espécies cuja identificação morfológica é apenas possível no estágio de ovo. Em Portugal a espécie mais comum deste complexo é *Anopheles atroparvus* (CEVDI 2022). *An. atroparvus* hiberna como adulto, repousando em recintos fechados, como residências ou estábulos, no outono. As fêmeas permanecem em atividade durante o inverno e podem realizar refeições sanguíneas, irregularmente, sem posterior oviposição. A diapausa pode prolongar-se de setembro a abril no norte da Europa ou de novembro a fevereiro no sul. As fêmeas são principalmente zoófilas, mas também se alimentam frequentemente em humanos (Becker et al. 2020). *An. atroparvus* é um importante vetor da malária na Europa (Birnberg et al. 2020).

2.3.1.2. *Culex modestus*

Culex modestus é um eficiente vetor do VNO (Cotar et al. 2016) e está também envolvido na transmissão dos vírus Tahyna e Lednice (Danielová 1984; Rudolf et al. 2020). As fêmeas de *Cx. modestus* alimentam-se em aves e em mamíferos podendo atuar como vetores ponte para certos arbovírus (Radrova et al. 2013; Brugman et al. 2017). Por exemplo, no caso do VNO, os mosquitos que se alimentam tanto de aves como de mamíferos são referidos como vetores ponte, atuando como uma "ponte" entre o hospedeiro reservatório e o hospedeiro acidental (que não possui virémia suficientemente elevada para transmitir o vírus aos mosquitos) (Turell et al. 2002; Kilpatrick et al. 2005). As fêmeas alimentam-se também, frequentemente, no homem, junto aos seus criadouros. Pensa-se que esta espécie realiza diapausa invernal na fase adulta (Rudolf et al. 2020).

2.3.1.3. *Culex pipiens*

Culex pipiens desempenha um papel vital na circulação enzoótica do VNO e do vírus Usutu (USUV) na Europa (Fritz et al. 2015; Fros et al. 2015). Nesta espécie também já foi detetada infecção por vírus da febre do Vale do Rift (VFVR), vírus da encefalite japonesa, vírus Sindbis (SINV) e vírus Tahyna, sendo, adicionalmente, considerada vetor da malária e de *Dirofilaria immitis* e *D. repens* (ECDC 2020). Este vetor é abundante em todo o território português, sendo a vigilância entomológica desta espécie essencial (Rocha et al. 2020). As fêmeas realizam diapausa invernal em abrigos sem gelo, como caves, cavernas, ou tocas, regressando à atividade na primavera, quando aumenta a temperatura e exposição à luz. Efetuam a refeição sanguínea e repousam no exterior, podendo habitar perto de quase todos os tipos de fonte de água (ECDC 2022). Esta espécie é, maioritariamente, ornitófila e,

ocasionalmente, tem sido observada a alimentar-se em mamíferos, incluindo humanos (Becker et al. 2020).

2.3.1.4. *Culex theileri*

Culex theileri alimenta-se, maioritariamente, em mamíferos e, por vezes, em aves (Osório et al. 2012), realizando as refeições sanguíneas, geralmente, no exterior, mas também em residências e outras instalações fechadas (Becker et al. 2020). Esta espécie realiza diapausa invernal no estágio de adulto (CEVDI 2022). Na África do Sul, foram detetados mosquitos naturalmente infetados com VNO, SINV e VFVR (Demirci et al. 2014). Estudos de campo e laboratoriais demonstraram que *Cx. theileri* poderá ser o principal vetor de *Dirofilaria immitis* na Ilha da Madeira, Portugal (Santa-Ana et al. 2006).

2.3.1.5. *Culex univittatus*

O complexo *Culex univittatus* engloba as espécies *Cx. univittatus*, *Cx. perexiguus*, *Cx. neavei* e *Culex fuscocephala* (Mixão et al. 2016). *Culex univittatus* é a espécie mais prevalente deste complexo na Península Ibérica, sendo frequentemente encontrado no centro e sul de Portugal (CEVDI 2022). As fêmeas são maioritariamente ornitófilicas, alimentando-se também em mamíferos, incluindo o Homem (Mixão et al. 2016). Na África do Sul, *Cx. univittatus* é vetor primário do VNO e SINV (Becker et al. 2020).

2.3.1.6. *Culiseta longiareolata*

As fêmeas de *Cs. longiareolata* são consideradas maioritariamente ornitófilicas, alimentando-se raramente no Homem apesar desta espécie ser frequentemente observada em residências (Becker and Hoffmann 2011; Cetin et al. 2012). *Cs. longiareolata* é considerada vetor de parasitas sanguíneos nas aves (Becker and Hoffmann 2011). Nas regiões temperadas esta espécie realiza diapausa invernal na fase larval enquanto nas regiões mais frias realiza diapausa invernal na fase adulta (CEVDI 2022).

2.3.1.7. *Aedes (Ochlerotatus) caspius*

Aedes (Ochlerotatus) caspius realiza diapausa invernal na fase de ovo (Milankov et al. 2009). As fêmeas são zoofílicas e antropofílicas, estando presentes em zonas urbanas e rurais, podendo estar ativas durante o dia e a noite, mas realizam as refeições sanguíneas, habitualmente, ao anoitecer e no exterior (Becker et al. 2020; ECDC 2022). As luzes das armadilhas luminosas CDC repelem as fêmeas (Becker et al. 2020). Segundo Setinova e Smelova (1973), citado por Becker et al. (2020), o vírus do Nilo Ocidental, o vírus Tahyna e a bactéria *Francisella tularensis* podem ser detetados em populações naturais (Becker et al.

2020). Esta espécie é um vetor natural do vírus Tahyna e do vírus da mixomatose (CEVDI 2022).

2.3.2. Outras espécies identificadas (REVIVE 2021)

2.3.2.1. *Anopheles claviger*

Anopheles claviger é um complexo de espécies que inclui *An. claviger* s.s. e *An. petragrani* (Becker et al. 2020). Realizam diapausa invernal, na fase larvar, de novembro a abril e os adultos podem ser encontrados até ao fim do outono (Simşek 2006; Becker et al. 2020). As fêmeas são maioritariamente zoofílicas, preferindo animais domésticos, alimentando-se também no Homem (Lachmajer 1971; Becker et al. 2020). Após realizarem as refeições sanguíneas, geralmente ao crepúsculo, repousam em instalações de animais (Lachmajer 1971). *An. claviger* s.s. é um potencial vetor da malária. Contudo, como as populações deste vetor são geralmente de baixa densidade, a sua importância epidemiológica não é significativa (Becker et al. 2020).

2.3.2.2. *Culex hortensis*

A espécie *Culex hortensis* hiberna na fase adulta. Durante o dia repousa em locais escuros (Becker et al. 2020). As fêmeas alimentam-se essencialmente em batráquios e répteis e não realizam refeições sanguíneas em humanos (Boukraa et al. 2016).

2.3.2.3. *Culex laticinctus*

Culex laticinctus, segundo Ribeiro et al. (1988), citado por Almeida et al. (2005), é, aparentemente, uma espécie com pouco ou nenhum interesse como vetor de doenças zoonóticas (Almeida et al. 2005). Desconhece-se se esta espécie se alimenta no homem (Becker et al. 2020).

2.3.2.4. *Culex territans*

Culex territans hiberna exclusivamente como fêmea adulta, iniciando a oviposição no início da primavera (Zittra and Waringer 2015). Esta espécie, tal como as fêmeas de *Cx. hortensis*, alimenta-se essencialmente em batráquios e répteis. Por outro lado, *Cx. territans* também se pode alimentar em aves e mamíferos, o que constitui a possibilidade de esta espécie poder ser relevante na transmissão de arbovírus entre diferentes grupos de hospedeiros. Esta espécie pode ser considerada como potencial e provável vetor do vírus da encefalomielite equina do Leste (Boukraa et al. 2016).

2.3.2.5. *Culiseta annulata*

A espécie *Culiseta annulata*, geralmente, hiberna na fase adulta, no interior de residências e estábulos, podendo tornar-se extremamente incomodativa, quando a hibernação é interrompida pelo aumento da temperatura ou humidade (Becker et al. 2020; ECDC 2022). Quando o inverno é ameno, a hibernação pode também ocorrer na fase larvar. As primeiras fêmeas reaparecem no início da primavera. Nesta altura, alimentam-se no Homem e restantes mamíferos durante o dia, mas, nos meses de verão, revelam maior atividade noturna, entrando, frequentemente, em residências ou estábulos. Ocasionalmente, realizam a refeição sanguínea em aves. Esta espécie é um potencial vetor do vírus Tahyna e transmissor de alguns plasmódios de aves (Becker et al. 2020).

2.3.2.6. *Aedes (Ochlerotatus) detritus*

Segundo Gutsevich et al. (1974), citado por Becker et al. 2020, *Aedes (Ochlerotatus) detritus*, normalmente, hiberna na fase de ovo (Becker et al. 2020). As fêmeas são persistentes e alimentam-se principalmente em mamíferos, nomeadamente em gado bovino e humanos, mas também em algumas aves (Medlock et al. 2005). Realizam a refeição sanguínea predominantemente ao anoitecer, podendo também estar ativas durante o dia (Becker et al. 2020). Esta espécie é um potencial vetor do vírus da encefalite japonesa e do VNO (Mackenzie-Impoinvil et al. 2015; Blagrove et al. 2016).

2.3.2.7. *Aedes aegypti*

As fêmeas de *Aedes aegypti* alimentam-se em humanos, maioritariamente, e ocasionalmente, noutros mamíferos, realizando a refeição durante o dia e apenas esporadicamente à noite (Becker et al. 2020). *Ae. aegypti* é o principal vetor do vírus da febre amarela, mas é também um importante vetor do vírus da dengue (DENV), CHIKV e ZIKV (Failloux et al. 2017). No ano de 2012, ocorreu na ilha da Madeira, um surto do vírus da dengue, evoluindo rapidamente e resultando em mais de 2.100 casos (Quam et al. 2014). Atualmente, o vírus da dengue permanece uma ameaça à saúde pública da ilha, estando o vetor ativo durante todo o ano, mas alcançando o pico de abundância de agosto a outubro (CEVDI 2022; ECDC 2022).

2.3.2.8. *Aedes albopictus*

Aedes albopictus é considerada a espécie de mosquito mais invasora do mundo (Medlock et al. 2005). Esta espécie, na Europa, realiza diapausa invernal na fase de ovo. Os adultos são detetados entre abril e novembro, tornando-se mais ativos no período de maio a setembro (CEVDI 2022; ECDC 2022). As fêmeas adultas alimentam-se, predominantemente,

em humanos, mas também em outros mamíferos, incluindo coelhos, cães, vacas, esquilos e, ocasionalmente, em aves, como Passeriformes e Columbiformes, e em anfíbios e reptéis (Becker et al. 2020; ECDC 2022). Realizam a refeição sanguínea, geralmente durante o dia, no exterior, mas também durante a noite, no interior de residências (ECDC 2022). Esta espécie de mosquito revelou competência em condições laboratoriais para, pelo menos, 26 arbovírus incluindo CHIKV, DENV, febre amarela, VNO e vírus da encefalite japonesa (Paupy et al. 2009). *Ae. albopictus* foi responsável por casos de CHIKV e DENV na Europa (Failloux et al. 2017).

3. Vírus do Nilo Ocidental

3.1. Etiologia

O vírus do Nilo Ocidental possui potencial zoonótico e apresenta distribuição quase cosmopolita (Rudolf et al. 2017). Este arbovírus pertence à família *Flaviviridae* e ao género *Flavivirus*, integrando o complexo do vírus da Encefalite japonesa (Bakonyi et al. 2006; Rico-Hesse et al. 2019).

A primeira estirpe (B 956) foi isolada de um paciente humano no distrito Nilo Ocidental no Uganda em 1937. Posteriormente, o vírus foi também detetado em várias espécies de aves e mosquitos, em cavalos, em humanos e noutros hospedeiros em África, na Europa, na Ásia e na Austrália (onde é designado vírus Kunjin) (Peiris and Amerasinghe 1994; Hubálek and Halouzka 1999). Nos continentes europeu, africano e asiático, o VNO pode causar desde infeções relativamente leves ou sem doença aparente a encefalite e/ou morte na população humana, cavalos ou aves (Peiris and Amerasinghe 1994; Hubálek and Halouzka 1999; Zeller and Schuffenecker 2004; van der Meulen et al. 2005; Bakonyi et al. 2006). No continente americano, o VNO apresenta maior virulência entre as populações de aves selvagens e causa, mais frequentemente, sintomas graves no sistema nervoso central e mortes em humanos e cavalos (Campbell et al. 2002; Bakonyi et al. 2006).

O VNO é biologicamente diverso, tendo sido propostas até nove linhagens genómicas. No entanto, a maioria dos surtos humanos de encefalite causada por este vírus foram atribuídos às linhagens 1 e 2 (Hubálek et al. 2014; Fall et al. 2017).

O vírus permanece estável a pH ligeiramente alcalino de 8.0, mas é facilmente inativado mediante exposição a pH ácido, temperaturas superiores a 40°C, solventes orgânicos, detergentes, luz ultravioleta e radiação gama (Rico-Hesse et al. 2019).

A partícula esférica do VNO tem aproximadamente 50 nm de diâmetro e consiste numa membrana com bicamada lipídica, que envolve o nucleocapsídeo contendo uma cadeia simples de RNA de sentido positivo de cerca de 11 000 nucleótidos. Podem ser distinguidas duas formas do vírus, viriões maduros e viriões imaturos. Incorporadas na membrana do virião maduro incluem-se a proteína do envelope viral (E) e as proteínas da membrana (M) que são

responsáveis por importantes características do vírus, nomeadamente a variedade de hospedeiros, o tropismo tissular, a replicação, a maturação, e a estimulação das respostas imunitárias das células B e T. Complementarmente, a proteína E é a hemaglutinina viral, que medeia a ligação dos recetores e a atividade de fusão. Os viriões imaturos intracelulares contêm o precursor prM, que é clivado em M durante a maturação (Campbell et al. 2002; Rico-Hesse et al. 2019). Os virões contêm ainda uma terceira proteína estrutural – a capsid (C). Nas células infetadas são sintetizadas sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Firth and Atkins 2009). NS1 assume múltiplas formas e funções, podendo atuar na replicação do RNA viral e na regulação da ativação do complemento. Uma dessas formas, a proteína NS1', desempenha um importante papel na neuroinvasão viral (Melian et al. 2010). Na figura 5 está representada a estrutura do virião do VNO.

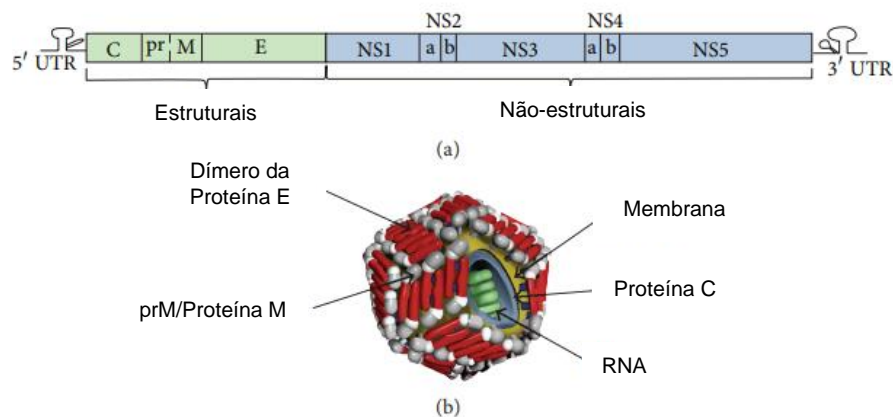


Figura 5 - Organização do genoma do vírus do Nilo Ocidental e composição do respetivo virião.
a) No genoma viral estão representadas 3 proteínas estruturais (representadas a verde) e 7 proteínas não estruturais (representadas a azul). b) Estrutura do virião do VNO simbolizando as proteínas estruturais, a membrana e o RNA. (Adaptado de Chancey et al. 2015).

3.2. Epidemiologia

3.2.1. Hospedeiros

Na natureza, o VNO circula entre as aves, principalmente selvagens, como hospedeiros vertebrados primários e amplificadores, e os mosquitos que se alimentam em aves. Na Europa, *Culex pipiens* é o vetor predominantemente envolvido (Hubálek and Halouzka 1999; Hubálek 2000; DGAV [s.d.]). Um estudo revelou que o melro-preto (*Turdus merula*) e a pega-rabuda (*Pica pica*) são os hospedeiros preferidos por esta espécie de mosquito (Rizzoli et al. 2015). Por outro lado, Hamer et al. verificou que o pardal-doméstico (*Passer domesticus*) e o tordo-americano (*Turdus migratorius*) foram identificados como espécies chave para a manutenção do vírus na natureza (Hamer et al. 2011). As aves atuam como reservatório, mas também podem contrair a doença. Os corvídeos, principalmente, mas também as aves de rapina e os gansos são algumas das aves mais suscetíveis de

desenvolver sinais clínicos (Scott 2021; DGAV [s.d]). A família *Corvidae*, uma vez infectada, para além de possuir uma elevada probabilidade de desenvolver a doença, resulta frequentemente em morte (Komar et al. 2003).

Os seres humanos e os equídeos são hospedeiros de fundo de saco, com os equinos atuando como espécie sentinela em muitos países (Gamino and Höfle 2013; Rudolf et al. 2017; Lourenço et al. 2022). Ambos são considerados hospedeiros acidentais, não participando no ciclo de vida do VNO, pois não desenvolvem virémia suficientemente elevada para infectar os vetores (Chancey et al. 2015).

Ocasionalmente, pelo menos 30 outras espécies de vertebrados, incluindo outros mamíferos, alguns anfíbios e répteis também são suscetíveis à infeção pelo VNO. No entanto, em apenas alguns destes vertebrados, como por exemplo os hamsters, já foram reportados níveis de virémia suficientes para infectar os vetores (Root 2013; Hubálek et al. 2014; Chancey et al. 2015).

3.2.2. Transmissão

A ecologia do vírus do Nilo Ocidental caracteriza-se por um ciclo enzoótico de transmissão, esquematizado na figura 6, mantido entre mosquitos e espécies de aves selvagens (Lourenço et al. 2022). As aves migratórias desempenham um papel essencial na distribuição geográfica generalizada do VNO (Hubálek et al. 2014).

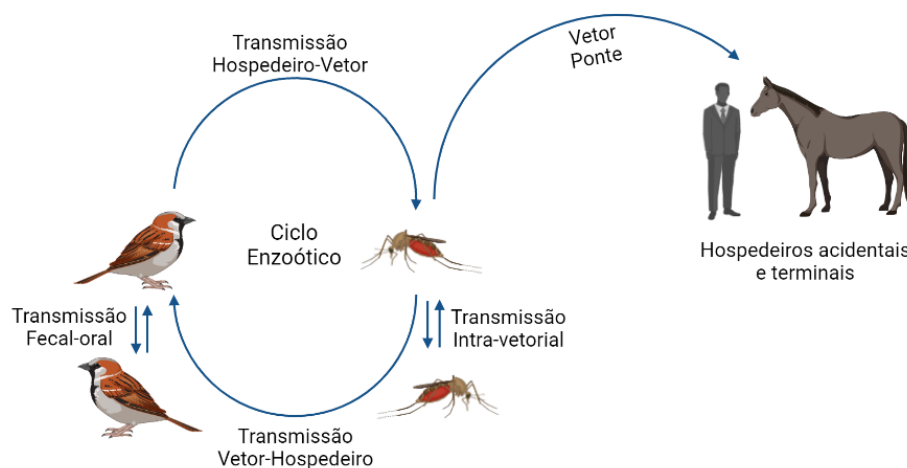


Figura 6 - Ciclo de transmissão do vírus do Nilo Ocidental (Ilustração original criada a partir de BioRender®).

A época de transmissão parece ocorrer entre os meses de março e novembro, alcançando, frequentemente, o pico no verão e atingindo valores mínimos de transmissão durante o inverno (Lourenço et al. 2022).

Depois do mosquito, vetor natural do VNO, se alimentar num hospedeiro infectado, o arbovírus replica-se, podendo ser transmitido rapidamente, através da secreção proveniente das glândulas salivares, aquando de uma nova alimentação num hospedeiro suscetível

(Reisen et al. 2006; Chancey et al. 2015). O VNO também pode ser transmitido através de contacto direto de aves suscetíveis com fluidos orais ou cloacais de outras aves infetadas com níveis de virémia elevados (van der Meulen et al. 2005; Chancey et al. 2015) e de consumo de cadáveres de animais infetados e mosquitos infetados (ambos produtos alimentares naturais de algumas espécies) (Komar et al. 2003). Os órgãos com a carga viral mais elevada incluem o cérebro, o rim e os intestinos (Komar et al. 2003). Adicionalmente, infeções persistentes nos ovários suscitam a possibilidade de transmissão transovárica (Komar et al. 2003). A infeção crónica, com a permanência do vírus em alguns tecidos até 43 dias, pode contribuir para a transmissão durante o inverno, através do mecanismo de predação (Nemeth et al. 2009; Byas and Ebel 2020). No entanto, a cronicidade não parece influenciar a transmissão através da alimentação do artrópode, uma vez que o vírus, segundo um estudo realizado em pardais-domésticos (*Passer domesticus*), apenas persiste até seis dias no sangue (Nemeth et al. 2009).

No caso dos humanos, está também documentada a transmissão do VNO por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão transplacentária e através do leite materno (Iwamoto et al. 2003; Pealer et al. 2003; Gould and Fikrig 2004; Hinckley et al. 2007).

3.2.2.1. Barreiras à infeção e transmissão

No interior do organismo do mosquito estão presentes barreiras para impedir a sua infeção, incluindo a membrana peritrófica, as células epiteliais do intestino médio e a barreira das glândulas salivares (Vogels et al. 2017).

Após a ingestão de uma refeição sanguínea, as partículas virais atravessam o sistema digestivo do mosquito até ao intestino médio. A primeira potencial barreira é a membrana peritrófica (Vogels et al. 2017). A membrana peritrófica é uma estrutura sacular composta por uma rede de quitina e proteínas, formando uma matriz filamentosa que envolve a refeição sanguínea no intestino médio (Terra 2001). Os poros da membrana peritrófica possuem um diâmetro entre 20 e 30 nm, comparativamente aos 50 nm de diâmetro do virião do vírus do Nilo Ocidental (Hardy et al. 1983). Os viriões próximos das células epiteliais terão de entrar nas mesmas, através das microvilosidades, antes da refeição sanguínea ser envolvida pela matriz (Franz et al. 2015). No caso do *Ae. aegypti*, por exemplo, a membrana é formada 4 a 8 horas após a alimentação (Perrone and Spielman 1988).

A entrada dos flavivírus nas células epiteliais do intestino médio ocorre, muito provavelmente, através de recetores na membrana, ocorrendo replicação do vírus nas próprias células, passando posteriormente para o hemocélio, de forma a atingir os restantes órgãos. Alternativamente, pode ocorrer infeção das traqueias, uma rede de estruturas tubulares que conecta as células epiteliais e a camada externa da lâmina basal. Por outro lado, numa diminuta percentagem de mosquitos, ocorre o fenómeno “leaky gut”, em que os

virões alcançam diretamente o hemocélio, a partir do lúmen intestinal, sem penetrar a camada epitelial (Vogels et al. 2017).

Após a infecção da hemolinfa, os viriões propagam-se e infetam tecidos secundários, incluindo hemócitos, tecido adiposo, tecido muscular, tecido nervoso e glândulas salivares (Girard et al. 2004). As glândulas salivares apresentam-se envoltas pela lâmina basal, que origina uma barreira física aos recetores da superfície celular, necessários à entrada do arbovírus na célula (Romoser et al. 2005; Franz et al. 2015). Além disso, o sistema imunitário pode restringir a replicação intracelular do vírus (Sim et al. 2012; Franz et al. 2015). Na sequência da replicação viral, o vírus é depositado nas células acinares, podendo, posteriormente, levar à inoculação num hospedeiro após nova refeição (Forrester et al. 2014).

3.2.3. Vetores

3.2.3.1. Os Mosquitos enquanto Vetores

Nem todas as espécies de mosquitos reportadas infetadas com VNO são consideradas vetores competentes e nem todas as espécies que são competentes em laboratório desempenham um papel significativo na transmissão natural (Turell et al. 2005). A capacidade vetorial é definida como a eficiência de um vetor na transmissão de um agente patogénico (Vogels et al. 2017). Este conceito depende de vários fatores determinantes, tais como a competência vetorial, as condições ambientais, o comportamento alimentar dos mosquitos (preferências alimentares e a hora do dia em que é realizada a alimentação) e a sua densidade populacional e sobrevivência. A competência vetorial é a capacidade de um vetor de adquirir, manter e transmitir um agente patogénico (Turell et al. 2005; Kenney and Brault 2014). Complementarmente, a deteção repetida do vírus em espécies recolhidas no terreno e a associação na natureza entre os artrópodes e os hospedeiros vertebrados são também critérios considerados na definição de uma espécie como vetor do VNO. Uma determinada espécie, por exemplo, *Culex pipiens*, pode ser considerado o vetor mais importante de uma área geográfica, mas pode não ter um papel relevante noutras zonas (Turell et al. 2005). O controlo preferencial de mosquitos altamente competentes é necessário para reduzir o potencial de transmissão do vírus (Vogels et al. 2017).

Na Europa, seis espécies de mosquitos foram demonstradas como vetores competentes, nomeadamente *Culex pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. perexiguus*, *Cx. torrentium*, *Aedes albopictus*, e *Ae. detritus* (Balenghien et al. 2008; Muñoz et al. 2012; Blagrove et al. 2016; Brustolin et al. 2016; Jansen et al. 2019; Costa et al. 2021). O VNO já foi detetado em mais nove géneros de mosquitos incluindo, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Mimomyia Ochlerotatus*, *Psorophora* e *Uranoteania* (Engler et al. 2013). Em Portugal, o VNO foi isolado em três espécies de mosquitos, nomeadamente *Anopheles*

maculipennis s.l., *Cx. univittatus*, e *Cx. pipiens* (Filipe and Pinto 1972; Esteves et al. 2005). *Culex pipiens* é considerado o principal vetor de transmissão do vírus do Nilo Ocidental em Portugal (Osório et al. 2014).

3.2.3.1.1. Outros potenciais vetores

Alguns géneros de carraças incluindo *Hyalomma*, *Argas* e *Ornithodoros* poderão desempenhar um papel alternativo, ainda pouco definido, como vetores do VNO (Hubálek et al. 2014).

3.2.3.2. Transmissão intra-vetorial

A transmissão vertical, de fêmeas adultas à sua descendência, proporciona o mecanismo de *overwintering* do vírus (Chancey et al. 2015; Byas and Ebel 2020). Os flavivírus infetam o óvulo, totalmente formado, depois deste ter saído do ovário. Assim, sugere-se que poderá ocorrer a transmissão do vírus a um hospedeiro final sem que o mosquito se alimente primeiramente num hospedeiro primário infetado (Anderson and Main 2006).

3.3. Patogenia e Sinais Clínicos

3.3.1. Aves

Em gansos e alguns passeriformes, como corvos e gaios, a virémia pode atingir o pico a partir de 2-3 dias pós-infeção (dpi), enquanto em aves de rapina e galinhas o mesmo pode ser alcançado aos 4-6 dpi. Os sinais clínicos surgem aproximadamente em 5 dpi em aves experimentalmente infetadas com VNO, podendo estar ausentes tanto em infeções experimentais como naturais (Gamino and Höfle 2013). Inúmeras aves são resistentes à doença, podendo recuperar na presença de sinais clínicos ligeiros e moderados (Scott 2021; DGAV [s.d.]). Em casos graves, os índices elevados de mortalidade nem sempre se correlacionam com os sinais histopatológicos. Tal pode corresponder a uma infeção aguda fulminante resultando em morte súbita de forma tão rápida que as lesões não se desenvolvem histologicamente (Gamino and Höfle 2013).

Os sinais clínicos inespecíficos incluem depressão, anorexia, desidratação, anormalidades no crescimento das penas (como penas comprimidas e cálamo hemorrágico) e morte súbita. Verificam-se também sinais neurológicos como ataxia, paralisia e convulsões e sinais oculares como inflamação do pécten, inflamação da coróide ou da retina, necrose da retina e endoftalmite generalizada (Hubálek et al. 2014; Wünschmann et al. 2017; Byas and Ebel 2020; Scott 2021). As manifestações neurológicas são indicativas de encefalite viral e são semelhantes às observadas em humanos e noutros vertebrados. Esta encefalite é caracterizada como uma meningoencefalite linfoplasmocítica (Byas and Ebel 2020).

3.3.2. Equídeos

Os sinais clínicos de infecção por VNO em cavalos, para além da febre, estão principalmente relacionados com a infecção e inflamação do sistema nervoso. Aproximadamente 20% dos cavalos infetados desenvolvem sinais neurológicos (Byas and Ebel 2020). Os sinais clínicos mais graves incluem ataxia, permanência em decúbito (fraqueza muscular), paraparesia, tetraparesia, convulsões e morte (Ward et al. 2006; Venter et al. 2017). Adicionalmente, verifica-se anorexia, depressão, ranger dos dentes, défices proprioceptivos, fasciculações musculares, hiperexcitabilidade, movimentos circulares e alterações comportamentais (Ward et al. 2006; Paré and Moore 2018; Byas and Ebel 2020; DGAV [s.d.]). A mortalidade em cavalos não vacinados situa-se entre 30 e 50%, abrangendo tanto a morte natural como a eutanásia eletiva (Ward et al. 2006; Silva et al. 2019). Dos equinos que recuperam, cerca de 10 a 20% apresentam défices neurológicos remanescentes (Paré and Moore 2018).

3.3.3. Homem

No Homem, a infecção por VNO é considerada uma doença zoonótica grave. O período de incubação varia geralmente entre dois e seis dias, podendo estender-se até catorze dias (DGS 2018). A infecção é assintomática em cerca de 80% dos casos e manifesta-se como uma gripe em aproximadamente 20% dos casos (Paré and Moore 2018). A maioria dos doentes sintomáticos apresenta febre, que dura até uma semana, dores de cabeça, problemas gastrointestinais, incluindo náusea e vômito, erupções cutâneas, mialgia, artralgia, indisposição e fadiga (Sejvar 2014; Byas and Ebel 2020). Os sinais clínicos neurológicos, tal como meningite, encefalite e poliomielite, surge em menos de 1% das infeções (Sejvar 2014; Paré and Moore 2018). No entanto, nestes casos, a mortalidade pode atingir os 20%, e a doença crónica desenvolve-se na maioria dos sobreviventes (Paré and Moore 2018).

As sequelas incluem problemas de memória, dor de cabeça, disfunção cognitiva, depressão, fadiga, tremores, diminuição da força e reflexos anormais (Carson et al. 2006; Murray et al. 2018). No caso da ocorrência de uma infecção renal durante o período sintomatológico, o vírus pode persistir nos rins até sete anos e culminar em doença renal crónica (Murray et al. 2010).

3.4. Lesões anatomopatológicas

Em aves, cavalos e humanos o vírus apresenta um neurotropismo caracterizado, principalmente, por inflamação com infiltração de células mononucleares, necrose neuronal e gliose (Byas and Ebel 2020).

As espécies de aves mais suscetíveis tendem a morrer rapidamente, apresentando lesões pouco significativas ou não observáveis. Em espécies menos suscetíveis verifica-se, maioritariamente, invasão do sistema nervoso central, fígado, baço, rim, coração e globo ocular (Gamino and Höfle 2013). Observa-se, muitas vezes, miocardite e inflamação multiorgânica com necrose como, por exemplo, hepatite necrótica, esplenite e pancreatite (Hubálek et al. 2014). O anexo 3 especifica as lesões, nos diferentes sistemas, identificadas em aves. Em cavalos, para além das lesões a nível do sistema nervoso central, inclui-se hemorragia na medula renal, atrofia dos folículos linfóides do baço e miocardite focal (Cantile et al. 2001). Identicamente às aves, em humanos, parecem verificar-se lesões a nível renal e ocular (Byas and Ebel 2020).

3.5. Diagnóstico

O vírus do Nilo Ocidental apresenta um quadro clínico muito diverso, devendo ser diferenciado de outras causas de doença neurológica e dos restantes flavivírus serologicamente relacionados (Rico-Hesse et al. 2019; Scott 2021).

A deteção do genoma viral em amostras de sangue total, soro, líquido cefalorraquidiano (LCR), plasma e urina através de RT-qPCR tornou-se o método de diagnóstico de rotina. No entanto, a identificação molecular do RNA viral pode não ser fiável devido ao curto período e níveis baixos de virémia, devendo o diagnóstico basear-se principalmente em serologia (Lustig et al. 2018). A deteção de anticorpos IgM através de ELISA em soro ou LCR confirma o diagnóstico quando associado a sinais clínicos compatíveis. A deteção de IgM através de ELISA é o teste de eleição uma vez que os anticorpos IgM são de curta duração e indicativos de uma infeção recente (Paré and Moore 2018). A reação serológica cruzada entre os flavivírus é um obstáculo ao diagnóstico quando se recorre a IgG através de ELISA, baixando a especificidade da serologia (Costa et al. 2021). Os ensaios de seroneutralização têm sido utilizados para identificar mais rigorosamente os serocomplexos de Flavivírus (Rico-Hesse et al. 2019). Pode também ser realizada histopatologia com Imunohistoquímica de tecido cerebral (Scott 2021).

O Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) realiza, nas aves, pesquisa do VNO através de RT-qPCR (com amostras de rim, coração, cérebro, intestino ou zaragatoa cloacal), pesquisa e titulação de anticorpos do VNO através de seroneutralização (com amostras de soro, plasma ou LCR) e pesquisa de anticorpos IgG de VNO através de ELISA (com amostras de soro, plasma ou LCR) (INIAV [s.d.]). Em equídeos, o INIAV efetua pesquisa do VNO através de RT-qPCR (com amostras de cérebro, espinhal medula, baço ou sangue), pesquisa e titulação de anticorpos do VNO através de seroneutralização (com amostras de soro, plasma ou LCR) e pesquisa de anticorpos IgM de VNO através de ELISA (com amostras de soro, plasma ou LCR) (INIAV [s.d.]).

3.6. Profilaxia médica e sanitária

3.6.1. Plano de Vigilância Português para a FNO

Considerando a transmissão do vírus e hospedeiros envolvidos, definiram-se dois níveis de vigilância. O Nível 1 inclui a vigilância em aves e a vigilância entomológica e o Nível 2 é referente à vigilância em equinos (DGAV [s.d.]).

3.6.1.1. Vigilância em aves

A vigilância ativa implica a obtenção de amostras provenientes de aves selvagens (aves sentinela). Por outro lado, a vigilância passiva tem como base a análise laboratorial de cadáveres de aves selvagens, considerando prioritárias as aves da família *Corvidae* e as aves com rotas migratórias no Norte de África (DGAV [s.d.]).

3.6.1.2. Vigilância entomológica

A vigilância entomológica envolve a colocação de armadilhas para captura de vetores nas zonas de risco. Os mosquitos devem ser, posteriormente, enviados para isolamento viral no INIAV (DGAV [s.d.]).

3.6.1.3. Vigilância em equinos

A vigilância passiva envolve a divulgação, para os produtores e médicos veterinários, acerca dos sinais clínicos compatíveis com a doença e o exame clínico de todos os animais que apresentem essa mesma sintomatologia. Complementarmente, é aconselhada a proteção dos equinos da exposição aos vetores nos períodos de maior atividade dos mesmos, a utilização de repelentes quando os animais não se encontram nas boxes, o uso de inseticidas junto às instalações, a eliminação dos locais mais prováveis de reprodução de mosquitos e notificação à Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) de cadáveres de aves selvagens nas imediações das explorações (DGAV [s.d.]).

A vigilância ativa inclui a amostragem dos equinos, quando considerado epidemiologicamente relevante, nomeadamente em zonas de risco e explorações vizinhas dos focos e a testagem de soros para outros diagnósticos (DGAV [s.d.]).

A DGAV autoriza a vacinação voluntária de equinos, em área considerada de risco, utilizando uma vacina inativa contra o vírus do Nilo Ocidental. Para cada caso, a autorização e respetiva vacina devem ser solicitadas pelo médico veterinário assistente de cada exploração (DGAV 2020).

3.6.1.3.1. Medidas em caso de suspeita clínica em equinos

Em caso de suspeita de infeção com VNO é necessário notificar a Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária Regional (DSAVR). Devem colher-se amostras de sangue para diagnóstico em vida e amostras de tronco cerebral, cérebro e LCR para diagnóstico *post mortem*. Estas amostras deverão ser enviadas para o INIAV. Adicionalmente deve realizar-se a desinsetização da exploração em causa (DGAV [s.d.]).

3.6.1.3.2. Medidas em caso de confirmação da doença em equinos

Caso se verifique um diagnóstico definitivo positivo para o VNO deve acompanhar-se o estado clínico dos animais infetados. Complementarmente, é necessário reforçar a utilização de inseticidas nos animais da exploração em causa. Em todas as explorações num raio de 20 km em redor do foco, deve realizar-se a vigilância clínica dos animais, bem como, reforçar a desinsetização (DGAV [s.d.]).

3.7. Casos em Portugal

Ainda não é claro se o vírus do Nilo Ocidental circula endemicamente em Portugal ou se circula apenas esporadicamente (Lourenço et al. 2021). Em Portugal apenas foram notificadas quatro infeções humanas, serologicamente confirmadas (Lourenço et al. 2022). Em 2004, na Ria Formosa (Algarve), dois irlandeses testaram positivo para VNO tendo sido detetados anticorpos IgM. Ambos revelaram sinais clínicos semelhantes a um quadro de influenza e, subsequentemente, um deles desenvolveu sinais ligeiros de encefalite (Connell et al. 2004). Um terceiro caso foi relatado em 2010, em Setúbal, apresentando um quadro maioritariamente febril, tendo sido reportados, dois meses depois, dois casos em equinos apenas a 4km (Alves et al. 2012). A mais recente infeção humana ocorreu em 2015, em Almancil (Algarve), verificando-se doença neuroinvasiva (Zé-Zé et al. 2015).

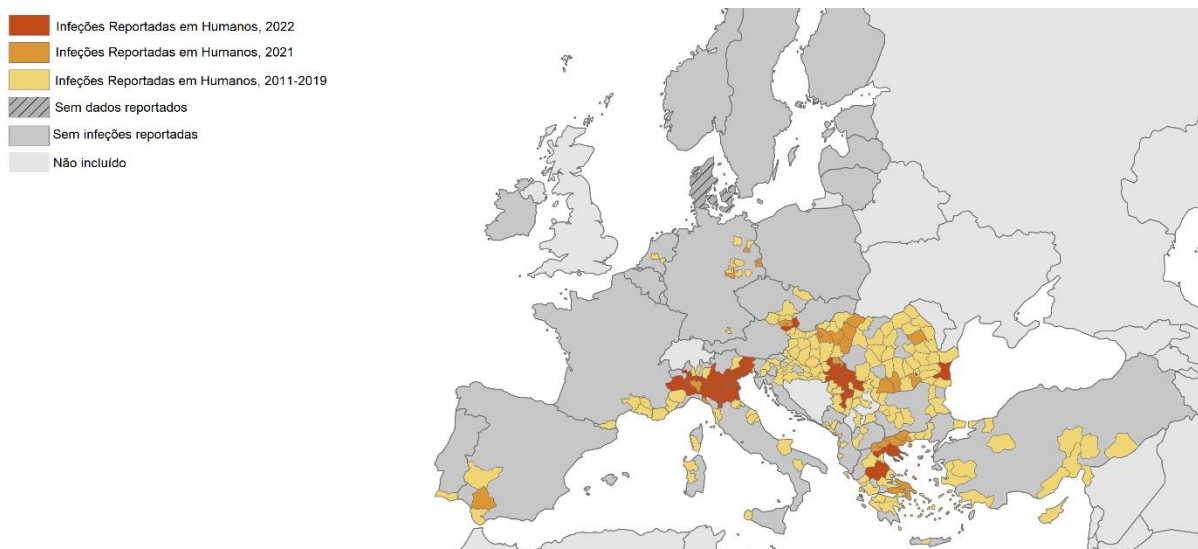


Figura 7 - Distribuição das infecções de VNO reportadas em Humanos, na Europa, de 2011 a 22 de agosto de 2022 (Adaptado de ECDC 2022).

Tabela 1 - Distribuição dos focos nacionais reportados em equinos desde 2015 (Adaptado de DGAV 2022a; DGAV 2022b).

Ano	Região/Concelho	Número de Focos
2015	Alentejo	3
	Algarve	5
2016	Alentejo	1
	Algarve	4
2017	Lisboa e Vale do Tejo	2
	Alentejo	1
2018	Viana do Alentejo	1
2019	Silves	1
	Lagoa	1
2020	Castelo Branco	1
	Alcácer do Sal	1
2021	Coruche	1
	Loulé	1
	Silves	1
	Beja	1
2022	Alcácer do Sal	1
	Portalegre	1
	Castro Verde	1

3.7.1. Prováveis casos de febre do Nilo Ocidental no CERAS

Ao longo dos meses de junho e julho de 2020, entraram no CERAS juvenis de mocho-galego (*Athene noctua*), exibindo sinais de debilidade, emaciação e desidratação. Foram recuperando com tratamento de suporte e alimentação forçada e, posteriormente, transferidos para uma instalação exterior. Nesta instalação treinavam o voo e a caça, numa fase de pré-libertação (Lopes and Nascimento 2020).

A partir do final do mês de agosto e até meio de setembro verificou-se morte súbita em quatro dos mochos-galegos e sinais neurológicos e ocular num quinto, todos em recuperação na mesma instalação (Lopes and Nascimento 2020).

Este último ingressou no centro com sinais clínicos semelhantes aos outros, mas passados 11 dias, apresentou apatia, perda de apetite, mucosas pálidas, *head tilt*, torcicolo, diminuição dos reflexos de ameaça e pupilares, irregularidades ao nível do pécten e diminuição da acuidade visual ou cegueira. Foi enviado soro para o INIAV para pesquisa de anticorpos IgG (ELISA) para o vírus do Nilo Ocidental, com resultado positivo, e o cadáver para PCR, com resultado negativo (Lopes and Nascimento 2020).

À necrópsia, dos primeiros quatro mochos-galegos, foram encontrados vários achados macroscópicos, incluindo coloração esbranquiçada do pâncreas, presença de fibrina no pericárdio, dilatação ventricular esquerda, diminuição da espessura das paredes ventriculares, septo ventricular não detetado e microcardia (Lopes and Nascimento 2020).

Outros três mochos-galegos que estavam em recuperação na mesma gaiola e com história semelhante foram libertados no fim de outubro (Lopes and Nascimento 2020).

O quadro sintomatológico inespecífico, neurológico e ocular, as lesões anatomopatológicas inespecíficas, a mortalidade em grupo (agente infeccioso), o resultado de serologia positivo, a sazonalidade e um caso reportado num cavalo da região em julho de 2020 (Lourenço et al. 2021) são evidências, que em conjunto, contribuem para a possibilidade de o vírus do Nilo Ocidental ser considerado um possível diagnóstico presuntivo (Lopes and Nascimento 2020).

ESTUDO DE INSETOS POTENCIAIS VETORES DE AGENTES INFECIOSOS NA ÁREA DE ATIVIDADE DO CENTRO DE ESTUDOS E RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS DE CASTELO BRANCO

1. Objetivos

A presente dissertação teve como objetivos:

1. Analisar a fauna de mosquitos vetores presentes na área de atividade do Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens de Castelo Branco (CERAS), tendo em conta as suspeitas de casos de Febre do Nilo Ocidental, neste Centro em 2020, e, adicionalmente, o facto de terem sido detetados resultados positivos (IgG), em ELISA (ESA-IPCB e INIAV), em soros de aves que estiveram em recuperação no Centro (artigo ainda não publicado), no período de 2020 e 2021.

2. Relacionar a ocorrência de mosquitos com as condições meteorológicas.

3. Avaliação preliminar da existência de um período sazonal sem atividade vetorial ou que espécies mantêm a sua atividade durante os meses de inverno.

2. Materiais e métodos

2.1. Captura de mosquitos com armadilhas

2.1.1. Funcionamento das armadilhas

No âmbito da realização do presente estudo foram utilizadas em simultâneo duas armadilhas luminosas do tipo miniatura CDC (Center for Disease Control) (CDC miniature blacklight modelo1212, John Hock, EUA) para a captura dos mosquitos. A figura 8 apresenta uma armadilha utilizada para a captura de mosquitos.



Figura 8 - Armadilha utilizada para a captura de mosquitos (Fotografia original).

Cada armadilha é colocada entre 1,70m e 2,00m de altura e ligada a uma bateria que aciona a ventoinha e acende a lâmpada de luz UV. As pás da ventoinha têm sentido oblíquo o que permite a entrada dos insetos, mas que impossibilita a sua saída, enquanto a ventoinha estiver a funcionar. A lâmpada de luz UV (Lâmpada tubular 4W 230V fluorescente UV) é utilizada para atrair os insetos. As baterias, no momento da sua utilização, foram cobertas com plástico ou madeira de forma a serem protegidas da humidade da noite e da chuva.

Como atrativo de mosquitos, foi também utilizado dióxido de carbono (CO₂), com o objetivo de mimetizar a respiração dos hospedeiros. Visto a logística da utilização do gelo seco ser pouco viável, tendo em conta as condições e localização do Centro, foram utilizadas pastilhas de CO₂ (Pastilhas atrativas CO₂ mosquitos – Ecoced®). Para ativar as pastilhas e iniciar a libertação de CO₂ estas foram colocadas em água (cada pastilha é sublimada em gás durante aproximadamente duas semanas). Foram utilizadas sondas para ligar o recipiente contendo as pastilhas à entrada da armadilha, de forma a direcionar o CO₂ libertado.

Na figura 9 encontra-se exemplificado o esquema da instalação de uma armadilha para a captura dos mosquitos.

As armadilhas eram acionadas ao final do dia e verificadas no dia seguinte de manhã. Para retirar a colheita obtida, sem permitir que os espécimes sejam libertados e de forma a que possam ser transportados, foi necessário encerrar a parte superior da rede com um nó utilizando cordões, antes de desligar a ventoinha. A colheita obtida, geralmente de 2 em 2 dias, era retirada e colocada no congelador a - 20°C até à morte dos exemplares, sendo estes colocados em placas de Petri e, novamente, congelados.

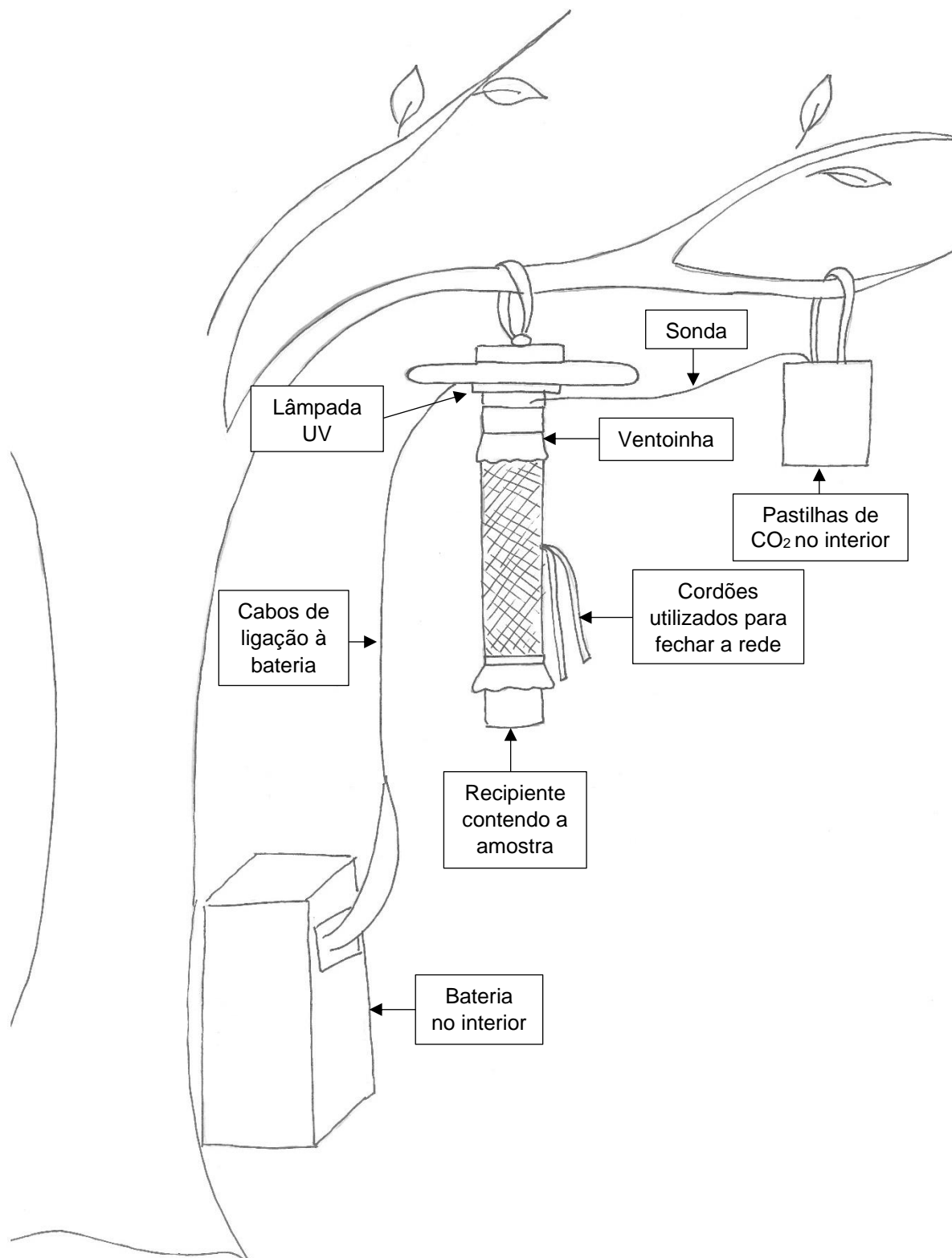


Figura 9 – Ilustração esquemática dos componentes das armadilhas utilizadas (Ilustração original).

2.1.2 Caracterização dos locais

O plano inicial consistia em manter as armadilhas instaladas por períodos semelhantes em dois locais. A primeira armadilha foi colocada dentro do perímetro do CERAS, variando a

sua localização dentro do Centro consoante a necessidade (por problemas técnicos ou por motivos de logística do Centro), e a segunda junto ao picadeiro da ESA-IPCB. As armadilhas estavam localizadas, aproximadamente, a uma distância de 200m entre si.

A primeira armadilha foi colocada no local 1 (no CERAS) no dia 6 de outubro de 2021 e a segunda armadilha foi instalada no local 2 (no picadeiro da ESA) no dia 11 de outubro de 2021. O Anexo 4 expõe as datas das colheitas e os locais onde foram colocadas as respectivas armadilhas. Devido às condições meteorológicas verificadas junto ao picadeiro da ESA (excesso de vento) decidiu-se que, a partir do dia 2 de dezembro de 2021, a segunda armadilha seria retirada desse local e colocada também dentro do perímetro do CERAS. Deste modo, entre 2 de dezembro de 2021 e 27 de fevereiro de 2022, as duas armadilhas permaneceram instaladas dentro do Centro. Sendo que a distância entre ambas é inferior a 70m não foi possível definir a independência espacial das capturas de cada armadilha (ECDC 2014), sendo assim ambas consideradas conjuntamente na análise dos resultados.

As armadilhas foram instaladas em sete locais ao longo do estudo, como referenciado na figura 10. Os locais 1, 3, 4, 5, 6 e 7 encontram-se inseridos dentro do perímetro do CERAS e foram contabilizados como tendo a mesma localização, no capítulo dos resultados. Na figura 11 está representada a planta do CERAS, exemplificando os locais de instalação das armadilhas colocadas no Centro. O local 2 situa-se junto ao picadeiro da ESA-IPCB.



Figura 10 - Localização das armadilhas de mosquitos (Imagem adaptada do Google Maps).

Legenda: Todos os locais, onde foram colocadas as armadilhas, estão inseridos dentro do perímetro do CERAS, à exceção do local 2, que se encontra junto ao picadeiro da ESA-IPCB. Coordenadas geográficas: Local 1 (39.824091, -7.454349); Local 2 (39.825425, -7.452705); Local 3 (39.824176, -7.454525); Local 4 (39.824249, -7.454394); Local 5 (39.824279, -7.454625); Local 6 (39.824197, -7.454381); Local 7 (39.823634, -7.454108).

Os locais de instalação das armadilhas no CERAS foram escolhidos, junto a instalações exteriores de animais em recuperação, sem iluminação artificial noturna, com o intuito de potenciar a captura dos insetos, fornecendo, adicionalmente, uma boa visibilidade da armadilha de forma a poder ser observada à distância, bem como garantir alguma proteção das intempéries.

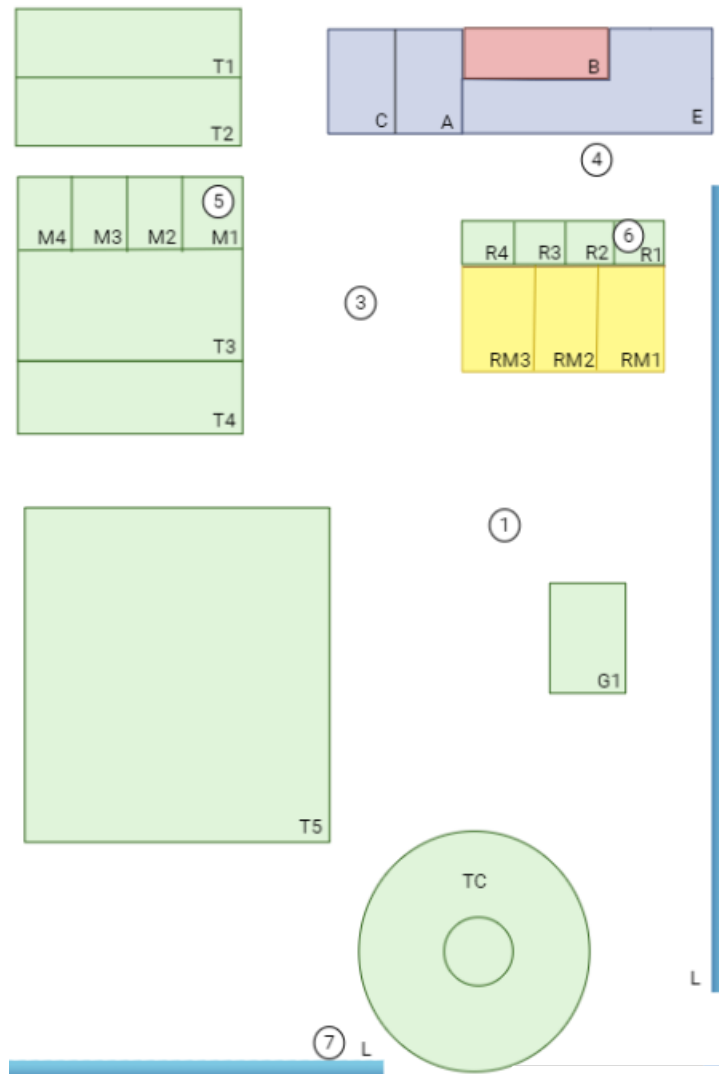


Figura 11 - Esquema ilustrativo da planta do CERAS, assinalando os locais onde foram colocadas as armadilhas no Centro (Ilustração original criada a partir de BioRender®).

Legenda: Os círculos numerados indicam os locais onde foram colocadas as armadilhas no Centro. A cor verde é representativa de instalações utilizadas maioritariamente por aves. A cor amarela é representativa de instalações utilizadas maioritariamente por mamíferos. A cor azul-escuro é representativa dos espaços ocupados maioritariamente pelos trabalhadores do Centro. A – Armazém. B – Biotério de roedores e insetos. C – Cozinha para preparação das alimentações dos animais em recuperação. E – Enfermaria, escritório, internamentos e sala de necrópsias. G1 – Gaiola, albergando maioritariamente passeriformes e aves de menor dimensão. R1, R2, R3 e R4 – Câmaras de Recuperação (“REC”) para aves, albergando todo o tipo de aves. RM1, RM2 e RM3 – Câmaras de Recuperação (“REC”) para mamíferos de pequeno e grande porte. M1, M2, M3 e M4 – Câmaras de muda, albergando maioritariamente aves de rapina. T1 e T2 – Túneis de voo, albergando maioritariamente aves de rapina. T3 – Túnel de voo, albergando maioritariamente cegonhas e garças. T4 e T5 – Túneis de voo, albergando maioritariamente abutres. TC – Túnel de voo circular, albergando maioritariamente aves de rapina. L – Linhas de água.

Como demonstrado na figura 10 as armadilhas foram colocadas em sete locais, podendo ser observado na figura 11 as características envolventes das armadilhas instaladas no CERAS.

O Local 1 situa-se junto a instalações exteriores de animais em recuperação, maioritariamente de aves, nomeadamente a instalação dos abutres e a instalação de aves de menor dimensão (por exemplo mochos-galegos e melros), mas também próximo das instalações dos mamíferos (por exemplo corços, raposas, fuinhas e texugos).

O Local 2 situa-se fora do perímetro do CERAS, junto ao picadeiro da ESA-IPCB e a um poço de água. Este local encontra-se próximo à zona de passagem dos cavalos, aquando da saída das instalações interiores para o exterior.

O Local 3 situa-se junto a instalações exteriores de animais em recuperação, maioritariamente de aves, de dimensões médias (câmaras de muda) e grandes (túneis de voo), mas também próximo das instalações dos mamíferos (por exemplo raposas e texugos), com características semelhantes ao Local 1. Encontra-se numa posição central no CERAS, com proximidade às instalações dos abutres, à instalação das cegonhas e à instalação dos mamíferos.

O Local 4, observado na figura 12, situa-se entre instalações exteriores de animais em recuperação e o local de trabalho da equipa do CERAS, apresentando elevada visibilidade para toda a área do Centro. As instalações circundantes desta zona são algumas fechadas e outras abertas, podendo acolher uma grande diversidade de espécies (aves de pequeno e grande porte, como por exemplo mochos-galegos e abutres, e mamíferos de pequeno e de grande porte, como por exemplo fuinhas e corços).



Figura 12 - Armadilha de mosquitos instalada no Local 4, no CERAS (Fotografia original).

O local 5 situa-se dentro de uma instalação de animais aberta para o exterior, sendo a armadilha apenas colocada enquanto a instalação não estava a ser utilizada. Esta instalação

encontra-se articulada com outras instalações que possuíam aves em recuperação, nomeadamente cegonhas e variadas aves de rapina.

O Local 6 situa-se dentro de uma instalação de aves fechada, sendo a armadilha apenas colocada enquanto a instalação não estava a ser utilizada. Esta instalação permite a entrada de insetos (porta aberta), mas não permite a visualização da armadilha a partir do exterior.

O Local 7 situa-se entre uma instalação de animais aberta para o exterior, que normalmente alberga aves de rapina, e uma linha de água estagnada.

2.2. Captura de mosquitos com aspirador

Para a captura de mosquitos em repouso foi adquirido um aspirador de insetos portátil (@Vertbaudet), com as características do ilustrado na figura 13. Este aspirador foi utilizado em instalações de animais selvagens e em contacto direto com o corpo de aves.

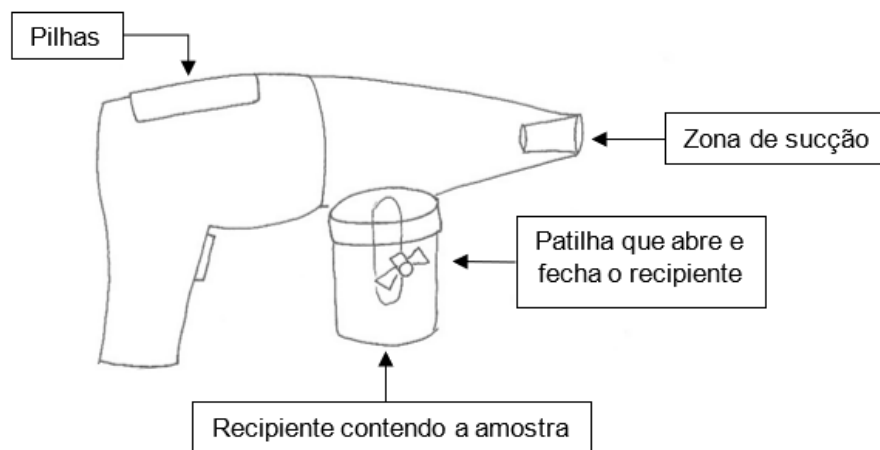


Figura 13 – Ilustração esquemática do aspirador de insetos portátil (Ilustração original).

Legenda: A zona de sucção aspira a amostra, sendo a mesma direcionada, diretamente, para o recipiente.

Este aspirador foi utilizado em sete instalações, quando não ocupadas por animais, entre 12 e 24 horas após a sua saída, aplicando o aspirador em contacto direto com os materiais e vegetação que compõem as instalações. Das sete instalações aspiradas, três são abertas ao exterior e quatro são fechadas.

O aspirador foi ainda utilizado em onze animais, aplicando o mesmo em contacto direto com o corpo dos animais, sendo necessário capturar e conter os animais nas instalações exteriores. A amostra de aves utilizada neste estudo inclui uma águia-calçada (*Aquila pennata*), uma águia-d'asa-redonda (*Buteo buteo*), três cegonhas-brancas (*Ciconia ciconia*), um milhafre-real (*Milvus milvus*), um tordo-comum (*Turdus philomelos*), um melro-preto (*Turdus merula*) e três corujas-do-mato (*Strix aluco*). Para a seleção das aves foi considerada a tolerância da espécie/individuo ao stress e, em todo o procedimento, foi salvaguardado o bem-estar do animal.

2.3. Conservação e identificação dos mosquitos

Os insetos capturados foram armazenados a uma temperatura de -20°C no CERAS.

No fim do período de estágio, as amostras, acondicionadas em caixas refrigeradas, foram transportadas para a Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade de Lisboa. No laboratório de Parasitologia, com auxílio e sob supervisão da Dra. Sara Madeira, através da utilização de uma lupa binocular, procedeu-se à observação e separação dos mosquitos dos restantes insetos e foi identificado o género de cada um destes mosquitos e, quando possível, a espécie. Para tal foram utilizadas as chaves de identificação de Ribeiro e Ramos (1999) e Schaffner et al. (2001), baseando-se em características morfológicas tais como a caracterização sexual, engorgitamento das fêmeas com sangue, a presença de sedas pré e pós-espiraculares, coloração e localização de bandas dos segmentos abdominais, coloração e tamanho relativo das patas, etc. Posteriormente foram guardados em tubos de Eppendorf e novamente congelados a -20°C. Os restantes insetos foram descartados por não se enquadrarem no âmbito deste estudo.

2.4. Recolha de dados da estação meteorológica de Castelo Branco

No âmbito da presente dissertação foram requisitados dados recolhidos pela estação meteorológica de Castelo Branco (latitude 39.83944, longitude -7.47869; altitude 386 m), através do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), para posterior interpretação juntamente com os resultados obtidos. Foi obtida informação diária, de outubro de 2021 a fevereiro de 2022, acerca da temperatura do ar, humidade relativa e quantidade de precipitação. A estação meteorológica de Castelo Branco situa-se a aproximadamente 2,65km de distância do CERAS.

3. Resultados

3.1. Armadilhas de mosquitos

Como referido anteriormente, os resultados obtidos a partir das armadilhas colocadas no CERAS serão analisados, neste capítulo, como apenas um local. Deste modo, contabilizam-se dois locais de estudo: o CERAS e o picadeiro da ESA.

No presente estudo foram realizadas 66 colheitas, tendo sido capturados 70 mosquitos da família Culicidae. A tabela 2 apresenta a quantidade de mosquitos capturados de cada espécie ou género, com distinção do sexo.

Tabela 2 - Resultados obtidos nas colheitas efetuadas durante os meses de outubro de 2021 a fevereiro de 2022, inclusive, especificando a quantidade de mosquitos capturados de cada espécie ou gênero, com distinção do sexo.

Espécies de mosquitos capturadas	Quantidade de machos	Quantidade de fêmeas	Total
<i>Aedes</i> spp.	2	0	2
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	0	1	1
<i>Anopheles</i> spp.	2	0	2
<i>Culex pipiens</i>	26	23	49
<i>Culex theileri</i>	0	1	1
<i>Culiseta annulata</i>	0	2	2
<i>Culiseta longiareolata</i>	7	6	13
Total	37	33	70

Na totalidade da amostra capturou-se em maior quantidade a espécie *Culex pipiens*, representando cerca de 70% (49/70) dos mosquitos, seguindo-se *Culiseta longiareolata* representando apenas cerca de 19% (13/70) dos espécimes. Em relação ao sexo dos vetores, observaram-se 53% (37/70) de machos e 47% (33/70) de fêmeas.

O Anexo 4 expõe em maior detalhe os resultados obtidos em cada uma das colheitas, especificando a espécie de mosquito capturada, o respetivo sexo e a presença/ausência de refeição sanguínea.

Das trinta e três fêmeas presentes na amostra, três (9%) apresentavam o abdómen engorgitado, nomeadamente duas fêmeas *Culex pipiens*, na colheita 6.2 (19 e 20 de outubro de 2021) e na colheita 13.2 (17 e 18 de novembro de 2021), e uma fêmea *Culiseta annulata* na colheita 27 (26 e 27 de janeiro de 2022). As três fêmeas com abdómen engorgitado foram capturadas nas armadilhas do CERAS. A tabela 3 indica o local de captura das espécies obtidas neste estudo.

Tabela 3 - Local de captura de cada espécie.

Espécies de mosquitos capturadas	Local de captura	
	CERAS	Picadeiro
<i>Aedes</i> spp.	X	
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.		X
<i>Anopheles</i> spp.	X	
<i>Culex pipiens</i>	X	X
<i>Culex theileri</i>		X
<i>Culiseta annulata</i>	X	
<i>Culiseta longiareolata</i>	X	X

Legenda: o "X" assinala o local onde estava instalada a armadilha que capturou cada espécie.

As figuras 14 a 20 apresentam sete mosquitos das diferentes espécies que foram capturados no presente estudo.



Figura 14 - Macho de *Aedes* spp. (Fotografia original).



Figura 15 - Fêmea de *Anopheles maculipennis* s.l. (Fotografia original).



Figura 16 - Macho de *Anopheles* spp. (Fotografia original).



Figura 17 - Fêmea de *Culex pipiens* (Fotografia original).



Figura 18 - Fêmea de *Culex theileri* (Fotografia original).



Figura 19 - Fêmea de *Culiseta annulata* com abdômen engorgitado (Fotografia original).



Figura 20 - Macho de *Culiseta longiareolata* (Fotografia original).

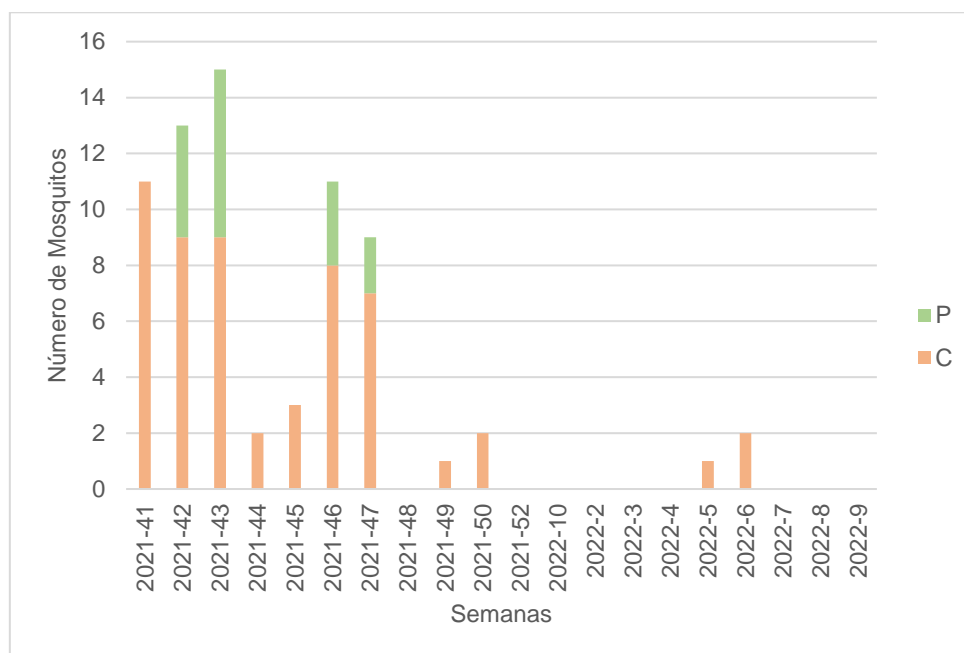
Verificou-se uma taxa de captura de mosquitos superior na armadilha colocada no CERAS (1,61 mosquitos/dia) em relação à armadilha colocada no picadeiro da ESA (0,71 mosquitos/dia), como apresentado na tabela 4. Para comparar a captura efetuada nos dois locais, foi necessário separar as colheitas obtidas no CERAS na mesma época do ano em que a armadilha esteve colocada no picadeiro da ESA.

Tabela 4 - Quantidade de mosquitos obtidos em cada um dos locais onde foi colocada a armadilha, consoante a quantidade de dias em que a armadilha foi instalada nesse local no período de outubro a dezembro.

Local da armadilha	Datas	Quantidade de dias	Quantidade de mosquitos capturados	Média (mosquitos/dia)
CERAS	6 de outubro de 2021 a 1 de dezembro de 2021	31	50	1,61
Picadeiro	11 de outubro de 2021 a 1 de dezembro de 2021	21	15	0,71

No gráfico 2 observa-se a quantidade de mosquitos capturados, por semana, no CERAS e no picadeiro.

Gráfico 2 - Quantidade de mosquitos capturados, por semana, no CERAS e no Picadeiro.



Legenda: C – CERAS; P – Picadeiro da ESA.

Cerca de 93% (65/70) da amostra total foi recolhida até ao fim do mês de novembro, como se verifica na tabela 5, sendo outubro o mês de maior captura. Por outro lado, janeiro foi o mês de menor captura. Verificou-se que a abundância de mosquitos diminuiu drasticamente a partir da colheita 14 (22 e 23 de novembro de 2021, semana 48 de 2021). Os restantes 7% (5/70), incluem um macho e uma fêmea da espécie *Culiseta longiareolata* (capturados em dezembro, semana 50 de 2021), uma fêmea da espécie *Culiseta annulata* (capturada em janeiro, semana 5 de 2022) e duas fêmeas da espécie *Culex pipiens* (capturadas em fevereiro, semana 6 de 2022).

Tabela 5 - Quantidade de mosquitos capturados por mês.

Meses do estudo	Quantidade de mosquitos capturados	Frequência relativa
Outubro	41	59%
Novembro	24	34%
Dezembro	2	3%
Janeiro	1	1%
Fevereiro	2	3%

Adicionalmente, na tabela 6, verifica-se que a captura de mosquitos mais elevada ocorreu no mês de outubro no CERAS.

Tabela 6 - Quantidade de mosquitos capturados por mês, consoante o local onde estava instalada a armadilha.

Meses do Estudo	Local da armadilha	Quantidade de dias	Quantidade de mosquitos capturados	Frequência relativa
Outubro	CERAS	12	31	44,3%
	Picadeiro	5	10	14,3%
Novembro	CERAS	18	19	27,1%
	Picadeiro	15	5	7,1%
Dezembro	CERAS	9	2	2,9%
	Picadeiro	1	0	0%
Janeiro	CERAS	21	1	1,4%
Fevereiro	CERAS	18	2	2,9%

3.2. Aspirador de mosquitos

Não foram aspirados mosquitos nem nas instalações nem em contacto direto com as aves incluídas no estudo. Capturaram-se outros insetos, que foram descartados por não se enquadrarem no âmbito deste estudo.

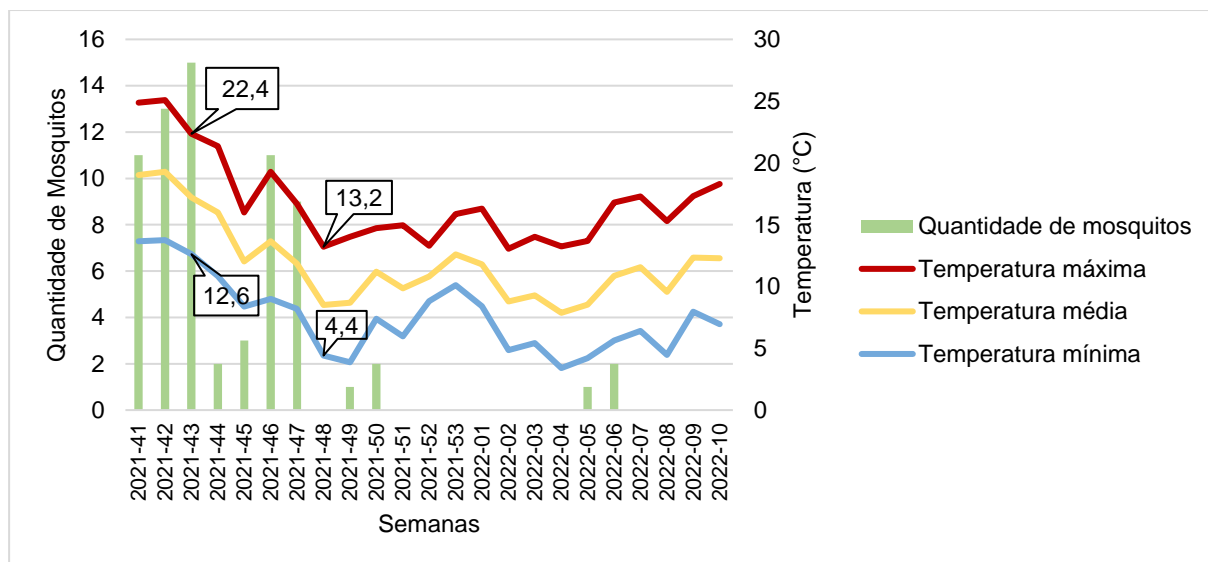
3.3. Análise da relação entre os dados meteorológicos e as capturas de mosquitos

No âmbito desta dissertação foram relacionados os dados meteorológicos, apresentados no anexo 5, recolhidos pela estação meteorológica de Castelo Branco, com a quantidade de mosquitos capturados. Foi feita a agregação dos dados semanalmente.

No gráfico 3 observa-se a relação entre a temperatura média do ar a 1,5m (°C) e a soma dos mosquitos capturados em cada semana. Apresenta-se a média semanal da temperatura máxima, da temperatura média e da temperatura mínima. Verifica-se, como seria de esperar, que quando as temperaturas decrescem, diminui a quantidade de mosquitos capturados, nomeadamente a partir da semana 48 de 2021, em que a temperatura média

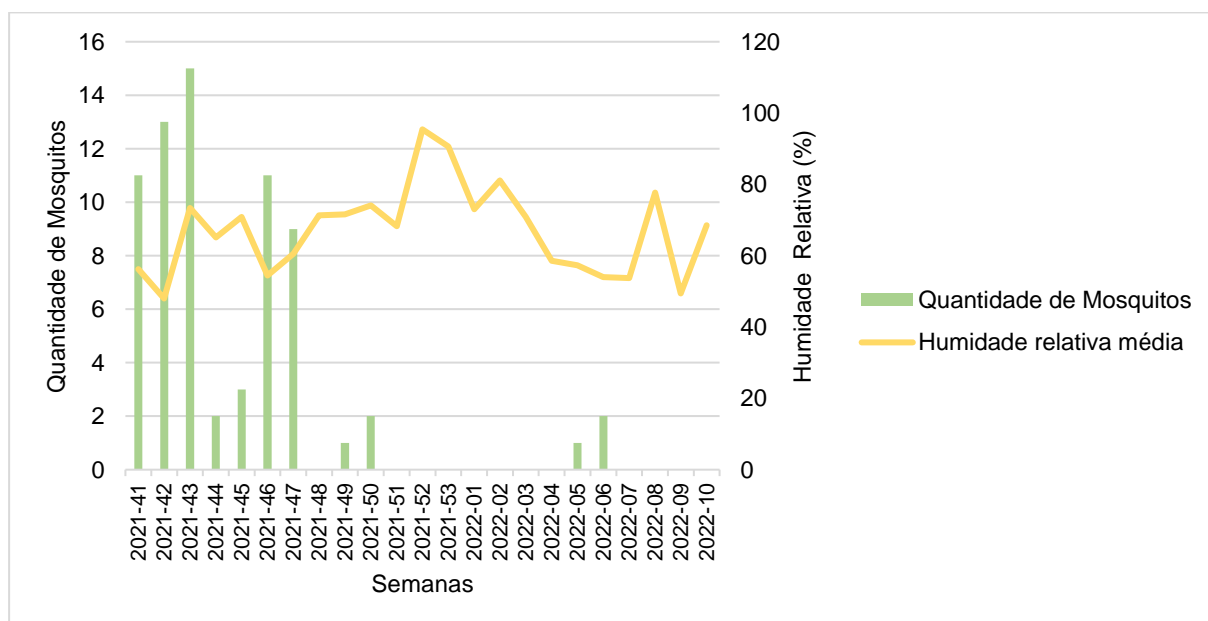
máxima foi de 13,2°C e a temperatura média mínima de 4,4°C. Na semana 43 de 2021 foi capturada a maior quantidade de mosquitos, em que a temperatura média máxima foi de 22,4°C e a temperatura média mínima de 12,6°C.

Gráfico 3 - Relação entre a quantidade de mosquitos capturados semanalmente e a temperatura do ar a 1,5m.



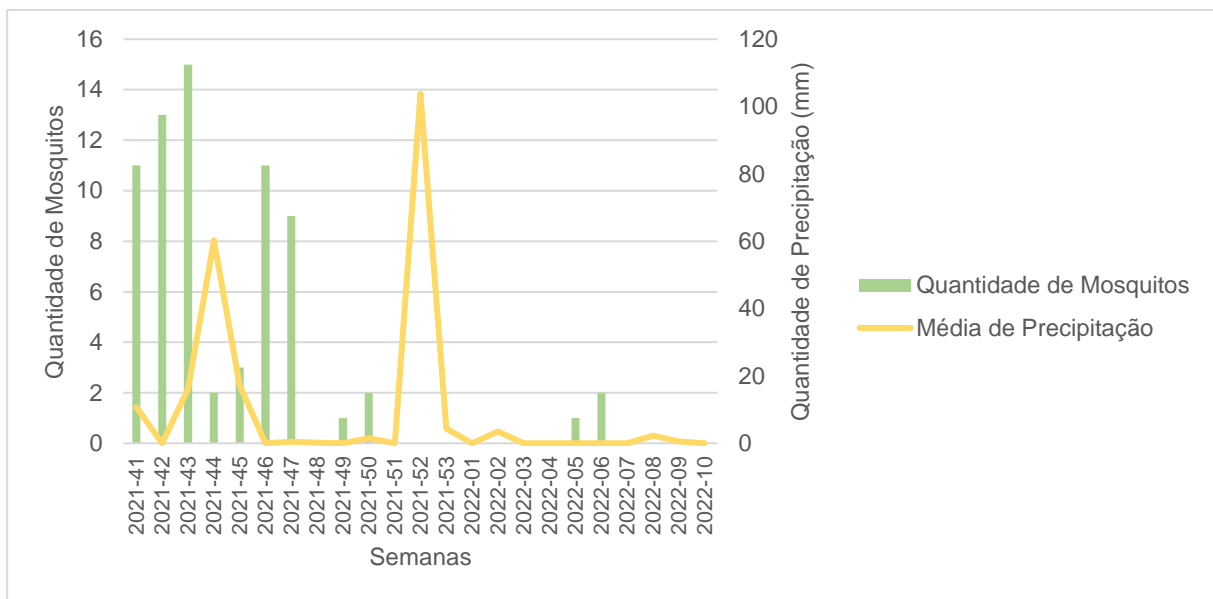
No gráfico 4 observa-se a relação entre a média da humidade relativa (%) semanal e a quantidade de mosquitos capturados neste estudo. Verifica-se que a humidade relativa elevada coincidiu com um decréscimo acentuado das capturas de mosquitos.

Gráfico 4 – Relação entre a quantidade de mosquitos capturados semanalmente e a humidade relativa (%).



No gráfico 5 observa-se a relação entre a média da quantidade de precipitação (mm) semanal e a quantidade de mosquitos capturados neste estudo. Nas semanas em que a quantidade de precipitação foi mais elevada, especificamente nas semanas 44 e 52 de 2021, verificou-se um menor número de mosquitos capturados. Relacionando os gráficos 4 e 5, o aumento da quantidade de precipitação coincide com o período em que a humidade relativa foi mais elevada.

Gráfico 5 - Relação entre a quantidade de mosquitos capturados semanalmente e a média da quantidade de precipitação (mm) semanal.



4. Discussão

A incidência e a disseminação geográfica de doenças transmitidas por mosquitos está a aumentar na Europa. A crescente globalização (movimento global de bens, animais e seres humanos) e as alterações climáticas e ambientais são fatores que contribuem para a emergência destas doenças (Deblauwe et al. 2014). Neste sentido e considerando as suspeitas de casos clínicos de FNO verificados em mochos-galegos no CERAS (no verão de 2020), um caso reportado num cavalo a aproximadamente 15,5km do Centro (julho de 2020) (Lourenço et al. 2021) e a deteção de resultados positivos (IgG), em ELISA, em soros de animais em recuperação no Centro (2020 e 2021), foi considerado epidemiologicamente relevante avaliar se estariam presentes, na área de atividade do CERAS, espécies de mosquitos com capacidade de transmitir o VNO. Visto a época de transmissão do vírus ocorrer entre os meses de março e novembro, alcançando o pico no verão, os valores mínimos de transmissão verificam-se durante o inverno (Lourenço et al. 2022). A altura do ano em que o estudo se realizou não foi a mais adequada para a captura de mosquitos, não se enquadrando inteiramente no período de captura abundante de mosquitos adultos, sendo aconselhado para esse efeito realizar capturas, com armadilhas, entre abril e novembro (ECDC 2014). Apesar destes fatores, a realização do estudo neste período permitiu englobar os meses de outubro e novembro, considerados como período de atividade de mosquitos, e os meses de dezembro, janeiro e fevereiro, permitindo realizar um estudo preliminar da atividade dos mosquitos fora da sua época preferencial, possibilitando um estudo preliminar dos seus hábitos de *overwintering*. Desta forma, foi possível relacionar a ocorrência de mosquitos com as condições meteorológicas e avaliar a existência de espécies que mantêm a sua atividade durante os meses de inverno em Castelo Branco, um dos distritos de Portugal que atinge temperaturas mais baixas.

A utilização do aspirador para a captura de mosquitos não foi bem-sucedida e tal pode ter ocorrido devido ao uso de um aspirador pequeno e mais económico em vez do recomendado pelo ECDC (aspiradores tipo mochila CDC) (ECDC 2014). No caso da aplicação do aspirador em contacto direto com o corpo das aves amostradas, pode ter sido prejudicada pela necessidade de capturar e conter os animais nas instalações exteriores para ser possível efetuar este método. Antes de ser efetuada a contenção as aves mudavam de posição ou voavam e dessa forma poderia libertar-se algum inseto que estivesse a repousar ou a realizar a refeição sanguínea nas aves. Apesar da amostra de aves não incluir corvídeos foram amostradas aves de rapina que, embora em menor grau que a família *Corvidae*, são também suscetíveis de desenvolver sinais clínicos (Scott 2021; DGAV [s.d.]). Este procedimento não foi efetuado em animais que manifestassem sinais de dor ou que estivessem no período inicial de recuperação, nem em espécies reconhecidas por atingirem um elevado nível de *stress*

com a manipulação. Relativamente à aspiração das instalações e vegetação não houve capturas, revelando-se um método nada eficiente, neste estudo, e que despendeu de muito tempo.

No presente estudo, apenas foi utilizado um tipo de armadilha (armadilha luminosa do tipo miniatura CDC com dióxido de carbono), o que pode ter influenciado a captura das espécies de mosquitos (Osório 2013), como por exemplo no caso das fêmeas da espécie *Aedes (Ochlerotatus) caspius* que são repelidas pelas luzes das armadilhas utilizadas (Becker et al. 2020). As lâmpadas de luz, para além de obterem uma grande captura acessória de outras espécies de insetos, podem ser apenas ligeiramente atrativas para os mosquitos ativos diurnamente (ECDC 2014). Algumas espécies que tendem a ser mais ativas durante o dia podem ter sido insuficientemente representadas neste trabalho (Osório 2013), como por exemplo, *Ae. aegypti* (Becker et al. 2020) e *Ae. albopictus* (ECDC 2022). Para contrariar esse efeito utiliza-se CO₂ a fim de atrair uma maior diversidade de espécies de mosquitos (ECDC 2014). Em substituição do gelo seco, como fonte de dióxido de carbono, foram utilizadas pastilhas de CO₂. Estas pastilhas podem ter influenciado a quantidade de mosquitos capturados, visto não ser o método mais frequentemente utilizado no tipo de armadilhas instaladas.

Relativamente à seleção dos locais de instalação das armadilhas foram escolhidos com o intuito de potenciar a captura dos insetos, fornecendo, adicionalmente, uma boa visibilidade da armadilha à distância, bem como garantir alguma proteção das intempéries. O plano inicial consistia em manter uma armadilha instalada dentro do perímetro do CERAS e a segunda junto ao picadeiro da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Os locais 1, 3, 4, 5, 6 e 7 (situados dentro do perímetro do CERAS) foram escolhidos por se situarem junto a instalações exteriores de animais em recuperação, sem iluminação artificial noturna que pudesse prejudicar a capacidade de atração da lâmpada da armadilha. Os locais 1 e 3, localizados entre instalações de aves e mamíferos selvagens, foram selecionados por se situarem junto a instalações muito diferentes, podendo potencialmente ter uma maior diversidade de vetores. O local 4, situado entre instalações exteriores de aves e mamíferos selvagens em recuperação e o local de trabalho da equipa do CERAS, foi selecionado com o intuito de, para além de se situar próximo de animais em recuperação, ainda se encontrar junto das áreas mais frequentadas pelos trabalhadores (enfermaria, internamentos, área de lavagens, escritório e zona de lazer). O local 5, situado dentro da instalação M1, foi selecionado por se encontrar em elevada proximidade das aves presentes nas instalações vizinhas, sem causar desconforto às mesmas. O local 6, situado dentro da instalação REC1, foi selecionado com o objetivo de capturar mosquitos que pudessem ter preferência por realizar as suas refeições sanguíneas em locais fechados. O local 7, situado entre uma linha de água estagnada e uma instalação de aves, foi selecionado pela

proximidade das aves e pela possibilidade de capturar mosquitos que pudessem utilizar a água disponível no local para oviposição. A alteração destes locais deveu-se a falhas técnicas, como a impossibilidade de acionar a ventoinha ou a lâmpada UV aquando do momento da ligação da armadilha à bateria, no caso dos locais 1 e 3; observação da ventoinha parada no dia seguinte, no caso do local 6; e procura de uma maior diversidade e abundância de insetos, no caso dos locais 4, 5 e 7.

O local 2, situado junto ao picadeiro da ESA, a cerca de 200m do CERAS, foi selecionado por estar próximo de um local de água estagnada e de cavalos, visto que os equídeos são hospedeiros fundo-de-saco do vírus do Nilo Ocidental. Como referido no capítulo dos materiais e métodos, dificuldades relacionadas com as condições meteorológicas, nomeadamente excesso de vento neste local, levaram a que se retirasse a armadilha desta zona numa fase intermédia do estudo.

Os dados meteorológicos foram obtidos a partir da estação meteorológica de Castelo Branco que se localiza a, aproximadamente, 2,65 km do CERAS. De forma a que as informações retratassem o melhor possível as condições ambientais verificadas em cada local de captura, poderia ter sido utilizado um termómetro para a medição da temperatura e um higrómetro para a medição da humidade junto a cada armadilha (ARSalentejo 2012).

Neste estudo foram capturadas, pelo menos, cinco espécies diferentes de culicídeos incluindo *Anopheles maculipennis* s.l., *Culex pipiens*, *Culex theileri*, *Culiseta annulata* e *Culiseta longiareolata*, e quatro mosquitos em que apenas foi possível identificar o género, dois identificados como *Aedes* spp. e dois identificados como *Anopheles* spp.. A espécie *Culex pipiens* foi a espécie capturada em maior quantidade neste estudo, representando cerca de 70% da amostra (49/70), como seria espectável, visto esta espécie ser extremamente comum em Portugal e com presença generalizada por todo o país (Rocha et al. 2020; CEVDI 2022). Complementarmente, seria de esperar que fosse capturado um maior número de fêmeas comparativamente ao número de machos (ECDC 2014; Sriwichai et al. 2015), devido à utilização de CO₂ como atrativo nas armadilhas e da procura das fêmeas por um hospedeiro para realizar a refeição sanguínea, mas tal não se sucedeu, verificando-se uma maior captura de machos (37/70) do que de fêmeas (33/70).

No programa REVIVE de 2021, foram capturadas, no concelho de Castelo Branco, as espécies *Culex univittatus* e *Culiseta longiareolata*. Nos programas REVIVE de 2011 a 2020, foram capturadas, no mesmo concelho, as espécies *Culex pipiens*, *Culex theileri*, *Culex univittatus* e *Culiseta longiareolata*. Sendo que as espécies identificadas em menor expressão (inferiores a 1%) não são retratadas nos mapas do programa REVIVE, nomeadamente *Anopheles claviger*, *Culex hortensis*, *Culex laticinctus*, *Culex territans*, *Culiseta annulata* e *Aedes (Ochlerotatus) detritus* (CEVDI 2022), o autor deste estudo não obteve informação, por não constar nos relatórios, acerca de quais destas espécies foram capturas no concelho de

Castelo Branco. Comparando com as espécies capturadas no presente estudo, verifica-se que *Anopheles maculipennis* s.l. foi capturado no picadeiro da ESA, mas não foi identificado nos programas REVIVE, em Castelo Branco, e que a espécie *Culex univittatus*, apesar de já ter sido capturada, neste concelho, no programa REVIVE, não foi capturada no presente estudo. Por outro lado, é de referir que no programa REVIVE as capturas são efetuadas essencialmente em meios urbanos e que no presente estudo as capturas foram realizadas em meios rurais. Apesar de *Anopheles maculipennis* s.l. não ter sido capturado nos programas REVIVE em Castelo Branco, espécies deste complexo já foram capturadas anteriormente neste concelho (Almeida et al. 2008).

Da amostra obtida, *Culex pipiens* já foi demonstrado como vetor competente de VNO na Europa (Balenghien et al. 2008; Muñoz et al. 2012), e é considerado a espécie mais relevante para a transmissão do vírus em Portugal (Lourenço et al. 2021). Adicionalmente, *Culex pipiens* e *Anopheles maculipennis* s.l. são duas das três espécies em que o VNO já foi isolado em Portugal (Filipe and Pinto 1972; Esteves et al. 2005). Os mosquitos capturados no presente estudo podem futuramente ser testados para infeção por flavivírus.

As três fêmeas com abdómen engorgitado foram capturadas nas armadilhas do CERAS. Duas fêmeas de *Culex pipiens*, capturadas no local 4, entre 19 e 20 de outubro de 2021 e entre 17 e 18 de novembro de 2021, e uma fêmea de *Culiseta annulata*, capturada no local 5, no inverno, entre 26 e 27 de janeiro de 2022. Idealmente, poderia analisar-se a refeição sanguínea de cada um destes mosquitos para especificar o hospedeiro selecionado. Complementarmente, esta análise também seria interessante para perceber o papel que o hospedeiro selecionado poderia desempenhar no ciclo de transmissão do VNO, isto é, se o vertebrado selecionado pelo mosquito, para realizar a sua refeição sanguínea, poderia atuar como possível hospedeiro amplificador ou fundo de saco.

Anopheles maculipennis s.l., capturado apenas no picadeiro, alimenta-se tanto em mamíferos, por exemplo a vaca (*Bos taurus*) e o Homem, como em aves, por exemplo o ganso-africano (*Anser cygnoides*) e o galo-vermelho (*Gallus gallus*), podendo atuar como vetor ponte. A espécie *Culiseta annulata*, capturada apenas no CERAS, é maioritariamente mamofílica, alimentando-se por exemplo na vaca (*Bos taurus*) e no Homem. A espécie *Culiseta longiareolata*, capturada no picadeiro e no CERAS, tem preferência pelo Homem como hospedeiro. A espécie *Culex pipiens*, capturada no picadeiro e no CERAS, apesar de maioritariamente ornitofílica, alimentando-se por exemplo na andorinha-dos-beirais (*Delichon urbica*) e no peneireiro-vulgar (*Falco tinnunculus*), espécies comuns no Centro, também se pode alimentar em mamíferos, como a ovelha (*Ovis aries*) e o Homem, podendo atuar como vetor ponte. A espécie *Culex theileri*, apenas capturada no picadeiro, alimenta-se maioritariamente em mamíferos, como o cão (*Canis lupus familiaris*) e o Homem (Osório et al. 2012).

Como mencionado no capítulo da revisão bibliográfica, apesar da cronicidade do VNO nos vertebrados não permitir a transmissão através da alimentação do artrópode (Nemeth et al. 2009), o vírus pode permanecer em alguns tecidos até 43 dias, contribuindo para a transmissão durante o inverno, através do mecanismo de predação (Nemeth et al. 2009; Byas and Ebel 2020). A cronicidade é muito pertinente em contexto de centro de recuperação de animais selvagens, relativamente à eventualidade de libertação de animais que recuperem da infeção ou ao momento da possível libertação dos mesmos. As doenças infecciosas podem afetar vários aspetos da conservação, tais como a determinação das ameaças às espécies, a estimativa da viabilidade das populações, a planificação de reservas, reprodução em cativeiro e programas de recuperação. As doenças infecciosas que causam um maior impacto na conservação das espécies são aquelas com uma vasta gama de hospedeiros ou para as quais as espécies mais ameaçadas são um hospedeiro acidental (Lafferty and Gerber 2002). Em saúde pública, o conceito de “Uma Só Saúde” é extremamente importante, visto a existência de um maior contacto entre a fauna selvagem, animais de produção, animais de companhia e seres humanos representar um risco acrescido na propagação de doenças nas várias direções (Lanfranchi 2003).

Apesar da longevidade dos mosquitos ser inferior à duração do inverno, a persistência a longo prazo do VNO em fêmeas infetadas, seguida da transmissão vertical do vírus, e a possibilidade da existência de micro-habitats favoráveis à manutenção da sua atividade nos meses mais frios, realizando o mecanismo de *overwintering*, sugerem que os mosquitos podem atuar como reservatório do VNO durante o inverno e iniciar o ciclo de transmissão na primavera seguinte (Rudolf et al. 2017; Sauer et al. 2022). Este aspeto destaca a importância de compreender a ecologia das espécies de mosquito (Sauer et al. 2022).

As espécies *Culiseta longiareolata*, *Culiseta annulata* e *Culex pipiens* foram capturadas também no inverno, em dezembro, janeiro e fevereiro, respetivamente, todas no local 5 no CERAS. Os adultos de *Culiseta longiareolata* estão presentes durante todo o ano, apesar da maior densidade destes vetores se verificar na primavera e no verão, sendo que nas regiões temperadas esta espécie realiza diapausa invernal na fase larval enquanto nas regiões mais frias realiza diapausa invernal na fase adulta (CEVDI 2022). A espécie *Culiseta annulata*, geralmente, hiberna na fase adulta, no interior de residências e estábulos, podendo tornar-se extremamente incomodativa, quando a hibernação é interrompida pelo aumento da temperatura ou humidade (Becker et al. 2020; ECDC 2022). Apesar dos adultos desta espécie geralmente hibernarem no inverno, foi capturada uma fêmea com abdómen engorgitado em janeiro, sem ocorrer um aumento da temperatura média do ar nem da humidade relativa como se verifica nos gráficos 2 e 3 (semana 5). As fêmeas de *Culex pipiens* realizam diapausa invernal em abrigos sem gelo, como caves, cavernas, ou tocas, regressando à atividade na primavera, quando aumenta a temperatura e exposição à luz (ECDC 2022), não devendo

teoricamente estar ativas na altura em que foram capturadas. As alterações climáticas influenciam os mosquitos, tendo em conta que estes insetos são poiquilotérmicos. O microclima nos locais de diapausa pode afetar a sobrevivência de *Culex pipiens* (Sauer et al. 2022). Rozsypal et al. (2021) identificaram as temperaturas entre 2 e 6°C como temperaturas ótimas para realização de diapausa invernal por parte dos mosquitos adultos (Rozsypal et al. 2021). Temperaturas inferiores a 0°C levam à morte e temperaturas mais elevadas aumentam as taxas metabólicas, esgotando as reservas lipídicas das fêmeas de *Culex pipiens*. Em condições desfavoráveis, por exemplo, com temperaturas demasiado altas, os mosquitos podem necessitar de energia adicional para sobreviver, encurtando, ocasionalmente, o período de diapausa, para procurar fontes de energia (Sauer et al. 2022). Na semana de captura dos dois mosquitos identificados como *Culex pipiens*, verificou-se que a temperatura média máxima foi de 16,8°C e a temperatura média mínima foi de 5,65°C, podendo ter provocado o encurtamento da diapausa destes mosquitos. Por outro lado, os dados apresentados de humidade relativa e temperatura média do ar não revelam as condições meteorológicas exatas dos locais de diapausa invernal (que não conseguimos localizar) das espécies de *Culiseta annulata* e *Culex pipiens* capturadas. Será importante a realização de estudos complementares para avaliar as condições meteorológicas preferidas ou para a atualização, devido às alterações climáticas, dos hábitos de *overwintering* de cada espécie de mosquito em Portugal.

Os parâmetros meteorológicos influenciam a abundância e distribuição dos mosquitos, porém o seu impacto é complexo e a maioria destas variáveis são diferentes para cada espécie. Os principais fatores meteorológicos são a temperatura, a humidade relativa e a precipitação (Asgarian et al. 2021).

Na análise da relação entre a temperatura média do ar e a quantidade de mosquitos capturados em cada semana, verificou-se como seria de esperar, que quando as temperaturas decresceram, nomeadamente quando se aproxima a época de hibernação, diminui a quantidade de mosquitos capturados. Um estudo realizado em 2020 referiu que a abundância total da população de mosquitos foi superior no intervalo de temperaturas entre 21,7°C e 23,8°C, atingindo um pico a 22,7°C, mas concluiu que o intervalo ideal de temperatura varia com a espécie (Hwang et al. 2020). No presente estudo, na semana em que se obteve uma maior abundância de mosquitos, verificou-se que a temperatura média máxima foi de 22,4°C e a temperatura média mínima foi de 12,6°C, apesar desta não ter sido a semana com as temperaturas mais elevadas.

A humidade influencia a longevidade dos mosquitos, o seu comportamento aquando da realização da refeição sanguínea, o acasalamento, a dispersão e a oviposição (Asgarian et al. 2021). No presente estudo verificou-se que a humidade relativa elevada coincidiu com um decréscimo acentuado das capturas de mosquitos.

A qualidade e quantidade dos locais de reprodução de mosquitos são afetadas pela precipitação. Por outro lado, a precipitação elevada pode diminuir as populações de mosquitos (Asgarian et al. 2021). No presente estudo, nas semanas em que a quantidade de precipitação foi mais elevada, verificou-se um menor número de mosquitos capturados, este intervalo coincidiu com o período em que a humidade relativa foi mais elevada.

Assim, os parâmetros meteorológicos têm sido identificados como um fator importante na transmissão de agentes de doenças transmitidos por vetores. A relação entre os parâmetros meteorológicos e a atividade dos mosquitos é útil para os programas de vigilância e gestão de controlo dos mosquitos (Asgarian et al. 2021), podendo ser elaborados modelos preditivos da ocorrência de mosquitos e avaliação do risco de agentes de doenças transmitidos por vetores.

5. Conclusão

O presente estudo, realizado no período de outubro de 2021 a fevereiro de 2022, focou-se na análise da fauna de mosquitos vetores presentes na área de atividade do Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens de Castelo Branco (CERAS), tendo-se verificado a presença de quatro das espécies de mosquitos mais comumente identificadas em Portugal incluindo *Anopheles maculipennis* s.l., *Culex pipiens*, *Culex theileri*, e *Culiseta longiareolata*.

O estudo da ecologia das diferentes espécies de mosquitos, e da relação entre os fatores ambientais e a abundância de mosquitos são fundamentais para o controlo e gestão de programas de vigilância entomológica. A avaliação dos parâmetros meteorológicos é complexa e necessita de uma abordagem isolada para cada espécie, de forma a poderem ser retiradas conclusões mais significativas do efeito destes fatores. No presente estudo, *Culex pipiens* foi a espécie capturada em maior quantidade como seria espetável, visto ser considerada uma das espécies mais abundantes em Portugal, tendo sido capturada uma fêmea engorgitada desta espécie. Noutros estudos, esta espécie já foi demonstrada como vetor competente de VNO na Europa e é considerado o principal vetor de transmissão do vírus em Portugal.

A medicina da conservação possui um papel importante na investigação e no diagnóstico precoce de doenças virais existentes e emergentes, podendo utilizar a fauna selvagem como animais sentinela, nomeadamente as aves como hospedeiro reservatório e amplificador do VNO. O contributo para a compreensão da epidemiologia de doenças infecciosas é também relevante para a valorização do impacto que estas possam ter nas espécies autóctones.

Para uma melhor gestão do risco de doenças zoonóticas transmitidas por mosquitos e uma atuação mais rápida e eficaz, para além da vigilância entomológica, é necessário aperfeiçoar as medidas de controlo e vigilância sanitária utilizando a abordagem de “Uma Só Saúde”. De modo a evitar a ocorrência de surtos, é fundamental agir de forma integrada, com maior de detalhe e prontidão, relacionando os ecossistemas com a saúde dos seres humanos e dos animais.

6. Limitações do estudo e sugestões futuras

Em estudos futuros sugere-se que seja realizada a identificação de todos os mosquitos até à espécie, através da dissecação e examinação da genitália (Arroussi et al. 2021).

Complementarmente, seria também importante testar os mosquitos capturados para infeção por vírus, nomeadamente os flavivírus, e analisar a refeição sanguínea das fêmeas de mosquitos com abdómen engorgitado para especificar o hospedeiro selecionado. Para

análise da refeição sanguínea é necessário isolar o DNA contido no abdómen, seguindo-se a amplificação através da realização do PCR e sequenciação do fragmento e, por fim, atribui-se a sequência a determinada espécie, por exemplo através da base de dados “*Barcode of Life Data System (BOLD)*” (Rizzoli et al. 2015). No presente estudo, os métodos anteriormente mencionados não foram realizados por falta de fundos, podendo esta limitação ser ultrapassada através da candidatura a bolsas de investigação.

De forma a que os dados meteorológicos retratem o melhor possível as condições ambientais verificadas em cada local de captura, pode utilizar-se um termómetro para a medição da temperatura e um higrómetro para a medição da humidade junto a cada armadilha. Assim, obtém-se dados mais exatos, podendo também comparar-se os dados meteorológicos em diferentes locais de captura. Por último, seria interessante realizar as capturas de mosquitos durante todo o ano, englobando o período mais adequado de transmissão do VNO e de abundância de mosquitos, bem como todo o inverno, podendo analisar-se com maior rigor a sazonalidade de cada espécie.

Finalmente, seguindo o 15º objetivo das Nações Unidas para o desenvolvimento sustentável, designadamente para proteger, restaurar e promover a utilização sustentável dos ecossistemas terrestres e deter a perda de biodiversidade (United Nations 2016), sugere-se a realização de mais estudos avaliando o impacto das doenças infecciosas na conservação das espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida APG. 2011. Os Mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal - Desafios para o Século XXI. www.actamedicaportuguesa.com.
- Almeida APG, Galão RP, Novo MT, Sousa CA, Parreira R, Rodrigues JC, Pinto J, Carvalho L. 2005. Update on the distribution of some mosquito (Diptera: Culicidae) species in Portugal. *J Eur Mosq Control Assoc.* 19:20–25.
- Almeida APG, Galão RP, Sousa CA, Novo MT, Parreira R, Pinto J, Piedade J, Esteves A. 2008. Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102(8):823–832. doi:10.1016/j.trstmh.2008.03.011.
- Alves MJ, Poças JMD, Luz DT, Amaro F, Zé-Zé L, Osório H. 2012. Infecção por vírus West Nile (Flavivírus) em Portugal. Considerações acerca de um caso clínico de síndrome febril com exantema
- Anderson JF, Main AJ. 2006. Importance of Vertical and Horizontal Transmission of West Nile Virus by *Culex pipiens* in the Northeastern United States. *The Journal of infectious diseases,* 194(11), 1577-1579.
- Arroussi DER, Bouaziz A, Boudjelida H. 2021. Mosquito survey reveals the first record of *Aedes* (Diptera: Culicidae) species in urban area, Annaba district, Northeastern Algeria. *Polish Journal of Entomology.* 90(1):14–26. doi:10.5604/01.3001.0014.8065.
- ARSalentejo. 2012. Programa Regional de Vigilância de Vetores 2011-2015.
- Asgarian TS, Moosa-Kazemi SH, Sedaghat MM. 2021. Impact of meteorological parameters on mosquito population abundance and distribution in a former malaria endemic area, central Iran. *Heliyon.* 7(12). doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08477.
- Bakonyi T, Ivanics É, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N. 2006. Lineage 1 and 2 Strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 12(4):618–623.
- Balenghien T, Vazeille M, Grandadam M, Schaffner F, Zeller H, Reiter P, Sabatier P, Fouque F, Bicout DJ. 2008. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 8(5):589–595. doi:10.1089/vbz.2007.0266.
- Barzon L. 2018. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *Journal of Clinical Virology.* 107:38–47. doi:10.1016/j.jcv.2018.08.007.
- Becker N, Hoffmann D. 2011. First record of *Culiseta longiareolata* (Macquart) for Germany. *European Mosquito Bulletin.* 29:143–150.
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon MB, Dahl C, Kaiser A. 2020. MOSQUITOES identification, ecology and control. Third. Springer Nature Switzerland AG.
- Birnberg L, Aranda C, Talavera S, Núñez AI, Escosa R, Busquets N. 2020. Laboratory colonization and maintenance of *Anopheles atroparvus* from the Ebro Delta, Spain. *Parasit Vectors.* 13(394):1–5. doi:10.1186/s13071-020-04268-y.
- Blagrove MSC, Sherlock K, Chapman GE, Impoinvil DE, McCall PJ, Medlock JM, Lycett G, Solomon T, Baylis M. 2016. Evaluation of the vector competence of a native UK mosquito

Ochlerotatus detritus (*Aedes detritus*) for dengue, chikungunya and West Nile viruses. *Parasit Vectors*. 9(1):1–6. doi:10.1186/s13071-016-1739-3.

Boukraa S, de La Grandiere MA, Bawin T, Raharimalala FN, Zimmer JY, Haubruge E, Thiry E, Francis F. 2016. Diversity and ecology survey of mosquitoes potential vectors in Belgian equestrian farms: A threat prevention of mosquito-borne equine arboviruses. *Prev Vet Med*. 124:58–68. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.12.013.

Bowman DD. 2014. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 10th ed. Saunders, editor. Elsevier.

Brugman VA, Hernández-Triana LM, England ME, Medlock JM, Mertens PPC, Logan JG, Wilson AJ, Fooks AR, Johnson N, Carpenter S. 2017. Blood-feeding patterns of native mosquitoes and insights into their potential role as pathogen vectors in the Thames estuary region of the United Kingdom. *Parasit Vectors*. 10:163. doi:10.1186/s13071-017-2098-4.

Brustolin M, Talavera S, Santamaría C, Rivas R, Pujol N, Aranda C, Marquès E, Valle M, Verdún M, Pagès N, et al. 2016. *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) populations as vectors for lineage 1 and 2 West Nile virus in Europe. *Med Vet Entomol*. 30(2):166–173. doi:10.1111/mve.12164.

Byas AD, Ebel GD. 2020. Comparative Pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals. *Pathogens*. 9(48):1–23. doi:10.3390/pathogens9010048.

Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. 2002. Review West Nile virus. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00368-7](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00368-7)

Cantile C, Piero F del, di Guardo G, Arispici M. 2001. Pathologic and Immunohistochemical Findings in Naturally Occurring West Nile Virus Infection in Horses. *Vet Pathol*. 38(4):414–421. doi:https://doi.org/10.1354%2Fvp.38-4-414.

Carson PJ, Konewko P, Wold KS, Mariani P, Goli S, Bergloff P, Crosby RD. 2006. Long-Term Clinical and Neuropsychological Outcomes of WNV Infection. *CID*. 43:723–730. <https://doi.org/10.1086/506939>

Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Candan M, Yanikoglu A, Sumbul H. 2012. Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae). *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. 26(4):350–355. doi:10.1080/14786411003774296.

CEVDI C de E de V e DIDFC. 2022. REVIVE 2021 - Culicídeos e Ixodídeos : Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa. www.insa.pt.

Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. 2015. The global ecology and epidemiology of west nile virus. *Biomed Res Int*. 2015. doi:10.1155/2015/376230.

Connell J, Mckeown P, Garvey P, Cotter S, Conway A, O'Flanagan D, O'Herlihy BP, Morgan D, Nicoll A, Loyd G. 2004. Two linked cases of West Nile virus (WNV) acquired by Irish tourists in the Algarve, Portugal. *Euro Surveil*. 8(32). doi:10.2807/esw.08.32.02517-en.

Costa A, Barros S, Duarte A. 2021. Serological surveillance of West Nile Virus and molecular diagnostic of West Nile Virus, Usutu Virus, Avian Influenza and Newcastle Disease Virus in wild birds of Portugal.

Cotar AI, Falcuta E, Prioteasa LF, Dinu S, Ceianu CS, Paz S. 2016. Transmission Dynamics of the West Nile Virus in Mosquito Vector Populations under the Influence of

Weather Factors in the Danube Delta, Romania. *Ecohealth*. 13:796–807. doi:10.1007/s10393-016-1176-y.

Danielová V. 1984. To the problem of the vector of lednice virus. *Folia Parasitol*. 31:379–382.

Deblauwe I, Sohier C, Schaffner F, Rakotoarivony LM, Coosemans M. 2014. Implementation of surveillance of invasive mosquitoes in Belgium according to the ECDC guidelines. *Parasit Vectors*. 7(1):1–11. doi:10.1186/1756-3305-7-201.

Demirci B, Durmaz E, Alten B. 2014. Influence of bloodmeal source on reproductive output of the potential West Nile Vector, *Culex theileri* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 51(6):1312–1316. doi:10.1603/ME13197.

DGAV. 2020. Manual de Procedimentos para a vacinação contra a Febre do Nilo Ocidental em zona de Risco.

DGAV. 2022a. Febre do Nilo Ocidental. [accessed 2022 Dec 25]. <https://www.dgav.pt/animais/conteudo/animais-de-producao/equideos/saude-animal/doencas-dos-equideos/febre-do-nilo-ocidental/>.

DGAV. 2022b. Febre do Nilo Ocidental. [accessed 2022 Jun 21]. <https://www.dgav.pt/animais/conteudo/animais-de-producao/equideos/saude->

DGAV. Plano de Vigilância da Febre do Nilo Ocidental. [accessed 2022 Jun 21]. <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/03/Plano-de-Vigilancia-Febre-Virus-Nilo-Ocidental.pdf>.

DGS. 2018. Informação: Infeção por Vírus do Nilo Ocidental. SNS. [accessed 2022 Jun 21]. www.dgs.pt.

ECDC. 2014. Guidelines for the surveillance of native mosquitoes in Europe. Estocolmo.

ECDC. 2020. *Culex pipiens* - Factsheet for experts. [accessed 2022 Aug 13]. <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/culex-pipiens-factsheet-experts>.

ECDC. 2022. “Reverse” identification key for mosquito species. [accessed 2022 Aug 13]. <https://www.medilabsecure.com/moskeytool.html>.

ECDC. 2022 Aug 17. West Nile virus in Europe in 2022 - human cases compared to previous seasons, updated 17 August 2022.

Engler O, Savini G, Papa A, Figuerola J, Groschup MH, Kampen H, Medlock J, Vaux A, Wilson AJ, Werner D, et al. 2013. European Surveillance for West Nile Virus in Mosquito Populations. *Int J Environ Res Public Health*. 10:4869–4895. doi:10.3390/ijerph10104869.

Esteves A, Paulo Almeida AG, Pedro Galão R, Parreira R, Piedade J, Rodrigues JC, Sousa CA, Teresa Novo M. 2005. West Nile Virus in Southern Portugal, 2004. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 5(4):410–413.

Failloux AB, Bouattour A, Faraj C, Gunay F, Haddad N, Harrat Z, Jancheska E, Kanani K, Kenawy MA, Kota M, et al. 2017. Surveillance of Arthropod-Borne Viruses and Their Vectors in the Mediterranean and Black Sea Regions Within the MediLabSecure Network. *Curr Trop Med Rep*. 4(1):27–39. doi:10.1007/s40475-017-0101-y.

Fall G, di Paola N, Faye M, Dia M, Freire CC de M, Loucoubar C, Zanotto PM de A, Faye O, Sall AA. 2017. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(11). doi:10.1371/journal.pntd.0006078.

Filipe A, Pinto M. 1972. Isolation in Portugal of West Nile virus from *Anopheles maculipennis* mosquitoes. *Acta Virol*. 16(4):361.

Firth AE, Atkins JF. 2009. A conserved predicted pseudoknot in the NS2A-encoding sequence of West Nile and Japanese encephalitis flaviviruses suggests NS1' may derive from ribosomal frameshifting. *Virology*. 6. doi:10.1186/1743-422X-6-14.

Formosinho P, Santos-Silva MM, Santos A, Melo P, Encarnação V, Santos N, Nunes T, Agrícola R, Portas M. 2006. O vírus West Nile em Portugal - estudos de vigilância epidemiológica. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*.:61–68.

Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. 2014. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*. 6(10):3991–4004. doi:10.3390/v6103991.

Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. 2015. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*. 7(7):3741–3767. doi:10.3390/v7072795.

Fritz ML, Walker ED, Miller JR, Severson DW, Dworkin I. 2015. Divergent host preferences of above- and below-ground *Culex pipiens* mosquitoes and their hybrid offspring. *Med Vet Entomol*. 29(2):115–123. doi:10.1111/mve.12096.

Fros JJ, Geertsema C, Vogels CB, Roosjen PP, Failloux AB, Vlak JM, Koenraadt CJ, Takken W, Pijlman GP. 2015. West Nile virus: High transmission rate in north-western European mosquitoes indicates its epidemic potential and warrants increased surveillance. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(7):1–12. doi:10.1371/journal.pntd.0003956.

Gamino V, Höfle U. 2013. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: A review. *Vet Res*. 44(39):1–15. doi:10.1186/1297-9716-44-39.

Girard YA, Klingler KA, Higgs S. 2004. West Nile Virus Dissemination and Tissue Tropisms in Orally Infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 4(2):109–122. doi:doi:10.1089/1530366041210729.

Gould LH, Fikrig E. 2004. West Nile virus: A growing concern? *Journal of Clinical Investigation*. 113(8):1101–1107. doi:10.1172/JCI21623.

Hamer GL, Chaves LF, Anderson TK, Kitron UD, Brawn JD, Ruiz MO, Loss SR, Walker ED, Goldberg TL. 2011. Fine-scale variation in vector host use and force of infection drive localized patterns of West Nile virus transmission. *PLoS One*. 6(8):1–15. doi:10.1371/journal.pone.0023767.

Hardy JL, Houk E 1, Kramer LD, Reeves WC. 1983. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. California. <http://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001305>

Hinckley AF, O'Leary DR, Hayes EB. 2007. Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics*. 119(3):666–671. doi:10.1542/peds.2006-2107.

Hubálek Z. 2000. European Experience with the West Nile Virus Ecology and Epidemiology: Could It Be Relevant for the New World?

Hubálek Z, Halouzka J. 1999. West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis.* 5. doi:10.3201/eid0505.990505.

Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. 2014. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. In: *Advances in Virus Research.* Vol. 89. Academic Press Inc. p. 201–275.

Hwang MJ, Kim HC, Klein TA, Chong ST, Sim K, Chung Y, Cheong HK. 2020. Comparison of climatic factors on mosquito abundance at US Army Garrison Humphreys, Republic of Korea. *PLoS One.* 15(10). doi:10.1371/journal.pone.0240363.

INIAV. Lista de Métodos Analíticos na Área de Saúde Animal - Aves. :1–4. [accessed 2022a Oct 5]. <https://iniav.pt/images/Servicos-Laboratoriais/saude-animal/aves.pdf>.

INIAV. Lista de Métodos Analíticos na Área de Saúde Animal - Equídeos. [accessed 2022b Oct 5]. <https://www.iniaiv.pt/images/Servicos-Laboratoriais/saude-animal/equideos.pdf>.

Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka J, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, Zaki S, Lanciotti RS, Lance-Parker SE, et al. 2003. Transmission of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 384(22):2196–2203.

Jansen S, Heitmann A, Lühken R, Leggewie M, Helms M, Badusche M, Rossini G, Schmidt-Chanasit J, Tannich E. 2019. *Culex torrentium*: A Potent Vector for the Transmission of West Nile Virus in Central Europe. *Viruses.* 11(6):1–11. doi:10.3390/v11060492.

Kenney JL, Brault AC. 2014. The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes. In: *Advances in Virus Research.* Vol. 89. Academic Press Inc. p. 39–83.

Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR, Alleyne EO, Dobson AP, Daszak P. 2005. West Nile Virus Risk Assessment and the Bridge Vector Paradigm. *Emerg Infect Dis.* 11(3):425–429. doi:10.3201/eid1103.040364.

Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. 2003. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis.* 9(3):311–323.

Lachmajer J. 1971. Biology of *Anopheles claviger* (Meigen, 1804) populations (Diptera, Culicinae) in the Gdansk environment. *Acta Parasitologica Polonica.* 19(14):163–184.

Lafferty KD, Gerber LR. 2002. Good Medicine for Conservation Biology: the Intersection of Epidemiology and Conservation Theory. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00446.x>.

Lane RP, Crosskey RWard. 1993. Medical insects and arachnids. Chapman & Hall.

Lanfranchi P. 2003. Wildlife Veterinarian, Conservation and Public Health. *Vet Res Commun* 27 (Suppl 1), 567-574. <http://doi.org/10.1023/B:VERC.0000014219.29166.37>

Lopes AF, Nascimento M. 2020. Vírus da Febre do Nilo Ocidental em Mocho Galego (*Athene noctua*) . VI Reunión Científica - Asociación Ibérica Veterinarios de Fauna Salvaje.

Lourenço J, Barros SC, Zé-Zé L, Damineli DS, Giovanetti M, Osório HC, Amaro F, Henriques AM, Ramos F, Luís T, et al. 2021 May 17. West Nile virus in Portugal. *medRxiv* .:1–26. doi:10.1101/2021.02.02.21251021. <https://doi.org/10.1101/2021.02.02.21251021>.

Lourenço J, Barros SC, Zé-Zé L, Damineli DSC, Giovanetti M, Osório HC, Amaro F, Henriques AM, Ramos F, Luís T, et al. 2022. West Nile virus transmission potential in Portugal. *Commun Biol.* 5(1). doi:10.1038/s42003-021-02969-3.

Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E. 2018. Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity. *Front Microbiol.* 9(2421):1–10. doi:10.3389/fmicb.2018.02421.

Mackenzie-Impoinvil L, Impoinvil DE, Galbraith SE, Dillon RJ, Ranson H, Johnson N, Fooks AR, SOLOMON T, Baylis M. 2015. Evaluation of a temperate climate mosquito, *Ochlerotatus detritus* (= *Aedes detritus*), as a potential vector of Japanese encephalitis virus. *Med Vet Entomol.* 29:1–9. doi:10.1111/mve.12083.

Medlock JM, Snow KR, Leach S. 2005. Potential transmission of West Nile virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors. *Med Vet Entomol.* 19:2–21. doi:https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2005.00547.x.

Melian EB, Hinzman E, Nagasaki T, Firth AE, Wills NM, Nouwens AS, Blitvich BJ, Leung J, Funk A, Atkins JF, et al. 2010. NS1' of Flaviviruses in the Japanese Encephalitis Virus Serogroup Is a Product of Ribosomal Frameshifting and Plays a Role in Viral Neuroinvasiveness. *J Virol.* 84(3):1641–1647. doi:10.1128/jvi.01979-09.

van der Meulen KM, Pensaert MB, Nauwynck HJ. 2005. West Nile virus in the vertebrate world. *Arch Virol.* 150(4):637–657. doi:10.1007/s00705-004-0463-z.

Milankov V, Petrić D, Vujić A, Vapa L. 2009. Taxonomy, Biology, Genetic Variability and Medical Importance of *Ochlerotatus caspius* (Pallas, 1771) and *O. dorsalis* (Meigen, 1830) (Diptera: Culicidae). *Acta entomologica serbica.* 14(2):195–207.

Mixão V, Bravo Barriga D, Parreira R, Novo MT, Sousa CA, Frontera E, Venter M, Braack L, Almeida APG. 2016. Comparative morphological and molecular analysis confirms the presence of the West Nile virus mosquito vector, *Culex univittatus*, in the Iberian Peninsula. *Parasit Vectors.* 9(1):1–13. doi:10.1186/s13071-016-1877-7.

Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Alcaide M, Viana DS, Roiz D, Vázquez A, Figuerola J. 2012. Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in South-West Spain. *PLoS One.* 7(6):1–9. doi:10.1371/journal.pone.0039549.

Murray K, Walker C, Herrington E, Lewis JA, McCormick J, Beasley DWC, Tesh RB, Fisher-Hoch S. 2010. Persistent infection with West Nile Virus Years after Initial Infection. *Journal of Infectious Diseases.* 201:2–4. doi:10.1086/648731.

Murray KO, Nolan MS, Ronca SE, Datta S, Govindarajan K, Narayana PA, Salazar L, Woods SP, Hasbun R. 2018. The neurocognitive and MRI outcomes of West Nile virus infection: Preliminary analysis using an external control group. *Front Neurol.* 9(111). doi:10.3389/fneur.2018.00111.

Nemeth N, Young G, Ndaluka C, Bielefeldt-Ohmann H, Komar N, Bowen R. 2009. Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Arch Virol.* 154:783–789. doi:10.1007/s00705-009-0369-x.

Osório HC. 2013. West Nile Virus in Portugal - Vector population, host interaction and detection of new flaviviruses. [Évora]: Universidade de Évora. Tese de doutoramento.

Osório HC, Zé-Zé L, Alves MJ. 2012. Host-feeding patterns of *Culex pipiens* and other potential mosquito vectors (Diptera: Culicidae) of West Nile Virus (Flaviviridae) collected in Portugal. *J Med Entomol.* 49(3):717–721. doi:10.1603/ME11184.

Osório HC, Zé-Zé L, Amaro F, Nunes A, Alves MJ. 2014. Sympatric occurrence of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) biotypes *pipiens*, *molestus* and their hybrids in Portugal, Western Europe: Feeding patterns and habitat determinants. *Med Vet Entomol.* 28(1):103–109. doi:10.1111/mve.12020.

Paré J, Moore A. 2018. West Nile virus in horses — What do you need to know to diagnose the disease? *Can Vet J.* 59(10):1119–1120.

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect.* 11(14–15):1177–1185. doi:10.1016/j.micinf.2009.05.005.

Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, Stobierski MG, Signs K, Newman B, Kapoor H, et al. 2003. Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med.* 349(13):1236–1245.

Peiris J, Amerasinghe F. 1994. Handbook of zoonoses. second. Beran GWSteele JH, editor. CRC Press.

Perrone JB, Spielman A. 1988. Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Tissue Res.* 252:473–478.

Quam M, Sessions O, Rocklov J, Liu-Helmerson J, Franco L, Khan K. 2014. The 2012 dengue outbreak in Madeira: exploring the origins. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.8.20718>

Radrova J, Seblova V, Votypka J. 2013. Feeding behavior and spatial distribution of culex mosquitoes (Diptera: Culicidae) in wetland areas of the Czech Republic. *J Med Entomol.* 50(5):1097–1104. doi:10.1603/ME13029.

Reisen WK, Fang Y, Martinez VM. 2006. Effects of Temperature on the Transmission of West Nile Virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). <https://doi.org/10.1093/jmedent/43.2.309>

Rico-Hesse R, Avsic-Zupanc T, Blitvich B, Bukh J, Cao-Lormeau V-M, Imrie A, Kapoor A, Kramer LD, Lindenbach BD, Simmonds P, et al. 2019. Virus Taxonomy The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature Flaviviridae Chapter.

Rizzoli A, Bolzoni L, Chadwick EA, Capelli G, Montarsi F, Grisenti M, de La Puente JM, Muñoz J, Figuerola J, Soriguer R, et al. 2015. Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasit Vectors.* 8(1):1–13. doi:10.1186/s13071-015-0831-4.

Rocha J, Almeida P, Santos M, Capinha C, Oliveira S. 2020. Modelação da Distribuição do Vetor da Febre do Nilo Ocidental (*Culex pipiens*) em Portugal Continental. In: XII Congresso Da Geografia Portuguesa: Geografias de Transição para a Sustentabilidade. Guimarães.

Romoser WS, Turell MJ, Lerdtusnee K, Neira M, Dohm D, Ludwig G, Wasieloski L. 2005. Pathogenesis of Rift Valley fever virus in mosquitoes - tracheal conduits & the basal lamina as an extra-cellular barrier. *Arch Virol.* 19:89–100. doi:10.1007/3-211-29981-5_8.

Root JJ. 2013. West Nile virus associations in wild mammals: A synthesis. *Arch Virol.* 158(4):735–752. doi:10.1007/s00705-012-1516-3.

Rozsypal J, Moos M, Rudolf I, Košťál V. 2021. Do energy reserves and cold hardiness limit winter survival of *Culex pipiens*? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 255. doi:10.1016/j.cbpa.2021.110912.

Rudolf I, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Straková P, Šebesta O, Mendel J, Bakonyi T, Schaffner F, Nowotny N, et al. 2017. West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasit Vectors*. 10(1). doi:10.1186/s13071-017-2399-7.

Rudolf I, Sikutová S, Oldřich šebesta, Mendel J, Malenovský I, Kampen H, Medlock J, Schaffner F. 2020. Overwintering of *Culex modestus* and other mosquito species in a reedbed ecosystem, including arbovirus findings. *J Am Mosq Control Assoc*. 36(4):257–260. doi:https://doi.org/10.2987/20-6949.1.

Ruiz-Arondo I, McMahon BJ, Hernández-Triana LM, Santibañez P, Portillo A, Oteo JA. 2019. Surveillance of mosquitoes (Diptera, Culicidae) in a northern central region of Spain: Implications for the medical community. *Front Vet Sci*. 6(MAR). doi:10.3389/fvets.2019.00086.

Santa-Ana M, Khadem M, Capela R. 2006. Natural Infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal. *Funchal*. https://doi.org/10.1093/jmedent/43.1.104

Sauer FG, Timmermann E, Lange U, Lühken R, Kiel E. 2022. Effects of Hibernation Site, Temperature, and Humidity on the Abundance and Survival of Overwintering *Culex pipiens pipiens* and *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae) . *J Med Entomol*. 59(6):2013–2021. doi:10.1093/jme/tjac139.

Scott DE. 2021. *Raptor Medicine, Surgery, and Rehabilitation 3rd Edition*. Third.

Sejvar JJ. 2014. Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection. *Viruses*. 6(2):606–623. doi:10.3390/v6020606.

Silva ASG, Matos ACD, da Cunha MACR, Rehfeld IS, Galinari GCF, Marcelino SAC, Saraiva LHG, Martins NR da S, Maranhão R de PA, Lobato ZIP, et al. 2019. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. *Transbound Emerg Dis*. 66(1):445–453. doi:10.1111/tbed.13043.

Sim S, Ramirez JL, Dimopoulos G. 2012. Dengue virus infection of the *aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLoS Pathog*. 8(3). doi:10.1371/journal.ppat.1002631.

Simşek FM. 2006. Investigation of the ecological characteristics of the malaria vector *Anopheles claviger* (Diptera: Culicidae) in Sanliurfa (Siverek). *Turkiye Parazitolo Derg*. 30(2):115–120.

Sriwichai P, Karl S, Samung Y, Sumruayphol S, Kiattibutr K, Payakkapol A, Mueller I, Yan G, Cui L, Sattabongkot J. 2015. Evaluation of CDC light traps for mosquito surveillance in a malaria endemic area on the Thai-Myanmar border. *Parasit Vectors*. 8(635). doi:10.1186/s13071-015-1225-3.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. 2016. *Veterinary Parasitology*. Fourth. Taylor MA, Coop RL, Wall RL, editors. Wiley Blackwell.

Terra WR. 2001. The Origin and Functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 47(2), 47-61. http://doi.org/10.1002/arch.1036

Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, O'Guinn ML, Andreadis TG, Blow JA. 2005. An Update on the Potential of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Transmit West Nile Virus. *J Med Entomol.* 42(1):57–62. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.1.57>

Turell MJ, Sardelis MR, O'Guinn ML, Dohm DJ. 2002. Potential Vectors of West Nile Virus in North America. In: *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses*. Vol. 267. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 241–252.

United Nations. 2016. THE 17 GOALS. [accessed 2022 Dec 25]. <https://sdgs.un.org/goals>.

Venter M, Pretorius M, Fuller JA, Botha E, Rakgotho M, Stivaktas V, Weyer C, Romito M, Williams J. 2017. West Nile virus lineage 2 in horses and other animals with neurologic disease, South Africa, 2008–2015. *Emerg Infect Dis.* 23(12):2060–2064. doi:10.3201/eid2312.162078.

Vogels CBF, Göertz GP, Pijlman GP, Koenraadt CJM. 2017. Vector competence of European mosquitoes for west Nile virus. *Emerg Microbes Infect.* 6(11):1–13. doi:10.1038/emi.2017.82.

Ward MP, Schuermann JA, Highfield LD, Murray KO. 2006. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet Microbiol.* 118:255–259. doi:10.1016/j.vetmic.2006.07.016.

Wünschmann A, Armién AG, Khatri M, Martinez LC, Willette M, Glaser A, Alvarez J, Redig P. 2017. Ocular Lesions in Red-Tailed Hawks (*Buteo jamaicensis*) With Naturally Acquired West Nile Disease. *Vet Pathol.* 54(2):277–287. doi:10.1177/0300985816669404.

Zeller HG, Schuffenecker I. 2004. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 23(3):147–156. doi:10.1007/s10096-003-1085-1.

Zé-Zé LMM, Proença P, Osório HC, Gomes S, Luz T, Parreira P, Fevereiro M, Alves MJ. 2015. Human case of west Nile neuroinvasive disease in Portugal, summer 2015. *Eurosurveillance.* 20(38). doi:10.2807/1560-7917.ES.2015.20.38.30024.

Zittra C, Waringer J. 2015. Species inventory, ecology, and seasonal distribution patterns of Culicidae (Insecta: Diptera) in the National Park Donau-Auen (Lower Austria). *Aquatic Insects: International Journal of Freshwater Entomology.* 36(1):63–77. doi:10.1080/01650424.2014.1003946.

ANEXOS

Anexo 1 – Poster “Cuidados de enfermagem veterinária a uma cria de doninha (*Mustela nivalis*) em centro de recuperação de animais selvagens”



CUIDADOS DE ENFERMAGEM VETERINÁRIA A UMA CRIA DE DONINHA (*MUSTELA NIVALIS*) EM CENTRO DE RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS

LOPES, I.1; AGUIAR, M.1; SILVEIRA, I.2; CLAUDINO, S.2; FERREIRA, M.3; LOPES, F.3; BRIDA, T.1; MATOS, A.C.1

1 ESA-IPCB ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE CASTELO BRANCO, INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO
2 FMV-UL FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
3 CERAS-QUERCUS CENTRO DE ESTUDOS E RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS SELVAGENS, QUERCUS ANCN

INTRODUÇÃO

A doninha (*Mustela nivalis*) é o mais pequeno carnívoro predador e pertence à família dos mustelídeos. (1) A sua dieta consiste maioritariamente em pequenos mamíferos, especialmente roedores, e ocasionalmente inclui ovos de aves, répteis, anfíbios e invertebrados (1). É uma **espécie protegida** (2), cujo estatuto de conservação é Pouco Preocupante (LC) tanto a nível nacional (3) como global (4). No dia 11 de Março de 2021 foi entregue no CERAS (Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens) uma cria de doninha, macho, proveniente do concelho de Mora, com aproximadamente **10 dias de vida** (olhos fechados, pelagem completa e peso corporal de 20 gramas). Encontrava-se ativa, embora magra, ligeiramente desidratada (5-6%) e com flutuações da temperatura corporal, detetáveis ao toque.

METODOLOGIA

A cronologia do esquema de alimentação é apresentada no diagrama:



Para **estímulo da micção**, utilizaram-se compressas humedecidas, aplicadas no sentido do pelo e para **estímulo da defecação**, massagens em movimentos suaves e circulares, na região abdominal. O pequeno tamanho da cria impediu a **medição da temperatura corporal**, no entanto foi feito um controlo regular por comparação e interpretação da sua atividade. Até atingir 1 mês de vida, foi sempre garantida uma **fonte de calor** para termorregulação e para simular o contacto físico da progenitora. Apesar de requerer uma observação atenta e cuidados de enfermagem veterinária neonatais, vários esforços foram realizados a fim de evitar o **imprinting** da cria com o ser humano, o qual comprometeria a viabilidade da sua **reintrodução** no meio natural, nomeadamente evitando contacto visual direto e reconhecimento do odor.

CONCLUSÕES

Comparativamente a crias de mustelídeos criadas em cativeiro neste Centro de Recuperação, é de salientar a rápida transição entre as fases de desenvolvimento: em menos de 3 dias após a abertura dos olhos, com pouco mais de 20 dias de vida, tornou-se autónoma. Uma das maiores exigências na prestação destes cuidados foi corresponder às elevadas necessidades energéticas características desta espécie, que intercala períodos de atividade e de descanso ao longo das 24 horas, de forma a garantir um consumo frequente de alimento (5). Para tal, as alimentações foram intervaladas em 3 horas, tanto de dia como de noite.

Apesar dos resultados do exame coprológico, não foi realizado tratamento antiparasitário, mas antes monitorização do estado de saúde da cria, a qual se manteve assintomática até à libertação, 2 meses após a entrada.

Os cuidados de Enfermagem Veterinária foram determinantes para o sucesso da recuperação da doninha, tanto a nível físico como social!

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1) Campbell, C. (2014). *Squirrels*. Animal Diversity Web. Consultado em 28 de Setembro de 2021. Disponível em https://animaldiversity.org/species/Mustela_nivalis/
- 2) União Europeia (1979). *Convenção relativa à Conservação do Vito Selvagem e dos Habitats Naturais do Europe*. Convenção de Berna. Anexo III
- 3) Central, M.J. (coord.). Almeida, J., Almeida, P.R., Delgado, T., Ferrás de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Quercus, A.I., Rogado, L. & Santos-Reis, M. (Eds.). (2005). Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (v. 659). Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza.
- 4) McDonald, R.A., Abramov, A.V., Shubin, N., Herrera, J., Moran, T., Thibonov, A., Cavallini, P., Kranz, A., Clamator, G., Kopylov, B. & Reed, F. (2009). *Mustela nivalis* (revised version of 2016 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species. Consultado em 28 de Setembro de 2021. Disponível em <https://doi.org/10.2305/IUCN.VOL.2009.R2009.M2009.110516641>
- 5) Loureiro, F., Pedroso, N., Santos, M. J., Rosalino, L. M. (Eds.). (2021). Um olhar sobre os carnívoros portugueses (3ª ed.). Lisboa: Carnívora - Núcleo de Estudos de Carnívoros e suas Ecosistemas.

RESULTADOS

A evolução do peso corporal foi positiva, com um ganho médio diário de 1,21 g/dia. O peso mínimo foi obtido no 4º dia de recuperação no CERAS, numa fase em que foi evidente o crescimento em comprimento, mas a aceitação do leite não foi tão regular. O peso máximo foi alcançado na última pesagem: 95g, um registo próximo dos valores máximos habituais para indivíduos adultos desta espécie. (1)



GRÁFICO 1: evolução do peso corporal (g) ao longo do tempo em recuperação (dias)

Os seguintes resultados foram obtidos no seguimento de um exame coprológico de rotina. As fezes foram conservadas por refrigeração e analisadas no Laboratório de Parasitologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco através das técnicas de flutuação de Willis e de sedimentação Dennis-Stone & Swanson.

AMOSTRA DE FEZES 01-04-2021

<i>Eimeria</i> spp.	1800 Opg
<i>Strongyloides</i> spp.	1150 Opg 50 Lpg

L1



Anexo 2 - First Report of Oral Candidiasis by *Candida lusitaniae* in a Red Kite (*Milvus milvus*, Lineu 1758)

Received: 22 April 2022, Accepted: 11 June 2022

Case Report

Journal of Advanced Veterinary Research
(2022) Volume 12, Issue 3, 321-323

First Report of Oral Candidiasis by *Candida lusitaniae* in a Red Kite (*Milvus milvus*, Lineu 1758)

Andreia Garcês^{1,2,3*}, Ricardo Lopes^{1,2}, Delsy Salinas¹, Mariana Ferreira⁴, Samuel Infante⁴, Ana Filipa Lopes^{4,5}, Inês Silveira⁶, Sofia Claudino⁶, Augusto Silva¹, Paula Brilhante-Simões^{1,2}

¹INNO - Veterinary Laboratory, R. Cândido de Sousa 15, 4710-503 Braga, Portugal.

²Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário, CRL - CESPU, R. Central Gandra, 1317, 4585-116 Gandra, Portugal.

³CITAB - University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Quinta de Prados 5000-801, Vila Real, Portugal.

⁴CERAS - Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens de Castelo Branco - Quercus ANCN, Quinta da Sra. de Mércules, 6000-909 Castelo Branco.

⁵LX-CRAS - Centro de Recuperação de Animais Silvestres de Lisboa, Parque Florestal de Monsanto, Estr. Barcal 1500, 1500-068 Lisboa.

⁶FMV-UL - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Av. Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa.

*Correspondence

Andreia Garcês
INNO - Veterinary Laboratory, R. Cândido de Sousa 15, 4710-503 Braga, Portugal.
Email: andreiamvg@gmail.com

Abstract

A free-living red kite (*Milvus milvus*, Lineu 1758) adult male was admitted to the CERAS - Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens (Castelo Branco, Portugal) debilitated and with injuries caused by lead projectiles. During the physical exam small lesions, not larger than 7 mm, were observed in the distal portion of the soft palate, laterally to the choanae, compatible with oral candidiasis. *Candida lusitaniae* was the agent isolated from the exudate that was removed from the lesions. This is the first reported case of *C. lusitaniae* associated to oral candidiasis and the first time this bird species was associated with this agent.

KEYWORDS

Candida lusitaniae, *Milvus milvus*, Yeast, Candidiasis

CLINICAL CASE

The red kite (*Milvus milvus*, Lineu 1758) is a migratory medium-large diurnal bird of prey from the family Accipitridae, who resides in the Western Palearctic region of Europe and northwest Africa (Almeida *et al.*, 2005). This species is classified as Least Concerned (LC) according to the IUCN Red List of Threatened Animals (The IUCN Red List of Threatened Species 2020, 2020). In Portugal the resident population is classified as Critically Endangered (CR) according to the Livro Vermelho de Vertebrados de Portugal (Almeida *et al.*, 2005). The species has suffered a decrease in its population and distribution area, due to habitat destruction, direct persecution (shotgun) and poisoning (Almeida *et al.*, 2005).

Candidiasis is placed among one of the most common infectious diseases in birds of prey (Deem, 2003). The most common species responsible by candidiasis in rapine birds are *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* (Deem, 2003). It is an opportunistic agent that is present in the gastrointestinal tract of these animals (Deem, 2003; Ford, 2010). Disease manifestation usually occurs in animals that are held

in captivity associated to stress, immunocompromised animals, nutritional disorders, prolonged antibiotic therapy, or linked to other primary disease (Deem, 2003; Ford, 2010). It is one of the biggest impediments to successful recovery of birds of prey in Wildlife Rehabilitation Centres (Deem *et al.*, 1998; Deem, 2003).

Candida lusitaniae is an extremely rare yeast (Hawkins and Baddour, 2003). It has been recently associated to some nosocomial infections in human hospitals, particularly in patients with cancer (Guinet *et al.*, 1983; Minari *et al.*, 2001; Tikotekar *et al.*, 2008; Wawrysiuk *et al.*, 2018; Apsemidou *et al.*, 2020). This agent is known for its resistance to amphotericin B (Guinet *et al.*, 1983; Asner *et al.*, 2015).

An adult red kite (*Milvus milvus*) was admitted to CERAS - Centro de Estudos e Recuperação de Animais Selvagens (Castelo Branco, Portugal) with a normal body condition (2.5 on a scale of 0 to 5), weighing 772 g (within the expected range) and a mild degree of dehydration (6%). It presented a closed and comminuted fracture in the diaphysis of the right ulna. It had perforating wounds, with entrance to the muscle in the right knee, tibiotarsus area, left femur, at the level of the 3rd phalanx of the 3rd digit of the left hind limb. Feathers in the anatomical region of

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
ISSN: 2090-6277/2090-6269/ © 2011-2022 [Journal of Advanced Veterinary Research](http://www.javr.com). All rights reserved.

both femurs were damaged at the level of the beards and with a burnt appearance and thickened skin tissue in that region (groin). The animal was submitted to a radiographic examination where it was possible to observe numerous six lead projectiles, dispersed in various locations of the animal's body.

In the oral cavity two lesions were observed (not larger than 7 mm), in the distal portion of the soft palate, laterally to the choanae. One of them perforated the mucosa, with little depth and with greyish pasty content inside, and the other with a nodular shape (cauliflower appearance), grey in colour and haemorrhagic to the touch.

Swabs of the lesions in the oral cavity were collected and sent for fungal culture at INNO – Veterinary Laboratory (Braga, Portugal). The sample was plated onto solid culture media CHROMID® *Candida*/Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 Agar (REF 43464, BióMerieux, France) and incubated at 30-35°C during 48 h. On CHROMID® *Candida* Agar blue, dome-shaped and glistening colonies with 2-3 mm of diameter were observed. Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 Agar white, dome-shaped and glistening colonies with 2-3 mm of diameter were observed (Fig. 1). Species identification was made using the isolated colonies by VITEK® 2 Compact (YST ID Car REF 21343, BioMérieux, France). The identified agent was *Candida lusitanae*. Susceptibility of the yeasts to antifungal agents was performed using FUNGITEST Kit (REF 60780, BioRad) by broth dilution method. The isolated agent was susceptible to all six antifungal agents: amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, itraconazole, ketoconazole and miconazole.

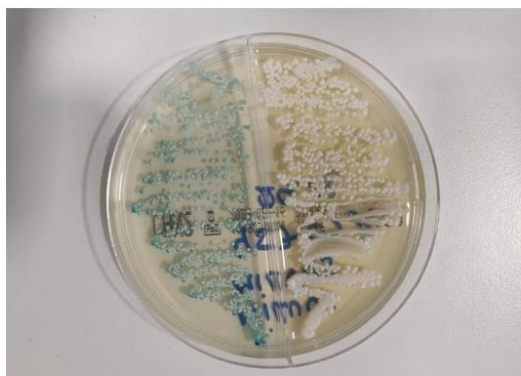


Fig. 1. *Candida lusitanae* grown onto in solid culture media CHROMID® *Candida*/Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 Agar (REF 43464, BióMerieux, France) incubated at 30-35° C during 48h. On CHROMID® *Candida* Agar were observed blue, dome-shaped, and glistening colonies with 2-3 mm of diameter, and on the Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 Agar were observed white, dome-shaped, and glistening colonies with 2-3 mm of diameter.

Treatment of gunshot injuries included supportive therapy (fluid therapy with 0.9% Sodium Chloride and vitamin supplementation with Duphalyte®), anti-inflammatory (meloxicam 1 mg/kg, IM, SID), analgesic for pain management (buprenorphine 0.25 mg/kg, IM, SID and tramadol 10 mg/kg, PO, BID), antibiotic (amoxicillin and clavulanic acid 125 mg/kg, PO, BID), fracture stabilization (figure of 8 bandage), soft tissue wound care and excision of the projectiles. *Candida*-associated lesions in the oral mucosa were scrubbed with chlorhexidine 0.2% and pieces of growth were removed with tweezers and swabs, during the recovery period of the animal (3 months). When the animal was released back to its habitat, it only showed mucosal erosion at the lesion site (Fig. 2).



Fig. 2. Mucosal erosion in the oral cavity of red kite (*Mihus milvus*) after recovery from candidiasis by *Candida lusitanae*.

C. lusitanae, the agent identified in this case, is an opportunistic agent, especially when the immune system of the host is compromised or previous primary infection occurs (Apsemidou et al., 2020; Minari et al., 2001). Although rare, it has been isolated in the oral and digestive flora of birds, such as pigeons (Pakshir et al., 2019). Candidiasis has been described in several species of animals (domestic and non-domestic) (Seyedmousavi et al., 2018), but in birds the oral and gastrointestinal forms are the most common (Deem, 2003; Seyedmousavi et al., 2018), as observed in this case.

Infections by *Candida* species in animals are usually caused by strains that commensally exist in the microbiota flora of the host rather than by vertical or longitudinal transfer (Seyedmousavi et al., 2018). In the case presented, the most likely scenario is that this yeast already existed in the oral cavity as commensal and the manifestation of the disease was due to immunosuppression caused by its wounds. Nevertheless, we cannot eliminate the possibility that this pathogen has been acquired from other animals (by contact with other individuals of the same specie or its preys).

Although *C. lusitanae* is known for its resistance to amphotericin B, with some reviews reporting a prevalence of resistance as high as 60% (Apsemidou et al., 2020; Hawkins and Baddour, 2003; Tikotekar et al., 2008) that was not observed in the present case. In this case no treatment with antifungal agents was necessary, only the cleaning of the lesion and recovery of the animal health. The main cause of admission of the animal was not the candidiasis, but the injuries (wing fracture) inflicted by the shotgun. The lesion in the oral cavity was not fatal, and probably would not develop if the animals was not under stress and immunosuppressed. The observation of these lesions in this animal was a causality, that if not treated, considering the condition of the animal, could probably have disseminated to the internal organs.

Treatment of this type of lesion caused by *Candida* species before release of the animals into the wild is essential, thus avoiding contamination of the environment and other animals. The zoonotic potential of these yeasts is low, but it should be always considered (Deem, 2003; Seyedmousavi et al., 2018).

To the author's knowledge, this is the first reported case of candidiasis by *C. lusitanae* in a red kite (*M. milvus*). This report is vital to improve the understanding of pathogenic yeast in rapine birds and reinforces the importance of including infections by *Candida* species as a differential diagnosis of bacterial infections,

parasitosis and hypovitaminosis A, that should be considered when birds do not respond to antibiotic treatment.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors has any conflict of interest to declare.

REFERENCES

- Almeida, J., Catry, P., Encarnação, V., Granadeiro, J., Lopes, R., Moreira, F., 2005. Red kit *Milvus milvus*. Livro Vermelho Vertebrados de Portugal, Instituto da Conservação da Natureza; Lisboa, pp. 659.
- Apsemidou, A., Füller, MA., Idelevich, E.A., Kurzai, O., Tragiannidis, A., Groll, A.H., 2020. *Candida lusitanae* Breakthrough Fungemia in an Immuno-Compromised Adolescent: Case Report and Review of the Literature. *J. Fungi* 6, 380.
- Asner, S.A., Giulieri, S., Diezi, M., Marchetti, O., Sanglard, D., 2015. Acquired Multidrug Antifungal Resistance in *Candida lusitanae* during Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7715–7722.
- Deem, S.L., 2003. Fungal diseases of birds of prey. *Veterinary Clin North Am Exot Anim Pract* 6, 363–376.
- Deem, S.L., Terrell, S.P., Forrester, D.J., 1998. A Retrospective Study of Morbidity and Mortality of Raptors in Florida: 1988–1994. *J. Zoo. Wildl. Med.* 29, 160–164.
- Ford, S., 2010. Raptor Gastroenterology. *J. Exot. Pet. Med.* 19, 140–50.
- Guinet, R., Chanas, J., Goullier, A., Bonnefoy, G., Ambroise-Thomas, P., 1983. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*. *J. Clin. Microbiol.* 18, 443–444.
- Hawkins, J.L., Baddour, L.M., 2003. *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. *Clin. Infect. Dis. Off Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 36, 14–18.
- Minari, A., Hachem, R., Raad, I., 2001. *Candida lusitanae*: A Cause of Breakthrough Fungemia in Cancer Patients. *Clin. Infect. Dis.* 32, 186–190.
- Pakshir, K., Zareshahabadi, Z., Zomorodian, K., Ansari, S., Nouraei, H., Gharavi, A., 2019. Molecular identification of non-*Cryptococcus* yeasts associated with pigeon droppings in Shiraz, Southern Iran. *Iran J. Vet. Res.* 20, 204–208.
- Seyedmousavi, S., Bosco, de Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R.R., et al., 2018. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Med. Mycol.* 56, 165–87.
- The IUCN Red List of Threatened Species 2020. BirdLife International- *Milvus milvus*. IUCN Red List Threat Species 2020. e.T22695072A181651010. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T22695072A181651010.en>. (Accessed 24 February 2022).
- Tikotekar, A., Naik, A., Fisher, B., Rahman, H., Lopez, R., 2008. *Candida lusitanae*: an emerging cause of pleuropulmonary infection. *Chest* 134, 13C.
- Wawrysiuk, S., Rechberger, T., Futyma, K., Miotła, P., 2018. *Candida lusitanae* – a case report of an intraperitoneal infection. *Menopause Rev.* 17, 94–96.

Anexo 3 - Lesões observadas em aves infetadas, naturalmente e experimentalmente, com o vírus do Nilo Ocidental (Adaptado de Byas and Ebel 2020).

Órgãos	Lesões	Famílias afetadas
Cérebro	Infiltrado perivascular	<i>Accipitridae, Anatidae, Laridae, Falconidae, Phasianidae, Corvidae, Laniidae, Passeridae, Phoenicopteridae, Psittacidae, Strigopidae e Strigidae.</i>
	Gliose/ nódulos na glia	<i>Accipitridae, Anatidae, Laridae, Falconidae, Phasianidae, Corvidae, Laniidae, Phoenicopteridae, Psittacidae, Strigopidae e Strigidae.</i>
	Inflamação meníngea	<i>Accipitridae, Anatidae, Falconidae, Corvidae, Phalacrocoracidae e Strigidae.</i>
	Degeneração neuronal e necrose	<i>Accipitridae, Anatidae, Laridae, Falconidae, Phasianidae, Corvidae, Phalacrocoracidae, Strigopidae e Strigidae.</i>
	Vasculite	<i>Accipitridae, Corvidae e Passeridae.</i>
	Hemorragia	<i>Accipitridae, Phasianidae, Phalacrocoracidae e Strigidae.</i>
Medula espinal	Inflamação	<i>Accipitridae, Anatidae e Strigidae.</i>
	Degeneração neuronal e necrose	<i>Anatidae e Strigidae.</i>
Olho	Retinite	<i>Accipitridae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Necrose da retina	<i>Accipitridae.</i>
	Inflamação do pécten	<i>Accipitridae e Phasianidae.</i>
	Uveíte	<i>Accipitridae, Falconidae e Phasianidae.</i>
Coração	Inflamação	<i>Accipitridae, Anatidae, Laridae, Ardeidae, Falconidae, Phasianidae, Corvidae, Laniidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Necrose das fibras musculares	<i>Accipitridae, Anatidae, Falconidae, Phasianidae, Corvidae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Lise e mineralização das miofibrilas	<i>Accipitridae, Anatidae, Laridae, Ardeidae, Falconidae, Phasianidae, Corvidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae e Psittacidae.</i>
	Vasculite	<i>Falconidae e Corvidae.</i>
	Hemorragia	<i>Accipitridae, Laridae, Ardeidae, Phasianidae, Corvidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae e Psittacidae.</i>
Trato Gastrointestinal	Inflamação	<i>Accipitridae, Phasianidae, Corvidae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Necrose dos enterócitos	<i>Anatidae, Phasianidae, Corvidae e Strigidae.</i>
	Necrose das criptas	<i>Corvidae, Laniidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Hemorragia	<i>Anatidae, Corvidae e Phoenicopteridae.</i>
Fígado	Inflamação	<i>Accipitridae, Anatidae, Falconidae, Phasianidae, Corvidae, Laniidae, Fringillidae, Psittacidae, Strigopidae e Strigidae.</i>
	Necrose dos hepatócitos	<i>Accipitridae, Anatidae, Phasianidae, Corvidae, Laniidae, Passeridae, Fringillidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae, Psittacidae, Strigopidae e Strigidae.</i>
	Vasculite	<i>Falconidae.</i>
	Hiperplasia do ducto biliar	<i>Accipitridae e Phoenicopteridae.</i>
	Hemossiderose	<i>Accipitridae, Phasianidae, Corvidae, Passeridae e Strigidae.</i>
	Hemorragia	<i>Accipitridae e Corvidae.</i>

Rim	Inflamação intersticial	<i>Accipitridae, Anatidae, Ardeidae, Falconidae, Phasianidae, Corvidae, Passeridae, Fringillidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae, Psittacidae, Strigidae e Strigidae.</i>
	Necrose tubular	<i>Accipitridae, Anatidae, Phasianidae, Corvidae, Passeridae, Fringillidae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Necrose glomerular	<i>Psittacidae e Strigidae.</i>
	Vasculite	<i>Falconidae.</i>
	Hemorragia	<i>Anatidae.</i>
Pulmão	Inflamação	<i>Accipitridae, Phasianidae, Corvidae, Passeridae e Strigidae.</i>
	Necrose	<i>Accipitridae, Corvidae e Strigidae.</i>
	Vasculite	<i>Corvidae.</i>
	Edema	<i>Accipitridae, Falconidae, Laniidae e Passeridae.</i>
Baço	Necrose dos tecidos linfóides	<i>Accipitridae, Anatidae, Ardeidae, Phasianidae, Corvidae, Laniidae, Fringillidae, Phalacrocoracidae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Depleção linfóide	<i>Accipitridae, Anatidae, Falconidae, Phasianidae e Strigidae.</i>
	Deposição de fibrina	<i>Ardeidae, Phasianidae, Laniidae, Phalacrocoracidae e Strigidae.</i>
	Hemorragia	<i>Anatidae, Ardeidae e Phalacrocoracidae.</i>
	Hemossiderose	<i>Accipitridae, Anatidae, Phasianidae, Corvidae, Passeridae e Strigidae.</i>
	Vasculite	<i>Falconidae.</i>
Sistema Endócrino	Necrose pancreática	<i>Anatidae, Phasianidae, Laniidae, Phoenicopteridae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Pancreatite	<i>Accipitridae, Anatidae, Falconidae, Phasianidae, Phalacrocoracidae, Phoenicopteridae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Necrose das adrenais	<i>Phasianidae e Psittacidae.</i>
	Inflamação das adrenais	<i>Accipitridae, Phasianidae, Corvidae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Necrose da tireoide	<i>Anatidae.</i>
	Tireoidite	<i>Accipitridae.</i>
Pele	Inflamação	<i>Anatidae e Psittacidae.</i>
Músculo Esquelético	Degeneração e necrose das miofibrilas	<i>Accipitridae, Falconidae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Inflamação	<i>Accipitridae, Falconidae, Phasianidae, Psittacidae e Strigidae.</i>
	Fibrose	<i>Accipitridae e Strigidae.</i>
Gónadas	Inflamação	<i>Phasianidae e Strigidae.</i>
	Necrose	<i>Strigidae.</i>

Anexo 3 - Lesões observadas em aves infetadas, naturalmente e experimentalmente, com o vírus do Nilo Ocidental (Adaptado de Byas and Ebel 2020).

Anexo 4 - Resultados obtidos nas colheitas efetuadas durante os meses de outubro a fevereiro, inclusive, especificando a espécie de mosquito capturada e o respetivo sexo, a quantidade de mosquitos em cada colheita e a presença/ausência de refeição sanguínea.

Colheita	Data da Colheita	Local da Armadilha	Resultado	Quantidade de Mosquitos	Notas
Colheita 1	06/out/21	Local 1 (CERAS)	1 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 3 ♀ <i>Culex pipiens</i>	4	
Colheita 2	07/out/21	Local 1 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 3	08/out/21	Local 1 (CERAS)	1 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 5 ♀ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♀ <i>Culiseta longiareolata</i>	7	
Colheita 4	10/out/21	Local 1 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 5.1	11/out/21; 14/out/21; 16/out/21	Local 2 (Picadeiro)	1 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 3 ♀ <i>Culex pipiens</i>	4	
Colheita 5.2	12/out/21	Local 3 (CERAS)	1 ♂ <i>Culex pipiens</i>	1	
Colheita 5.3	14/out/21; 15/out/21; 16/out/21	Local 3 (CERAS)	3 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♀ <i>Culex pipiens</i> + 3 ♂ <i>Culiseta longiareolata</i> + 1 ♀ <i>Culiseta annulata</i>	8	
Colheita 6.1	19/out/21; 20/out/21	Local 2 (Picadeiro)	2 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♀ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♀ <i>Culex theileri</i> + 1 ♂ <i>Culiseta longiareolata</i> + 1 ♀ <i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	6	
Colheita 6.2	19/out/21; 20/out/21	Local 4 (CERAS)	3 ♀ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♀ <i>Culiseta longiareolata</i> + 5 ♂ <i>Culex pipiens</i>	9	1 fêmea de <i>Culex pipiens</i> com abdómen engorgitado
Colheita 7	26/out/21; 27/out/21	Local 4 (CERAS)	1 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♀ <i>Culex pipiens</i>	2	
Colheita 8	4/nov/21; 5/nov/21; 6/nov/21	Local 4 (CERAS)	2 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♂ <i>Culiseta longiareolata</i>	3	
Colheita 9.1	7/nov/21; 8/nov/21	Local 2 (Picadeiro)	1 ♀ <i>Culiseta longiareolata</i>	1	
Colheita 9.2	7/nov/21; 8/nov/21	Local 4 (CERAS)	3 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♂ <i>Aedes spp.</i> + 1 ♀ <i>Culex pipiens</i>	5	
Colheita 10.1	10/nov/21	Local 2 (Picadeiro)	N/A	0	
Colheita 10.2	10/nov/21	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 11.1	11/nov/21; 13/nov/21	Local 2 (Picadeiro)	1 ♂ <i>Culex pipiens</i> + ♀ <i>Culex pipiens</i>	2	
Colheita 11.2	11/nov/21; 13/nov/21	Local 4 (CERAS)	1 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♂ <i>Anopheles spp.</i> + 1 ♀ <i>Culex pipiens</i>	3	
Colheita 12.1	14/nov/21; 16/nov/21	Local 2 (Picadeiro)	1 ♂ <i>Culex pipiens</i> + 1 ♀ <i>Culiseta longiareolata</i>	2	
Colheita 12.2	14/nov/21; 16/nov/21	Local 4 (CERAS)	3 ♂ <i>Culex pipiens</i>	3	
Colheita 13.1	17/nov/21; 18/nov/21	Local 2 (Picadeiro)	0 mosquitos	0	

Colheita 13.2	17/nov/21; 18/nov/21	Local 4 (CERAS)	1 ♂ <i>Anopheles spp.</i> + 1 ♂ <i>Culiseta longiareolata</i> + 1 ♂ <i>Aedes spp.</i> + 1 ♀ <i>Culex pipiens</i>	4	1 fêmea de <i>Culex pipiens</i> com abdômen engorgitado
Colheita 14.1	22/nov/21; 23/nov/21	Local 2 (Picadeiro)	0 mosquitos	0	
Colheita 14.2	22/nov/21; 23/nov/21	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 15.1	26/nov/21; 27/nov/21	Local 2 (Picadeiro)	N/A	0	
Colheita 15.2	26/nov/21; 27/nov/21	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 16.1	28/nov/21	Local 2 (Picadeiro)	N/A	0	
Colheita 16.2	28/nov/21	Local 4 (CERAS)	1 ♀ <i>Culiseta longiareolata</i>	1	
Colheita 17.1	30/nov/21; 1/dez/21	Local 2 (Picadeiro)	N/A	0	
Colheita 17.2	30/nov/21; 1/dez/21	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 18.1	2/dez/21; 3/dez/21	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 18.2	2/dez/21; 3/dez/21	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 19.1	11/dez/21; 12/dez/21; 15/12/21	Local 5 (CERAS)	1 ♂ <i>Culiseta longiareolata</i> + 1 ♀ <i>Culiseta longiareolata</i>	2	
Colheita 19.2	11/dez/21; 12/dez/21; 15/12/21	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 20.1	19/dez/21; 20/dez/21; 21/dez/21	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 20.2	19/dez/21; 20/dez/21; 21/dez/21	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 21.1	2/jan/22; 3/jan/22; 4/jan/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 21.2	2/jan/22; 3/jan/22; 4/jan/22	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 22.1	5/jan/22; 6/jan/22; 7/jan/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 22.2	5/jan/22; 6/jan/22; 7/jan/22	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 23.1	11/jan/22; 12/jan/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 23.2	11/jan/22; 12/jan/22	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 24.1	13/jan/22; 14/jan/22; 15/jan/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 24.2	13/jan/22; 14/jan/22; 15/jan/22	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	

Colheita 25.1	20/jan/22; 22/jan/22; 23/jan/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 25.2	20/jan/22; 22/jan/22; 23/jan/22	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 26.1	24/jan/22; 25/jan/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 26.2	24/jan/22; 25/jan/22	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 27	26/jan/22; 27/jan/22	Local 5 (CERAS)	1 ♀ <i>Culiseta annulata</i>	1	Fêmea de <i>Culiseta annulata</i> com abdómen engorgitado.
Colheita 28.1	29/jan/22; 30/jan/22; 31/jan/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 28.2	29/jan/22; 30/jan/22; 31/jan/22	Local 4 (CERAS)	N/A	0	
Colheita 29.1	1/fev/22; 2/fev/22; 3/fev/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 29.2	1/fev/22; 2/fev/22; 3/fev/22	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 30.1	5/fev/22; 6/fev/22; 7/fev/22	Local 5 (CERAS)	2 ♀ <i>Culex pipiens</i>	2	
Colheita 30.2	5/fev/22; 6/fev/22; 7/fev/22	Local 6 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 31.1	8/fev/22; 9/fev/22; 10/fev/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 31.2	8/fev/22; 9/fev/22; 10/fev/22	Local 6 (CERAS)	N/A	0	
Colheita 32.1	13/fev/22; 14/fev/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 32.2	13/fev/22; 14/fev/22	Local 6 (CERAS)	N/A	0	
Colheita 33.1	15/fev/22; 16/fev/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 33.2	15/fev/22; 16/fev/22	Local 6 (CERAS)	N/A	0	
Colheita 34.1	20/fev/22; 21/fev/22	Local 5 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 34.2	20/fev/22; 21/fev/22	Local 6 (CERAS)	N/A	0	
Colheita 35.1	22/fev/22; 23/fev/22	Local 7 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 35.2	22/fev/22; 23/fev/22	Local 4 (CERAS)	N/A	0	
Colheita 36.1	27/fev/22	Local 7 (CERAS)	0 mosquitos	0	
Colheita 36.2	27/fev/22	Local 4 (CERAS)	0 mosquitos	0	

TOTAL	70	
-------	----	--

Anexo 4 - Resultados obtidos nas colheitas efetuadas durante os meses de outubro a fevereiro, inclusive, especificando a espécie de mosquito capturada e o respetivo sexo, a quantidade de mosquitos em cada colheita e a presença/ausência de refeição sanguínea.

Legenda: N/A representa uma colheita que foi nula devido a uma falha técnica (paragem da ventoinha) observada na manhã seguinte à instalação da armadilha.

Anexo 5 – Dados diários, provenientes da estação meteorológica de Castelo Branco, de outubro de 2021 a fevereiro de 2022 inclusive, acerca da temperatura do ar, humidade relativa e quantidade de precipitação.

Ano	Mês	Dia	T. méd.	T. máx.	T. mín.	HR. méd.	HR. máx.	HR. Mín.	P.
2021	Outubro	1	21.1	28.0	15.3	47.0	72.0	22.0	0.0
		2	19.2	25.9	13.0	63.0	84.0	43.0	0.0
		3	15.9	19.7	11.0	68.0	100.0	34.0	10.7
		4	14.8	20.4	9.6	63.0	81.0	41.0	0.0
		5	17.8	24.1	12.7	70.0	89.0	51.0	0.0
		6	20.1	26.1	15.2	61.0	87.0	38.0	0.0
		7	21.0	27.5	14.9	48.0	64.0	27.0	0.0
		8	22.2	29.1	16.6	41.0	55.0	24.0	0.0
		9	21.3	27.2	15.7	43.0	67.0	24.0	0.0
		10	19.6	25.5	14.4	47.0	59.0	36.0	0.0
		11	19.4	25.0	16.0	54.0	68.0	36.0	0.0
		12	19.8	25.7	14.8	52.0	69.0	34.0	0.0
		13	19.6	26.1	13.2	36.0	51.0	28.0	0.0
		14	19.1	25.3	11.9	41.0	63.0	29.0	0.0
		15	18.9	25.8	12.3	50.0	78.0	27.0	0.0
		16	18.6	22.2	13.7	56.0	76.0	36.0	0.0
		17	16.9	20.2	13.9	96.0	100.0	64.0	16.0
		18	18.4	21.9	16.5	92.0	100.0	71.0	0.1
		19	20.6	26.6	15.9	75.0	100.0	49.0	0.0
		20	18.6	25.2	13.4	73.0	100.0	42.0	0.0
		21	15.4	20.7	10.8	70.0	89.0	48.0	0.0
		22	14.9	21.0	8.4	55.0	83.0	32.0	0.0
		23	15.6	20.9	9.4	53.0	75.0	32.0	0.0
		24	15.6	22.8	8.0	57.0	86.0	30.0	0.0
		25	15.5	22.4	8.5	59.0	92.0	35.0	0.0
		26	16.4	22.4	11.5	50.0	68.0	30.0	0.0
		27	16.2	22.3	10.2	52.0	76.0	28.0	0.0
		28	15.8	22.4	8.5	53.0	82.0	30.0	0.0
		29	15.5	18.4	14.0	92.0	100.0	70.0	31.7
		30	16.9	18.7	15.2	93.0	100.0	75.0	28.6
		31	18.5	21.4	16.4	97.0	100.0	79.0	16.3
2021	Novembro	1	14.5	16.9	10.9	73.0	100.0	51.0	0.0
		2	12.6	15.2	9.5	81.0	100.0	70.0	0.9
		3	10.0	14.3	6.7	69.0	84.0	46.0	0.1
		4	9.3	14.7	3.5	64.0	93.0	37.0	0.0
		5	9.9	15.1	6.4	56.0	71.0	37.0	0.0
		6	9.4	14.4	5.2	56.0	73.0	36.0	0.0
		7	11.6	16.5	7.4	44.0	59.0	25.0	0.0
		8	15.0	20.9	10.4	57.0	72.0	37.0	0.0
		9	16.1	21.1	11.9	50.0	65.0	30.0	0.0
		10	12.8	18.0	8.8	54.0	72.0	34.0	0.0
		11	13.1	19.5	7.9	59.0	84.0	35.0	0.0

		12	13.1	18.3	8.2	58.0	72.0	40.0	0.0
		13	13.9	20.7	8.4	59.0	83.0	34.0	0.0
		14	14.0	20.9	9.1	48.0	72.0	19.0	0.0
		15	12.5	17.9	8.7	55.0	66.0	42.0	0.0
		16	10.8	15.0	7.8	58.0	69.0	42.0	0.0
		17	10.8	15.6	7.5	59.0	72.0	44.0	0.0
		18	10.3	15.3	5.8	61.0	72.0	47.0	0.0
		19	12.4	16.3	8.5	65.0	81.0	50.0	0.0
		20	12.1	15.9	10.0	78.0	99.0	60.0	0.5
		21	12.2	16.8	10.2	89.0	100.0	60.0	0.2
		22	8.7	12.3	3.2	69.0	94.0	40.0	0.0
		23	6.6	10.2	2.9	71.0	82.0	54.0	0.0
		24	7.8	13.8	1.9	75.0	98.0	42.0	0.0
		25	7.7	12.2	3.8	73.0	97.0	50.0	0.0
		26	8.3	13.7	4.6	61.0	75.0	39.0	0.0
		27	8.3	13.5	4.3	61.0	90.0	31.0	0.0
		28	7.4	11.5	2.8	64.0	83.0	44.0	0.0
		29	10.2	13.9	6.1	66.0	83.0	52.0	0.0
		30	7.6	12.7	3.3	78.0	97.0	54.0	0.0
	Dezembro	1	8.1	14.0	1.5	83.0	100.0	57.0	0.0
		2	8.7	13.0	4.9	60.0	80.0	35.0	0.0
		3	8.4	16.0	2.0	69.0	95.0	43.0	0.0
		4	10.4	17.0	6.4	81.0	100.0	54.0	0.0
		5	9.6	13.5	6.2	65.0	82.0	49.0	0.0
		6	11.1	16.1	6.3	72.0	100.0	53.0	0.0
		7	12.5	14.5	9.7	91.0	100.0	66.0	0.7
		8	9.5	11.7	7.7	67.0	96.0	51.0	0.8
		9	11.0	13.3	7.2	74.0	96.0	63.0	0.0
		10	12.2	15.0	9.1	78.0	89.0	68.0	0.0
		11	12.5	19.0	5.6	72.0	91.0	53.0	0.0
		12	11.9	17.0	8.1	80.0	94.0	56.0	0.0
		13	10.5	15.5	7.1	76.0	92.0	55.0	0.0
		14	9.5	15.1	5.8	69.0	86.0	50.0	0.0
		15	10.4	16.5	4.8	53.0	70.0	36.0	0.0
		16	10.1	14.6	5.3	56.0	73.0	39.0	0.0
		17	8.7	13.6	5.5	70.0	85.0	47.0	0.0
		18	7.9	12.4	5.2	74.0	86.0	56.0	0.0
		19	9.3	14.2	5.8	76.0	89.0	57.0	0.0
		20	9.4	10.9	7.8	94.0	100.0	74.0	30.7
		21	11.3	12.7	10.1	100.0	100.0	100.0	20.6
		22	11.9	14.5	10.0	98.0	100.0	88.0	1.4
		23	12.1	14.2	10.0	100.0	100.0	91.0	23.3
		24	10.0	12.5	7.8	100.0	100.0	98.0	6.7
		25	11.6	14.0	10.2	100.0	100.0	92.0	21.1
		26	13.0	15.3	10.7	100.0	100.0	99.0	3.1
		27	13.8	16.5	12.0	85.0	100.0	64.0	0.7

2022		28	13.9	17.1	12.0	90.0	100.0	70.0	0.0
		29	12.6	14.4	11.0	100.0	100.0	93.0	0.5
		30	10.8	15.2	7.5	88.0	100.0	61.0	0.0
		31	11.5	16.7	7.4	81.0	99.0	56.0	0.1
	Janeiro	1	11.8	16.3	8.4	73.0	91.0	51.0	0.0
		2	11.3	16.5	6.0	83.0	100.0	64.0	0.0
		3	10.7	15.2	6.3	92.0	100.0	69.0	0.1
		4	8.3	11.3	4.2	88.0	100.0	60.0	1.9
		5	8.6	12.8	5.1	84.0	100.0	55.0	1.5
		6	7.1	11.7	3.2	78.0	90.0	61.0	0.0
		7	8.5	12.6	5.1	73.0	91.0	56.0	0.0
		8	7.0	11.3	4.0	70.0	82.0	50.0	0.0
		9	9.6	14.3	3.1	85.0	100.0	69.0	0.0
		10	12.5	17.8	7.4	84.0	100.0	59.0	0.0
		11	12.7	17.8	9.5	64.0	84.0	41.0	0.0
		12	9.8	13.7	6.8	67.0	79.0	52.0	0.0
		13	7.3	12.2	3.5	64.0	77.0	43.0	0.0
		14	6.2	11.3	2.9	66.0	81.0	42.0	0.0
		15	6.9	11.0	4.7	66.0	80.0	55.0	0.0
		16	8.0	12.5	4.8	67.0	86.0	49.0	0.0
		17	8.1	13.0	4.4	68.0	85.0	48.0	0.0
		18	7.9	13.1	3.0	59.0	76.0	36.0	0.0
		19	8.1	14.7	1.3	55.0	86.0	28.0	0.0
		20	9.8	15.5	5.0	44.0	62.0	26.0	0.0
		21	7.3	12.4	3.6	56.0	69.0	37.0	0.0
		22	5.9	11.6	1.7	61.0	76.0	47.0	0.0
		23	6.9	12.2	3.5	71.0	83.0	53.0	0.0
		24	7.1	12.2	3.5	71.0	86.0	49.0	0.0
		25	7.8	13.3	3.8	67.0	80.0	45.0	0.0
		26	8.1	12.4	3.8	66.0	81.0	51.0	0.0
		27	10.6	14.8	7.2	54.0	71.0	35.0	0.0
		28	9.4	14.8	3.7	42.0	62.0	24.0	0.0
		29	9.9	16.2	3.9	30.0	43.0	17.0	0.0
30		11.0	16.4	6.5	30.0	43.0	17.0	0.0	
31		12.3	19.7	5.2	31.0	59.0	15.0	0.0	
Fevereiro	1	11.6	17.2	7.7	46.0	60.0	34.0	0.0	
	2	11.6	17.4	6.9	57.0	75.0	36.0	0.0	
	3	10.3	15.8	4.3	67.0	93.0	44.0	0.0	
	4	9.2	15.0	4.0	80.0	100.0	52.0	0.0	
	5	10.1	16.1	4.8	67.0	100.0	39.0	0.0	
	6	9.9	15.6	5.8	40.0	57.0	21.0	0.0	
	7	11.8	18.9	5.2	36.0	47.0	23.0	0.0	
	8	11.8	17.5	7.0	44.0	60.0	33.0	0.0	
	9	11.6	17.3	6.3	57.0	72.0	40.0	0.0	
	10	11.6	17.7	6.4	64.0	85.0	41.0	0.0	
	11	13.6	19.2	7.7	60.0	89.0	38.0	0.0	

		12	10.7	14.8	6.5	75.0	98.0	47.0	0.0
		13	8.1	11.1	3.1	93.0	100.0	66.0	2.1
		14	8.6	13.6	5.3	73.0	97.0	44.0	0.0
		15	7.8	14.3	0.9	73.0	100.0	37.0	0.0
		16	10.1	16.4	3.9	81.0	100.0	57.0	0.0
		17	12.7	19.5	6.3	79.0	100.0	46.0	0.0
		18	9.5	17.1	5.0	92.0	100.0	51.0	0.2
		19	10.1	15.0	6.8	53.0	94.0	34.0	0.0
		20	11.1	17.4	5.9	41.0	61.0	23.0	0.0
		21	13.0	19.6	6.9	48.0	74.0	26.0	0.0
		22	14.6	20.9	9.7	30.0	54.0	12.0	0.0
		23	13.4	18.2	9.3	35.0	57.0	26.0	0.0
		24	12.0	17.3	6.7	50.0	72.0	34.0	0.0
		25	11.8	15.8	8.9	58.0	72.0	45.0	0.0
		26	10.4	12.0	8.3	84.0	96.0	67.0	0.6
		27	12.0	17.7	8.5	74.0	100.0	42.0	0.0
		28	12.6	18.9	5.4	63.0	94.0	38.0	0.0

Anexo 5 – Dados diários, provenientes da estação meteorológica de Castelo Branco, de outubro de 2021 a fevereiro de 2022 inclusive, acerca da temperatura do ar, humidade relativa e quantidade de precipitação.

Legenda: T. méd. - Temperatura média do ar a 1,5m (°C); T. máx. – Temperatura máxima do ar a 1,5m (°C); T. mín. - Temperatura mínima do ar a 1,5m (°C); HR. méd. - Humidade relativa média (%); HR. máx. - Humidade relativa máxima (%); HR. mín. - Humidade relativa mínima (%); P. - Quantidade de precipitação (mm).