



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Doença Hemorrágica Epizootica – Detecção do
Vírus da Doença Hemorrágica Epizootica no
Concelho de Idanha-a-Nova**

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientado por Professor Doutor David Ramilo e Professora Doutora Margarida Alves.

Afonso Monteiro Rito, n.º 21805608

2025

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Doença Hemorrágica Epizootica – Detecção do
Vírus da Doença Hemorrágica Epizootica no
Concelho de Idanha-a-Nova**

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia 29/04/2025 perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 246 / 2025, de 21 de Março, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Pedro Faísca

Arguente: Professor Doutor Jacinto Gomes (Instituto Politécnico de Portalegre)

Orientador: Professor Doutor David Ramilo

Este trabalho também foi orientado por Professora Doutora Margarida Alves

Afonso Monteiro Rito, n.º 21805608

2025

Agradecimentos

Gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento ao Professor David Ramilo e à Professora Margarida Alves pela orientação contínua e pelo apoio essencial ao longo deste trabalho, dada a vasta experiência e perspicácia científica de ambos. Agradeço a generosidade em partilhar conhecimento, a paciência e atenção que dedicaram ao acompanhar o meu progresso, sempre em busca da excelência nos resultados obtidos, com sugestões construtivas que enriqueceram a dissertação.

Aos meus orientadores dos estágios curriculares, em especial ao Dr. Álvaro Lopes, e a toda a equipa da Zootecnia, Nutrizia e INSAVET S.L, representada pelo Dr. Javier Velasco Diego, cujo apoio foi fundamental para o meu desenvolvimento prático. Quero ainda reconhecer o contributo decisivo dos profissionais que tive o privilégio de acompanhar, Dr. Pablo Santiago, Dr. António Benito Martín, Dr. Javier Parra e Dr. Victor Benito, pelos ensinamentos de campo e artimanhas aplicadas à Medicina Veterinária em Espécies Pecuárias, que enriqueceram significativamente a minha formação. Ao Dr. Sérgio Pereira e a toda a equipa da Azores Veterinary Practice, que me receberam da melhor maneira possível e contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e prático.

À minha família, pois no final de contas foram as vossas “notas” que me permitiram entrar e concluir a faculdade, muito obrigado por tudo. Aos amigos, e futuros colegas, que são quem mais memórias e recordações deixaram durante este percurso académico, grato por me acompanharem e fazerem crescer durante esta longa caminhada, com vocês foi mais fácil e sem dúvida mais divertido!!!

Por último, agradeço à Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT-FMV), e a todos os restantes professores e colaboradores que contribuíram para a minha formação, e pelas condições proporcionadas durante o meu desenvolvimento académico.

Resumo

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde, as doenças transmitidas por vetores correspondem a 17% das doenças infecciosas no mundo. O aparecimento e disseminação de surtos causados por arbovírus, que afetam ruminantes domésticos e selvagens, tem vindo a aumentar. Estes surtos afetam a Saúde e o Bem-Estar Animal, as diferentes economias e impõem restrições à mobilidade de pessoas e animais. Neste contexto, o aparecimento em Portugal do vírus da Doença Hemorrágica Epizootica (VDHE) reveste-se de grande importância. Os vetores responsáveis pela transmissão deste vírus são as fêmeas do género *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), igualmente importantes na transmissão de outras doenças, como a Língua Azul e Schmallenberg. O objetivo deste estudo foi detetar a presença do VDHE em amostras de insetos *Culicoides* capturados com recurso a armadilhas do tipo CDC miniatura, na região da Zebreira, Concelho de Idanha-a-Nova. Os insetos foram capturados entre setembro e novembro de 2023, foram identificados morfológicamente, tendo 19 amostras representativas dos mesmos sido utilizadas para a deteção do VDHE, através da amplificação do segmento 9 (Seg-9) pela técnica de *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*. Para estimar a extensão da infeção na região, foram, também, realizados questionários a produtores locais cujos animais apresentavam sinais clínicos compatíveis com a Doença Hemorrágica Epizootica.

Das 19 amostras analisadas, 13 resultaram positivas à presença do VDHE, enquanto 6 amostras não apresentaram amplificação. Assim, a percentagem de amostras positivas foi de 68% e a de amostras negativas de 32%. Relativamente aos questionários, as taxas de mortalidade e morbilidade obtidas (3,75% e 0,61% - 51,42%, respetivamente), estão alinhadas com a literatura.

Com o presente estudo foi possível confirmar a presença do VDHE no Concelho de Idanha-a-Nova e contribuir para aprofundar o conhecimento sobre a Doença Hemorrágica Epizootica nessa região.

Palavras-chave: Doença Hemorrágica Epizootica, *Culicoides*, epidemiologia

Abstract

According to data from the World Health Organization, vector-borne diseases account for 17% of infectious diseases worldwide. The emergence and spread of outbreaks caused by arboviruses, which affect domestic and wild ruminants, have been increasing. These outbreaks impact the health and well-being of animals, various economies, and impose movement restrictions on people and animals. In this context, the appearance of the Epizootic Hemorrhagic Disease virus (EHDV) in Portugal assumes considerable importance. The vectors responsible for transmitting this virus are females of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), which are also important in the transmission of other diseases, such as Bluetongue and Schmallenberg disease. The aim of this study was to detect the presence of EHDV in samples of *Culicoides* insects captured using miniature CDC traps, in the Zebreira region, Municipality of Idanha-a-Nova. The insects were captured between September and November 2023, with 19 representative samples being used for the detection of EHDV through Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction amplification of the Seg-9 segment. Additionally, to estimate the extent of the infection in the region, questionnaires were conducted with local producers whose animals exhibited clinical signs compatible with Epizootic Hemorrhagic Disease.

Of the 19 samples analyzed, 13 tested positive for the presence of the EHDV, while 6 samples showed no amplification. Thus, the percentage of positive samples was 68% and that of negative samples was 32%. Regarding the questionnaires, the mortality and morbidity rates obtained (3,75% and 0,61% - 51,42%) were aligned with the literature.

This study confirmed the presence of EHDV in the Municipality of Idanha-a-Nova and contributed to a better understanding of the Epizootic Hemorrhagic Disease in this region.

Keywords: Epizootic Hemorrhagic Disease, *Culicoides*, epidemiology

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AGID	Teste de Imunodifusão em Gel de Agarose, do inglês <i>Agar Gel Immunodiffusion</i>
BEA	Bem-Estar Animal
BVD	Diarreia Viral Bovina, do inglês <i>Bovine Viral Diarrhea</i>
DDO	Doença de Declaração Obrigatória
DHE	Doença Hemorrágica Epizootica
DIVA	Diferenciação entre Animais Infetados e Vacinados, do inglês <i>Differentiating Infected from Vaccinated Animals</i>
dsRNA	Ácido ribonucleico de cadeia dupla, do inglês <i>double stranded RNA</i>
EHDV	Epizootic Hemorrhagic Disease Virus
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunossorbent Assay</i>
et. al.	e colaboradores, do latim <i>et alli</i>
EUA	Estados Unidos da América
FBL	Limite de Altitude de Voo, do inglês <i>Flight Boundary Level</i>
FCM	Febre Catarral Maligna
FEB	Febre Efêmera Bovina
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
g	Força centrífuga relativa
γ	Radiação gama
IBD	Doença Inflamatória Intestinal, do inglês <i>Inflammatory Bowel Disease</i>

ITS	Espaçador Interno Transcrito Ribossômico, do inglês <i>Ribosomal Internal Transcribed Spacer</i>
km	Quilômetros
LA	Língua Azul
m	Metro
ml	Mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMSA	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRID	Dispositivo Intravaginal de Liberação de Progesterona, do inglês <i>Progesterone Release Intravaginal Device</i>
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcriptase reversa, do inglês <i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa, do inglês <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
USD	Dólar Americano, do inglês <i>United States dollar</i>
UV	Ultravioleta
V	Volts
VDHE	Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica
VDHE-1	Serótipo 1 do Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica
VDHE-2	Serótipo 2 do Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica

VDHE-4	Serótipo 4 do Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica
VDHE-5	Serótipo 5 do Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica
VDHE-6	Serótipo 6 do Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica
VDHE-7	Serótipo 7 do Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica
VDHE-8	Serótipo 8 do Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica
VLA	Vírus da Língua Azul
VVA	Vacinas Vivas Atenuadas
μl	Microlitro
>	Maior que
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

Casuística do estágio curricular: atividades desenvolvidas.....	13
Doença Hemorrágica Epizoótica – Detecção do Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica no Concelho de Idanha-a-Nova	
1. Introdução.....	19
1.1 A importância de doenças emergentes transmitidas por vetores.....	20
1.2 Doença Hemorrágica Epizoótica	23
1.3 Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica	24
1.4 O género <i>Culicoides</i>	28
1.4.1 Taxonomia dos insetos <i>Culicoides</i>	32
1.5 Distribuição dos insetos <i>Culicoides</i>	32
1.6 Ciclo de vida	34
1.7 Sazonalidade e ciclo circadiano	35
1.8 Hospedeiros do VDHE	36
1.9 Patogenia da Doença	36
1.10 Período de incubação e de virémia, morbilidade e mortalidade	38
1.11 Sinais Clínicos	38
1.12 Diagnóstico	40
1.13 Prevenção e Controlo	42
1.13.1 Vacinação	45
2. Material e Métodos	47
2.1. Localização e captura de insetos <i>Culicoides</i>	47
2.2 Identificação morfológica das amostras	49
2.3 Extração de ácidos nucleicos e quantificação.....	50
2.4 Amplificação, por PCR, de um fragmento do gene <i>ITS1</i> do género <i>Culicoides</i>	51
2.5 Detecção do VDHE por RT-PCR em tempo real	54

2.6	Questionários efetuados a produtores da região em estudo	56
3.	Resultados	57
3.1	Captura e identificação de insetos <i>Culicoides</i>	57
3.2	Amplificação, por PCR, de um fragmento da região <i>ITS1</i> do gênero <i>Culicoides</i>	57
3.3	Deteção do VDHE por RT-PCR em tempo real	58
3.4	Resultados referentes aos questionários efetuados aos produtores	59
4.	Discussão	65
5.	Conclusões	71
6.	Referências bibliográficas	72

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Atividades Clínicas / Procedimentos no primeiro período de estágio no distrito de Castelo Branco.....	15
Gráfico 2 - Atividades Clínicas / Procedimentos no segundo período de estágio na província de Salamanca.....	18
Gráfico 3 - Distribuição dos sistemas de exploração ($n=21$).....	60
Gráfico 4 – Distribuição dos animais das explorações por regime ($n=21$).....	60
Gráfico 5 – Distribuição de raças das diferentes explorações com sinais clínicos mais evidentes ($n=21$).....	62
Gráfico 6 – Presença de linhas de água nas explorações ($n=21$).....	63
Gráfico 7 - Prevalência dos sinais clínicos relatados pelos produtores nas 21 explorações.....	64

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática de uma partícula viral do VDHE (Adaptado de Jiménez-Cabello <i>et al.</i> , 2023).....	25
Figura 2 – Inseto da espécie <i>Culicoides imicola</i> (Adaptado de Ramilo, 2016).....	28
Figura 3 - Distribuição potencial prevista de <i>C. imicola</i> (Adaptado de Leta <i>et al.</i> , 2019)	33
Figura 4 – Mapa da zona afetada pela DHE em Portugal a 03/11/2023 (DGAV, 2023).....	40
Figura 5 – Município de Idanha-a-Nova (assinalado a vermelho) onde foi realizado o estudo.....	47
Figura 6 – Armadilhas do tipo CDC para captura de insetos <i>Culicoides</i> em funcionamento. A) Zona Z1 – Manga dos bovinos; B) Zona Z2 – Dentro do pavilhão; C) Zona Z3 – Figueira, junto a uma lagoa e áreas de pastagem dos bovinos (Fotos originais do autor).....	48
Figura 7 – Padrões das asas dos insetos das espécies A) <i>C. imicola</i> e B) Complexo Obsoletus (Ramilo, 2016).....	49
Figura 8 – Inseto fêmea da espécie <i>Culicoides imicola</i> (Foto original do autor).....	57
Figura 9 – Resultados da eletroforese após amplificação da região ITS1 nas amostras de insetos do género <i>Culicoides</i> (Foto original do autor).....	58
Figura 10 – Resultados da amplificação do Seg-9 na deteção do VDHE.....	59
Figura 11 - Sinais clínicos evidenciados pelos animais doentes que são compatíveis com a DHE. A) hiperemia conjuntival, rinorreia e sialorreia, B) anorexia, lesões ulcerativas e necróticas da mucosa nasal e C) pirexia, hiperemia conjuntival e nasal (Fotos originais do autor).....	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Taxonomia dos insetos <i>Culicoides</i>	32
Tabela 2 – Sequência de <i>Primers</i> usados na amplificação da região do gene ITS1.....	52
Tabela 3 – Condições da reação de PCR para a amplificação da região do gene ITS1...	53
Tabela 4 – Sequência de <i>primers</i> e sondas utilizados para detecção do VDHE.....	54,55
Tabela 5 – Condições da reação de RT-PCR em tempo real para amplificação do gene Seg-9 do VDHE.....	55
Tabela 6 – Parâmetros das explorações e características associadas aos animais afetados.....	61

Casuística do estágio curricular: atividades desenvolvidas

O Estágio Curricular de final de curso foi realizado pelo autor entre setembro de 2023 a fevereiro de 2024 (5 meses) em dois locais diferentes, ambos direcionados maioritariamente à clínica de Espécies Pecuárias, através de regime ambulatorio a diversas explorações distintas, desde extensivas a intensivas. O primeiro período de estágio ocorreu no Distrito de Castelo Branco, acompanhado pelo orientador externo Doutor Álvaro Dias Lopes, veterinário Municipal de Castelo Branco, na empresa Dicas Arrojadadas. Durante este período, foram realizadas algumas atividades relacionadas com a clínica de animais de companhia. O segundo período de estágio foi realizado na província de Salamanca, Espanha, na empresa Zootecnia, que integra também as empresas Nutrizia e Insavet S.L.P. O orientador externo que acompanhou o autor foi o Doutor Javier Velasco Diego, assim como os profissionais Doutor Pablo Santiago, Doutor Antonio Benito Martín, Doutor Javier Parra e Doutor Victor Benito. Estas três empresas direcionam-se à investigação e análises clínicas, nutrição e sanidade animal.

Primeiro período de estágio

Durante o primeiro período do estágio, de setembro a novembro de 2023 (2 meses, 450 horas), o autor acompanhou o Médico Veterinário Álvaro Dias Lopes, responsável pelo regime ambulatorio direcionado a Espécies Pecuárias, assim como a orientação do autor diariamente. Foram várias as atividades clínicas realizadas, relacionadas com o ofício Municipal, desde campanhas de vacinação antirrábica e colocação de chips a canídeos em várias localidades do distrito de Castelo Branco (6%), a captura de animais errantes para posterior esterilização e a examinação dos animais e das guias de transporte em leilões municipais de bovinos (8%).

Para além do ofício Municipal, o autor acompanhou o orientador externo num *check-up* semanal a uma vacaria, na empresa M. Rito Lda., em Idanha-a-Nova (18%). Eram efetuadas ecografias para diagnóstico de gestação, exame a vacas doentes, que apresentavam diminuição da produção de leite ou outros sinais clínicos identificados

pelos funcionários da exploração ou pelo sistema eletrónico. Foi executado o tratamento cirúrgico de um deslocamento do abomaso, através da omentopexia paracostal direita do abomaso, a colocação de "esponjas" intravaginais (PRID) embebidas em progesterona, para executar protocolos reprodutivos e posterior inseminação artificial. O autor inseminou cerca de dez vacas da raça Holstein durante este período de estágio.

A sanidade animal foi a prática clínica mais efetuada (36%), incluindo vacinações e desparasitações de ovinos e bovinos, provas de intradermotuberculinização de comparação para despiste de tuberculose, assim como verificação das mesmas, 72 horas após a inoculação. A recolha de sangue em ovinos para rastreio de brucelose foi efetuada frequentemente. Em efetivos de ovinos, a colocação de brincos e de bolos ruminais foi também efetuada com frequência. A sanidade da raça Brava de Lide fez igualmente parte das práticas clínicas, incluindo procedimentos como vacinações e desparasitações, provas de intradermotuberculinização de comparação e recolhas de sangue.

A nível reprodutivo, foram inseminadas vacas (5%) da raça Holstein, Angus, Limousine, Charolês e cruzado de carne com prévio protocolo reprodutivo, assim como exames andrológicos (5%) a machos para avaliação da função e aptidão reprodutiva. Foram também realizadas ecografias para diagnóstico de gestação em éguas.

Cirurgicamente, para além do deslocamento do abomaso já referido anteriormente, efetuou-se a correção de um prolapso uterino e a correção de um prolapso vaginal em vacas de aptidão de carne (6%).

Outros procedimentos menos comuns foram o tratamento de miíases em bovinos, realização de necrópsias em bovinos, tratamento de feridas e descornas de animais adultos com o auxílio de um cabo de aço descornador (4%).

Durante este período do estágio, ocorreu um surto da Doença Hemorrágica Epizootica (DHE) em Portugal, sendo que a região de Castelo Branco foi bastante afetada, com vários relatos de animais infetados. Ocorreram inúmeras dúvidas e questões acerca de um possível tratamento e medidas de prevenção e controlo, sendo

que a pouca informação disponível relativamente à DHE dificultou a tomada de decisão por parte dos produtores.

Foram colocadas armadilhas do tipo CDC miniatura, pelo autor, assim como identificados e separados os insetos do género *Culicoides* capturados pelas mesmas, essenciais para a realização da presente dissertação. A identificação morfológica dos insetos foi realizada na Escola Agrária de Castelo Branco (12%). O autor assistiu, igualmente, a um *webinar*, acerca da DHE, organizada pelo Governo Espanhol, que contou com inúmeros palestrantes de vários países (Espanha, Itália, Tunísia), onde casos positivos de DHE tinham ocorrido. O Gráfico 1 demonstra as atividades clínicas / procedimentos no primeiro período de estágio no distrito de Castelo Branco e arredores.

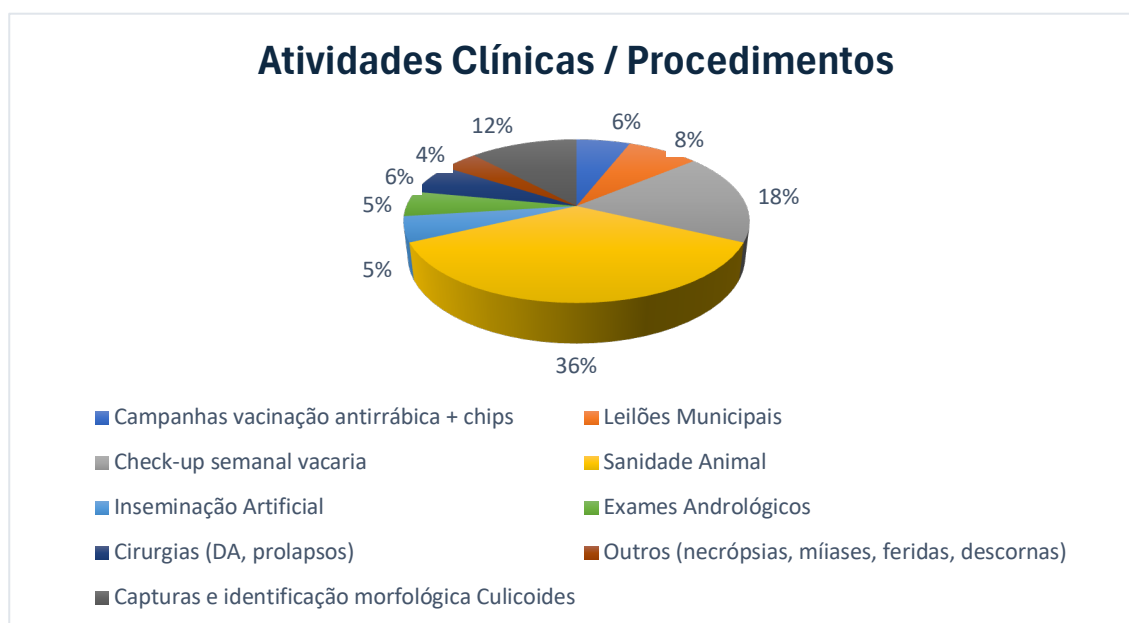


Gráfico 1: Atividades clínicas/procedimentos no primeiro período de estágio no distrito de Castelo Branco ($n = 450$ = número de horas do primeiro estágio)

Segundo período de estágio

Durante o segundo período de estágio, de novembro de 2023 a fevereiro de 2024 (3 meses, 600 horas), o acompanhamento do regime de ambulatório pelo autor era alternado entre quatro veterinários clínicos, com um quinto veterinário responsável pelo laboratório, que não praticava clínica. Cada veterinário trabalhava em dias específicos caso houvessem chamadas fora do horário laboral, tendo o autor acompanhado muitas destas saídas pós-laborais. O laboratório estava localizado na sede da empresa Zootecnia, onde o autor efetuou necropsias de ovinos e caprinos, análises coprológicas, contagem de espermatozoides, congelação de sêmen de bovinos e técnicas de PCR e ELISA para deteção de doenças (6%). Os casos foram maioritariamente discutidos na clínica ou no carro durante as deslocações às explorações.

O regime ambulatório não se destinou apenas à província de Salamanca, estendendo-se a outras províncias adjuntas, como Zamora, Valladolid, Segóvia, Ávila e Cáceres. Os veterinários visitavam semanalmente pavilhões de engorda de bovinos, distribuídos pelas províncias referidas, com o intuito de verificar o estado geral dos animais e tratar, a nível individual, os animais que os funcionários identificavam como doentes durante a semana.

Dada a zona geográfica onde o autor se encontrava a estagiar, o contacto com suínos era praticamente diário, acabando por ser o animal com que mais contactou. A prática clínica mais realizada foi a vacinação de suínos contra Mal Rubro (25%), seguido de exames andrológicos em bovinos de diversas raças (Morucho, Avilleno, Retinto, Limousine, Charolês, cruzado de carne) com recolha de raspados prepuciais para testagem dos agentes *Trichomonas foetus* e *Campylobacter foetus* (21%). As ecografias para diagnóstico de gestação em suínos foram frequentes (9%), assim como a vacinação oral em leitões. A classificação oficial de porcas ibéricas através de um brinco colocado na orelha dos animais fez também parte do estágio. Foi igualmente efetuada a análise de *Trichinella spiralis* auxiliada por uma lupa, a amostras retiradas dos pilares do diafragma e dos masséteres de suínos que foram sacrificados domesticamente.

O suporte através de fluidoterapia e complexo vitamínico B a vitelos recém-nascidos, que apresentavam diarreias e desidratação, foi uma prática bastante realizada (14%), pois os produtores não hesitavam em chamar um Médico Veterinário quando notavam os animais debilitados.

O saneamento de efetivos de bovinos e ovinos (8%) através da vacinação e desparasitação, foi realizado, tendo o autor estado em contacto com várias raças autóctones bovinas da região, nomeadamente as raças Morucha, Avileña e Retinta. Foi efetuada a vacinação e desparasitação da Raça Brave de Lide de diferentes ganadarias Espanholas. Foram colocados brincos e bolos ruminais a rebanhos de ovinos e efetuadas várias necropsias em suínos e bovinos. Procedeu-se à recolha de fezes para identificação dos agentes causadores de diarreia em vitelos (2%) e à drenagem de abscessos a um lote de bovinos (cerca de 20), provavelmente por alguma falha de boas práticas de vacinação dos animais.

A nível de reprodução de bovinos, foram executados protocolos reprodutivos para sincronização de vacas e posteriores inseminações artificiais. A transferência de embriões foi também realizada. Adiciona-se a esta lista ecografias para diagnóstico de gestação (6%).

O autor realizou procedimentos clínicos na área de podologia em machos bovinos (3%), incluindo a sedação e posterior correção das úngulas, que impediam uma deslocação normal dos animais, afetando diretamente a aptidão reprodutiva dos mesmos. Durante este procedimento, foram encontradas várias hemorragias internamente na sola, provavelmente relacionadas com a DHE. Foram recebidas muitas chamadas para visitar touros com claudicação de origem idiopática.

A nível cirúrgico, efetuou-se a correção cirúrgica de um prolapso retal de um suíno, a correção cirúrgica de um prolapso uterino de uma vaca, uma cesariana a uma vaca e intervenções em partos através de manobras obstétricas, três em vacas de raça Holstein, outros três em vacas de raça Limousine, um numa vaca de raça Morucha e outro numa vaca de raça Charolesa, incluindo uma episiotomia em dois animais e uma cefalotomia noutro animal (3%).

Algumas vacas foram também tratadas para o timpanismo, o que é possível devido à época do ano e à quantidade de bolotas disponíveis, dado que é uma área principalmente constituída por azinheiras (3%).

Outras práticas também realizadas, não tão comuns, foram a vacinação antirrábica de canídeos, tratamento de feridas e cortes em bovinos, o tratamento de uma cabra com toxemia de gestação e o abate de emergência de quatro vacas. Foram também encontrados nesta região possíveis casos da DHE em bovinos, sendo que na província de Salamanca foram detetados vários casos positivos desta doença, o primeiro a 7 de agosto de 2023. O Gráfico 2 demonstra as atividades clínicas / procedimentos no segundo período de estágio na província de Salamanca e arredores.



Gráfico 2: Atividades clínicas/procedimentos no segundo período de estágio na província de Salamanca ($n = 600$ = número de horas do segundo estágio)

Doença Hemorrágica Epizootica – Detecção do Vírus da Doença Hemorrágica Epizootica no Concelho de Idanha-a-Nova

1. Introdução

A Língua Azul, a Febre do Vale do Rift, Doença de Schmallenberg, a Dermatose Nodular Contagiosa, a Febre Efémera Bovina, Dengue, a Malária e a Febre Amarela são exemplos de doenças transmitidas por vetores artrópodes, à semelhança da Doença Hemorrágica Epizootica (DHE). Certos fatores antropogénicos, tais como a globalização comercial, assente num mercado internacional de transporte facilitado, viagens intercontinentais, transporte e movimentação de animais entre longas distâncias e as alterações climáticas, podem aumentar o risco de ocorrência de doenças virais, como é o caso da DHE (Hendrickx *et al.*, 2008). Estes fatores, principalmente o aquecimento da temperatura média da Terra, são diretamente influenciados por atividades antropogénicas que resultam na libertação de gases com efeitos de estufa (Lee *et al.* 2023). O aquecimento tem implicações a longo termo, ao gerar ambientes e condições favoráveis à sobrevivência de organismos em áreas geográficas não endémicas, como é o caso de Portugal. Estes surtos provocam um impacto negativo devido à expansão contínua destas doenças para áreas onde não existiam, acabando por afetar a Saúde e o Bem-Estar Animal (BEA), e a economia interna. A DHE é classificada como doença emergente e, para além das questões sociais e de BEA, pode causar graves complicações económicas locais, regionais e nacionais, assim como restrições ao movimento dos animais (Jiménez-Cabello, Ultrilla-Trigo, Lorenzo, Ortego & Calvo-Pinilla, 2023).

Os hospedeiros da DHE são principalmente ruminantes domésticos e selvagens, incluindo bovinos, várias raças de cervídeos, como o veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), ovinos e caprinos (Duan *et al.*, 2022), sendo a mesma transmitida por insetos do género *Culicoides* (Purse *et al.*, 2015). O vírus já foi isolado na América do Norte e do Sul, África, Médio Oriente, Ásia, Oceânia e, mais recentemente, na Europa, sendo a Antártida o único continente sem relatos até à data. Foi detetado pela primeira vez nos EUA em 1955, num surto que causou uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade em veados de cauda branca. Existem vários serótipos dispersos por todo o mundo, incluindo nos países que contactam com a bacia

mediterrânea, tais como Marrocos, Argélia, Líbia, Tunísia, Egito e Israel. Como a maior parte das infecções em ruminantes são inaparentes, pensava-se inicialmente que a DHE apenas causava sinais clínicos subagudos em gado e que era mais severa em certas raças de veados. Contudo, o surto que ocorreu no Japão em 1959, convencionalmente conhecido como vírus Ibaraki, tratando-se do serótipo 2 do vírus da Doença Hemorrágica Epizootica (VDHE), teve um impacto económico bastante significativo, que resultou na infecção de 30 076 animais, e na morte de cerca de 4 023 (Mellor, Boorman & Baylis, 2000; Inaba, 1975).

O primeiro caso do surto que ocorreu no continente europeu foi reportado a 25 de outubro de 2022 na Sicília, Itália, propagando-se rapidamente pelo Sul da Europa, auxiliado pelos ventos provenientes do norte de África. São oito os serótipos conhecidos do VDHE (World Organization for Animal Health [OMSA], 2021; Thabet *et al.*, 2023); porém, o serótipo identificado neste primeiro surto foi o 8, o mesmo responsável pelo surto ocorrido na Tunísia em 2021 (Sghaier *et al.*, 2022), o que coincide com a literatura pois o vírus tem tendência a avançar para Norte (Gao *et al.*, 2022).

A prevenção e controlo da doença torna-se muito difícil, sendo a implementação de campanhas de vacinação a única medida de prevenção que apresenta bons resultados a nível de controlo da DHE. As populações de larvas do género *Culicoides* podem ser controladas através de inseticidas de nova geração, com várias propriedades benéficas, provenientes da árvore *Azadirachta indica*. Vários estudos identificaram as características inseticidas das substâncias extraídas dos frutos e sementes desta árvore.

1.1 A importância de doenças emergentes transmitidas por vetores

Doenças emergentes são aquelas recentemente identificadas ou que evoluíram após um surto prévio, em novas áreas geográficas ou populações, com impacto significativo na saúde animal ou pública (OMSA, 2021). As mudanças constantes nos fatores demográficos, ecológicos e antropogénicos asseguram que novas doenças e doenças recorrentes continuem a emergir. O aquecimento da Terra que estamos a

enfrentar é diretamente influenciado por estas atividades antropogénicas, tais como a libertação de gases com efeitos de estufa (Tabachnick, 2010). Este aquecimento vai ter implicações a longo termo no que toca à prevenção e controlo de doenças transmitidas por vetores.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças transmitidas por vetores correspondem a 17% das doenças infecciosas no mundo (OMS, 2020). Diversos fatores contribuem significativamente para a introdução, estabelecimento e disseminação de agentes patogénicos transmitidos por artrópodes, incluindo a globalização comercial, o transporte internacional facilitado e as alterações climáticas (Hendrickx *et al.*, 2008).

As alterações climáticas têm um impacto profundo nos vetores artrópodes, alterando os seus padrões de distribuição e a sua capacidade de transmitir agentes patogénicos (Tabachnick, 2010). Estas afetam significativamente a atividade dos artrópodes, pois contribuem para que a expansão arboviral exceda os seus limites atuais (Rockløy & Dubrow, 2020; Whitehorn & Yacoub, 2019; Federici *et al.*, 2016). A transmissão arboviral de um hospedeiro infetado para um suscetível requer condições ambientais favoráveis tanto para o vetor quanto para o vírus, bem como para o hospedeiro vertebrado, sendo que cada indivíduo pode ser influenciado por condições ambientais muito particulares (MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011).

O transporte de animais também acelera a propagação de doenças transmitidas por vetores artrópodes, como os arbovírus, pelo que são implementadas restrições de movimento dos animais quando ocorrem estes surtos. Estas imposições impedem a venda dos animais e afetam os produtores (A.J. Wilson & Mellor, 2009), resultando em perdas económicas importantes, tanto diretas como indiretas (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023).

As infeções causadas são tipicamente sazonais, ocorrendo principalmente quando as populações de insetos *Culicoides* atingem o pico, num período temporal que decorre do Verão até ao fim do Outono. Temperaturas mais elevadas reduzem o tempo de desenvolvimento dos quatro estágios larvais, permitindo que as pupas se formem mais rapidamente. A velocidade da replicação viral, a virogénese e o período de incubação extrínseca também vão ser mais rápidas, o que faz otimizar a transmissão

do vírus (Mayo *et al.*, 2020). Estas temperaturas mais altas conduzem a sazonalidades prolongadas no que diz respeito ao ciclo de vida dos insetos e surtos de maior intensidade (Hudson *et al.*, 2023).

É expectável que os insetos apresentem uma resposta significativa às alterações climáticas, uma vez que a duração do seu ciclo de vida é fortemente influenciada pela temperatura (R.J. Wilson & Maclean, 2011; Mellor *et al.*, 2000).

A proximidade geográfica da Tunísia com a Europa representa um risco claro para a disseminação do vírus (Sghaier *et al.*, 2022). O Vírus da Doença Hemorrágica Epizootica (VDHE) e o Vírus da Língua Azul (VDA) possuem um nicho ecológico idêntico, com disseminação de populações de *Culicoides* para a Europa oriundas do Norte de África através de tempestades de areia (Sghaier *et al.*, 2022). A vigilância é crucial para mitigar a disseminação da doença entre continentes. O vento altera a direção dos insetos e a área abrangida pelos mesmos (Pedgley, D. E. 1983). Em vários casos, o transporte passivo dos vetores ao longo de grandes distâncias é facilitado pelos ventos predominantes, resultando na disseminação de insetos infetados provenientes da região de origem, que podem viajar por mais de 100 km (Ducheyne *et al.*, 2007). Este fenómeno de transporte passivo dos vetores é um dos principais mecanismos de propagação da doença, permitindo a sua rápida disseminação e afetando múltiplas regiões. Foi demonstrado que a disseminação de insetos através de ventos marítimos (*overseas*) chegou a distâncias de 700km (Ducheyne *et al.*, 2007). O movimento de longa distância dos insetos é mais eficiente se forem utilizados os ventos rápidos acima da *Flight Boundary Level* (FBL) do inseto (Drake & Farrow, 1988), isto é, o limite de altitude até onde os *Culicoides* conseguem voar e estar presentes na atmosfera.

A colonização europeia do continente africano está cheia de exemplos de doenças transmitidas por arbovírus, que resultaram da introdução de gado europeu suscetível nesse continente. A Peste Suína Africana, a Peste Equina Africana, a Febre do Vale do Rift e a Língua Azul são alguns dos exemplos.

As fêmeas *Culicoides* desempenham um papel crucial na propagação de *Orbivirus*, atuando como vetores responsáveis pela disseminação de doenças com relevância bastante significativa a nível da saúde pública e da saúde veterinária. Entre as doenças transmitidas por estes insetos, destacam-se o vírus Akabane, a Doença

Hemorrágica Epizoótica, a Peste Equina Africana, a Língua Azul e a doença de Schmallerberg. São vários os estudos corroboram a relevância destes insetos como agentes transmissores destas patologias anteriores (De Regge *et al.*, 2015; Purse, Carpenter, Venter, Bellis & Mullens, 2015; Carpenter, Groschup, Garros, Felipe-Bauer & Purse, 2013; Mellor *et al.*, 2000).

1.2 Doença Hemorrágica Epizoótica

A DHE é uma doença infecciosa não contagiosa causada pelo VDHE. É uma doença emergente, que foi classificada como doença de declaração obrigatória pela OMSA em maio de 2008 (OMSA, 2019). É uma doença que possui bastante interesse económico devido às perdas resultantes da morte dos animais, pela diminuição da produção que é causada em populações nativas suscetíveis, e pelas restrições impostas aos países afetados, onde é proibida a circulação de animais, óvulos e sêmen (Savini *et al.*, 2011).

A transmissão é efetuada por insetos do género *Culicoides* e afeta ruminantes selvagens e domésticos, sendo que o vírus se transmite entre estes hospedeiros (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023). A maior parte das infeções em ruminantes são inaparentes e são mais severas em certas raças de veados, podendo ser indistinguível da Língua Azul (LA) (Mellor *et al.*, 2000); só através de testes como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Agar Gel Immunodiffusion* (AGID) e *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) é que é possível distinguir as duas doenças. Foi reportada a transmissão via fecal-oral em veados de cauda branca (Gaydos *et al.*, 2002) e a transmissão transplacentar foi demonstrada pelo isolamento do serotipo 2 (VDHE-2) de órgãos internos de fetos de bovinos abortados (Ohashi, Yoshida, Watanabe & Tsuda, 1999).

Com a ocorrência dos recentes surtos na Europa, a DHE encontra-se espalhada por todos os continentes, exceto na Antártida. Durante um longo período, era considerada uma doença grave que afetava apenas cervídeos, até que surtos subsequentes que envolveram o vírus Ibaraki (VDHE-2) afetaram gado bovino no Japão. Só recentemente, com o decorrer dos surtos de DHE no Norte de África

(VDHE-6, -7 e -8), no Médio Oriente (VDHE-1, -2, -4, -5, -6 e -7), e na Europa (VDHE-8) é que a DHE foi incluída na lista de doenças que afetam bovinos (Sghaier *et al.*, 2022; Savini *et al.*, 2011; EFSA, 2008).

A 25 de outubro de 2022 foram reportados os primeiros casos na Europa, em Sicília, Itália, mais especificamente perto da cidade de Trapani, tal como refere um estudo realizado por Alessio Lorusso *et al.* (2023). Em 2006-2007, foram descritos surtos da DHE causados pelos serótipos 6 e 7 em países que fazem fronteira com a bacia Mediterrânea, tais como Marrocos, Argélia, Tunísia, Israel, Jordânia e Turquia (Sghaier *et al.*, 2022; OMSA, 2019; Temizel *et al.*, 2009; Yadin *et al.*, 2008).

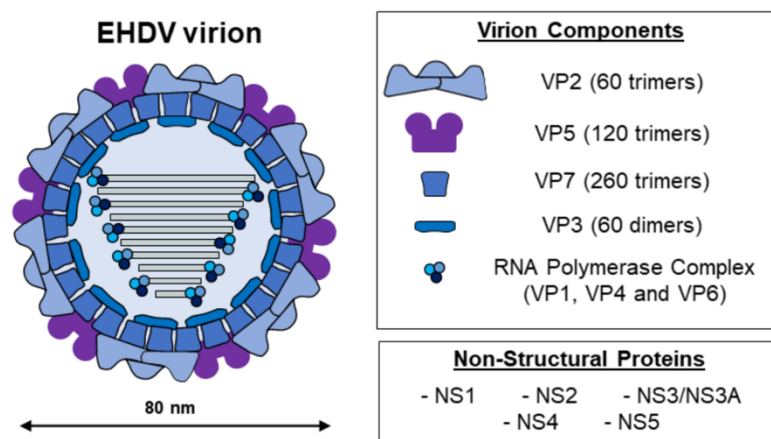
As manifestações clínicas da DHE são idênticas às causadas pelo vírus da Língua Azul, dado que ambas apresentam semelhanças (Savini *et al.*, 2011), incluindo edema da conjuntiva, edema das mucosas orais, nasais e da região rostral (Alessandro Lorusso *et al.*, 2023; Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007). Em alguns casos reportados da DHE, erosões e ulcerações que se desenvolvem a nível dos cascos acabam por levar a claudicações nos animais, podendo a língua ficar edematosa, o que se assemelha às características clínicas da LA. Apesar da epidemiologia e da distribuição global do vírus da LA e do vírus da DHE serem idênticas, as infeções pelo VDHE foram menos estudadas, porque apresentam menor significância para a agricultura animal comparando com o VLA, particularmente no que toca à movimentação de animais provenientes de zonas infetadas com o VLA (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023).

1.3 Vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica

O vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica pertence à família *Reoviridae*, que é uma das mais complexas em toda a virologia, devido à sua diversidade genómica, ampla gama de hospedeiros e patologias, ciclo de replicação complexo, e diferentes interações com o sistema imunitário. Pertence igualmente ao género *Orbivirus*, e as partículas virais não apresentam invólucro. Os vírus que compõem esta família infetam uma grande variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, pássaros, répteis,

anfíbios, peixes, moluscos, crustáceos, insetos, plantas e fungos. O VDHE apresenta, a nível imunológico, reatividade cruzada com o VLA (OMS, 2021).

O genoma do VDHE compreende 10 segmentos lineares de cadeia dupla (bicatenário) de RNA (dsRNA), que codificam sete proteínas estruturais (VP1-VP7) e quatro não estruturais (NS1, NS2, NS3/NS3A, NS4) (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023). Encontra-se rodeado por uma cápside proteica icosaédrica de três camadas. A cápside proteica exterior (VP2) é o determinante primário da especificidade do serótipo, assim como acontece no VLA. A outra proteína exterior, a VP5, é indutora da produção de anticorpos neutralizantes (Thabet *et al.*, 2023; Anthony *et al.*, 2009). Na Figura 1 é possível visualizar uma representação esquemática de uma partícula viral do VDHE.



A partícula viral apresenta cerca de 80 nm de diâmetro. A cápside externa é constituída pelas proteínas VP2 e VP5; a cápside intermédia é composta pelas proteínas VP3 e VP7; a cápside interna contém o complexo RNA polimerase, que é composto pelas proteínas estruturais VP1, VP4 e VP6. São expressas durante o ciclo replicativo pelo menos quatro proteínas não estruturais (NS1, NS2, NS3/NS3A, NS4 e NS5).

Figura 1 – Representação esquemática de uma partícula viral do VDHE
(Adaptado de Jiménez-Cabello *et al.*, 2023)

Com base em testes de neutralização cruzada e análises genéticas das sequências nucleotídicas do segmento 2 do vírus, foram identificados oito serótipos e dois serótipos putativos do VDHE (Thabet *et al.*, 2023; OMSA, 2021), existindo alguma incerteza em relação ao número exato de serótipos (OMSA, 2021). O serótipo 8 foi o responsável por causar os surtos no continente europeu no final de 2023. Os serótipos VDHE-6 e VDHE-7 eram considerados não patogénicos, mas em surtos recentes foram capazes de causar doença no gado, assim como grandes perdas económicas, especialmente em explorações destinadas à produção de leite (Savini *et al.*, 2011). Os serótipos que se encontram reportados como patogénicos, traduzindo-se em sinais clínicos severos em gado, são as estirpes virais Ibaraki (VDHE-2), 318 (VDHE-6), Israelita (VDHE-7) (Savini *et al.*, 2011) e o VDHE-8 (Thabet *et al.*, 2023).

Como existe pouca informação acerca da relação entre serótipos individuais, a classificação dos mesmos torna-se um desafio. Estudos que foram surgindo desde a primeira identificação do vírus em 1955, demonstraram que serótipos diferentes são semelhantes, como é o caso do serótipo 3 em relação ao serótipo 1, pelo que agora pertencem ao mesmo. Outro exemplo é a estirpe responsável pelos surtos no Norte de África e Turquia (VDHE-318), idêntica serologicamente à VDHE-6 (Anthony *et al.*, 2009). O vírus Ibaraki, identificado pela primeira vez no Japão em 1959, causador de surtos esporádicos em gado na Ásia, é agora considerado um membro do VDHE-2 (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023), e partilha epítomos de reação cruzada com outras estirpes e serótipos da DHE (Pereira, Nishida, Tokunaga, Iwata & Inoue, 2000). A infeção com um serótipo particular do VDHE confere proteção contra o serótipo homólogo. Em 1960, a morbilidade e mortalidade causada pelo vírus Ibaraki foi muito menor que aquela reportada em 1959 pois muitos animais tinham anticorpos contra o vírus (Omori *et al.*, 1969). A duração desta proteção é desconhecida, mas é sugerido que dure uma vida inteira (Stallknecht *et al.*, 1991). As investigações demonstraram também relações de neutralização cruzada entre serótipos, o que é uma informação importante para o desenvolvimento de vacinas (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023).

O vírus que afetou o continente europeu teve a sua origem a partir do Norte de África, sendo o seu genoma idêntico ao serótipo 8 detetado num surto na Tunísia em 2021 (sequência nucleotídica idêntica em mais de 99,9%) (Alessio Lorusso *et al.*,

2023). A identificação do vírus em Portugal levou a restrições de movimento dos animais num raio de 150 km dos locais onde ocorreram os surtos. A incursão do VDHE na Europa era previsível, dado a ocorrência do surto na Tunísia em 2021 e a proximidade que este país apresenta em relação aos países vizinhos europeus (Alessio Lorusso *et al.*, 2023). A 18 de novembro de 2022, a DHE foi reportada na comunidade autónoma de Andaluzia, nas províncias de Cadiz e Sevilha que integram esta comunidade. Estes eventos enfatizam a importância das autoridades europeias colaborarem com as autoridades do Norte de África no que toca à saúde pública e saúde veterinária (Alessio Lorusso *et al.*, 2023).

O número de estirpes virais continua a aumentar a nível individual para cada vírus, devido à sua capacidade de mutação e recombinação genética, por ser um vírus do tipo RNA (Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011). A importância desta diversidade genética é que estirpes específicas dentro do mesmo vírus possuem propriedades biológicas muito diferentes, incluindo a virulência, os hospedeiros e o tropismo para diferentes tecidos (Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011). Para compreendermos o surgimento de novas doenças virais, devemos efetuar uma apreciação da genética e da evolução viral.

Assim que um vírus ou um novo serótipo do vírus emerge numa região/exploração, ocorre um padrão cíclico em que o vírus pode desaparecer por um certo período, mas volta a reaparecer na mesma exploração alguns anos depois (Behar *et al.*, 2022). Cada exploração funciona como um nicho ecológico, que fornece um ambiente propício para diferentes serótipos de vírus segmentados, tais como o VDHE e o VLA, para trocarem de segmentos do seu genoma e criarem oportunidades de restabelecimento, fazendo com que estes vírus evoluam rapidamente e se adaptem às condições locais. Como o vírus já se encontra disseminado por diversas regiões do globo, implica que futuramente, a propagação do vírus por vários países, seja provável (Behar *et al.*, 2022).

O vírus é bastante instável a altas temperaturas, sendo inativado através do binómio tempo/temperatura 50 °C durante 3 horas ou a 60 °C durante 15 minutos (OMS, 2021). É sensível a pH inferior a 6 e superior a 8, e resistente a solventes lipídicos como o éter e o clorofórmio. É também inativado quimicamente por etanol a

95%, beta-propiolactona, glutaraldeído a 2%, ácidos, bases como hidróxido de sódio a 2%, hipoclorito de sódio 2-3%, iodóforos e compostos fenólicos; porém, é muito estável em sangue e tecidos a temperaturas de 20, 4 e -70 °C (OMS, 2021) e resistente a radiação UV e γ (Savini *et al.*, 2011).

1.4 O género *Culicoides*

Os insetos do género *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) estão distribuídos mundialmente, com mais de 1400 espécies identificadas (Borkent & Dominiak, 2020; Mellor *et al.*, 2000). Pelo menos 64 destas espécies encontram-se presentes na Europa (Ramilo, 2016; Martínez-de la Puente, Figuerola & Soriguer, 2015), sendo que com o decorrer do tempo e realização de novos estudos este número poderá vir a aumentar. Já foram isolados mais de 50 vírus em insetos *Culicoides* (Mellor *et al.*, 2000). Estes insetos apresentam um tamanho pequeno, variável entre 1,5 e 3mm de comprimento (Mellor *et al.*, 2000). Cada inseto apresenta um padrão nas asas que é composto por manchas brancas e cinzentas, característicos de algumas espécies, resultantes da distribuição e densidade de pequenos e grandes pelos na superfície das asas (Ramilo, 2016). Contudo, existem padrões sobreponíveis entre indivíduos de espécies próximas (Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011). Na Figura 2 é possível visualizar um inseto da espécie *Culicoides imicola* com o seu padrão nas asas característico.



Figura 2 – Inseto da espécie *Culicoides imicola* (Adaptado de Ramilo, 2016)

Ambos os sexos se alimentam de néctar, mas apenas as fêmeas são hematófagas, ou seja, alimentam-se de sangue de uma variedade de espécies de vertebrados para que seja possível reproduzirem-se, apresentando muitas vezes preferências claras por mamíferos ou aves (Martínez-de la Puente *et al.*, 2015). As fêmeas que possuem o abdómen com sangue permitem identificar a origem deste, o que nos vai dar informações sobre os padrões de alimentação dos insetos (Martínez-de la Puente *et al.*, 2015).

Os insetos *Culicoides* transmitem diversos agentes patogénicos incluindo vírus, bactérias, protozoários e filarídeos (Rádrová *et al.*, 2016). Possuem hábitos crepusculares e noturnos, sendo constituídos por peças bucais curtas, pelo que preferem picar em zonas de pele mais finas tais como a cara, as orelhas, zona inguinal e zona posterior do abdómen (Mellor *et al.*, 2000). Das várias espécies de *Culicoides* citadas na Península Ibérica, apenas algumas possuem competência vetorial, entre elas *Culicoides imicola*, as espécies do grupo *Obsoletus* e as espécies do grupo *Pulicaris*. A espécie *C. imicola* e as espécies do grupo *Obsoletus* são as mais abundantes em Portugal e apresentam uma ampla distribuição (Ramilo, 2016; Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011).

Os insetos *Culicoides* são animais ectotérmicos, sendo o seu metabolismo dependente da temperatura ambiente, que influencia a atividade de alimentação e reprodutora, assim como a multiplicação de agentes patogénicos no seu interior. Por conseguinte, são mais ativos a temperaturas entre os 10 °C e os 35 °C, e para conseguirem sobreviver ao transporte pelos ventos acima da FBL, os ventos devem ser quentes, entre 15 e 20 °C durante a noite ou entre 20 °C a 40 °C durante o dia (Braverman & Chechik, 1996).

As alterações climáticas favorecem a sobrevivência dos insetos, nas estações mais frias (outono e inverno) graças ao aumento das temperaturas, o que faz com que o vírus permaneça nas glândulas salivares, atuando como reservatórios do vírus durante estas estações. A este fenómeno dá-se o nome de *overwintering* e é particularmente relevante neste contexto, uma vez que os vetores podem manter o vírus ativo durante o inverno, garantindo a sua reemergência na primavera seguinte,

favorecendo a propagação do VDHE nas primeiras picadas (Foxi *et al.*, 2016; Mellor *et al.*, 2000) em áreas onde tradicionalmente as temperaturas mais baixas limitariam a atividade vetorial. O aumento das temperaturas permitiu que estes insetos ocupassem e colonizassem zonas que antes não eram capazes.

A espécie *Culicoides imicola* está mais adaptada a condições tropicais, preferindo zonas de sol com escassa vegetação arbórea, como pastos e parques constituídos por matéria orgânica. Há estudos que indicam que *C. imicola* é exofílico nos seus hábitos alimentares, apresentando alguma relutância em entrar em edifícios (Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011). A precipitação foi um fator importante num estudo realizado por Meiswinkel (1997), que demonstra o requisito da espécie *C. imicola* utilizar sólidos húmidos com matéria orgânica para se reproduzir. Já os insetos *Culicoides* do grupo *Obsoletus* preferem zonas arborizadas ou com arbustos. Podem alojar-se dentro de edifícios/instalações, no local onde se armazena a alimentação e os dejetos dos animais, por exemplo, e em locais perto dos hospedeiros para que consigam alimentar-se de sangue e realizar a oviposição. O grupo *Obsoletus* é um conjunto de espécies crípticas, que incluem *Culicoides chiopterus*, *Culicoides dewulfi*, *Culicoides obsoletus*, *Culicoides scoticus* e *Culicoides montanus*, sendo as fêmeas das últimas três espécies praticamente indistinguíveis morfologicamente (complexo *Obsoletus*), sendo mais facilmente identificadas com recurso à biologia molecular (Ramilo, 2016; Gomulski, Meiswinkel, Delécolle, Goffredo & Gasperi, 2005).

Estas espécies de *Culicoides* encontram-se amplamente distribuídas e são abundantes por toda a Europa Central e do Norte. Várias espécies de *Culicoides* foram incriminadas como sendo vetores do VDHE em áreas endémicas, incluindo *C. imicola* (Savini *et al.*, 2011). Em Itália, amostras coletadas a campo de *C. obsoletus* e *C. scoticus*, mostram que estas espécies também são suscetíveis à infeção com VDHE (Federici *et al.*, 2016). Neste mesmo estudo realizado por Federici *et al.* (2016) é avaliada a suscetibilidade oral dos insetos *Culicoides* ao VDHE em condições laboratoriais.

Num programa de vigilância entomológica efetuado em Portugal, que estudou a distribuição espacial e temporal de *Culicoides* ao longo de 7 anos, entre 2005 e 2012, a espécie *C. imicola*, seguida daquelas pertencentes ao complexo *Obsoletus*,

foram as mais capturadas e as mais prevalentes. Assim sendo, elas são consideradas as espécies mais prováveis de transmitir o VLA em Portugal (Ribeiro *et al.*, 2015), o que pode ser idêntico para o VDHE. A maior abundância de *C. imicola* registada na região sul de Portugal deve-se provavelmente à preferência desta espécie para se reproduzir em áreas onde o solo é húmido e cheio de nutrientes e com bastante exposição à luz solar, características que correspondem às regiões centro e sul de Portugal. Por outro lado, o grupo *Obsoletus* é menos dependente do tipo de solo (European Food Safety Authority Journal (EFSA) (2008)). A atividade contínua dos insetos *Culicoides* adultos durante todo o ano no centro de Portugal (Ramilo, 2016), pode facilitar a persistência da DHE enquanto a temperatura for adequada para a replicação do vírus ou se a sobrevivência dos adultos se der durante períodos frios, o que permite a sobrevivência de vetores infetados (Takamatsu *et al.*, 2003). Uma região no centro do país, Idanha-a-Nova, mereceu particular atenção durante o estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2015), pois registou capturas volumosas e contínuas de *C. imicola*, tendo esta espécie demonstrado atividade durante todo o ano.

Atividades de investigação entomológicas realizadas a campo em Itália por Quaglia *et al.* (2023) permitiram a deteção do serotipo VDHE-8 em *pools* de fêmeas das espécies *C. imicola*, *C. obsoletus/scoticus*, *C. newsteadi*, *C. pulicaris* e *C. bysta* que apresentavam sangue no abdómen, demonstrando, igualmente, que elas foram capazes de transmitir o VDHE. A distribuição de *C. imicola*, assim como as espécies dos complexos *Obsoletus* e *Pulicaris* em maior parte do território europeu (Federici *et al.*, 2016; Conte, Goffredo, Ippoliti & Meiswinkel, 2007) confirmam que a Europa está bastante predisposta à disseminação do serótipo 8 do VDHE, dado que os vetores são abundantes, o clima é apropriado e existem hospedeiros disponíveis (Quaglia *et al.*, 2023).

Em certos *pools* de *C. imicola* foram encontrados o VDHE e VLA em simultâneo (Quaglia *et al.*, 2023). Concluiu-se que o serótipo 8 do VDHE partilha os mesmos padrões de transmissão do VLA, o que torna possível a sua transmissão na Europa (Alessio Lorusso *et al.*, 2023; Quaglia *et al.*, 2023).

1.4.1 Taxonomia dos insetos *Culicoides*

De acordo com o *website* da Fauna Europaea (2024), a classificação dos insetos *Culicoides* está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Taxonomia dos insetos *Culicoides*

Reino	Animalia
Subreino	Eumetazoa
Filo	Arthropoda
Subfilo	Hexapoda
Classe	Insecta
Ordem	Diptera
Subordem	Nematocera
Infraordem	Culicomorpha
Superfamília	Chironomoidea
Família	Ceratopogonidae
Subfamília	Ceratopogoninae
Tribo	Culicoidini
Gênero	<i>Culicoides</i>

1.5 Distribuição dos insetos *Culicoides*

A distribuição dos insetos *Culicoides* é afetada por vários fatores abióticos (média anual da temperatura mais alta e mais baixa, média anual de precipitação, radiação solar, velocidade do vento, tipo de terreno) e bióticos (como a distribuição do gado) (Leta *et al.*, 2019). Esta distribuição geográfica está limitada diretamente com a temperatura, sendo as temperaturas anuais máximas e mínimas os maiores determinantes. Os insetos *Culicoides* apresentam baixa tolerância a temperaturas frias, pelo que a sua distribuição e abundância está diretamente relacionada com este fator (Leta *et al.*, 2019; Wittmann & Baylis, 2000). A radiação solar e a precipitação também são dois fatores importantes relativos à distribuição dos insetos (Leta *et al.*, 2019).

De acordo com Purse *et al.* (2015), as zonas que apresentam uma maior abundância de *Culicoides* combinam vários fatores abióticos e bióticos, que incluem os hospedeiros, o tipo de terreno e o clima. As características dos terrenos favoráveis

para os insetos são terras agrícolas de sequeiro, terrenos agrícolas de policulturas, e terrenos com vegetação (mato/florestas).

Num cenário futuro, é expectável que o habitat adequado para *C. imicola* se desloque para latitudes mais a norte (Pirbright & Surrey, 1997). Consequentemente, é provável que o vírus se expanda para regiões nórdicas, colocando em risco países como a Noruega, Suécia, Finlândia e Península de Kola (Gao *et al.*, 2021).

Na Europa, sabe-se que a espécie *C. imicola* se distribui, para além de Portugal, ao longo da costa Mediterrânea, em países como Espanha, França, Itália, Croácia, Albânia, Grécia, Turquia e Chipre (Leta *et al.*, 2019). Na Figura 3 é possível observar a distribuição prevista de insetos da espécie *Culicoides imicola* para o ano de 2019, onde se verifica que os países em contacto com a bacia Mediterrânea, como Portugal e Espanha, possuíam uma elevada adequação ambiental para a presença da espécie (Leta *et al.*, 2019).

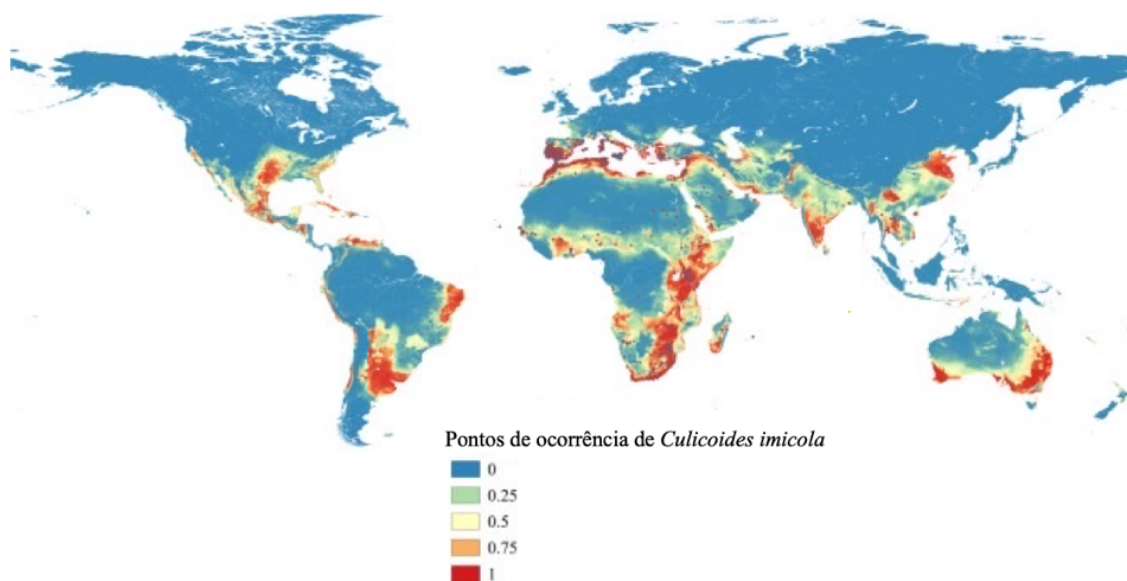


Figura 3 – Distribuição potencial prevista de *C. imicola* (Adaptado de Leta *et. al.*, 2019)

1.6 Ciclo de vida

O ciclo de vida dos insetos *Culicoides* compreende a fase de ovo, 4 fases larvares, uma fase de pupa e uma de adulto (Mellor *et al.*, 2000). Os habitats das larvas do género *Culicoides* são aquáticos ou semi-aquáticos, incluindo pântanos e turfeiras, com uma alta gama de salinidade e acidez da água. Locais como drenos de água (Braverman & Chechik, 1996), lagoas de água salobra, margens de riachos e lagos salgados (Chaker E., 1981) são alguns exemplos de habitat.

As fêmeas de espécies com interesse veterinário geralmente alimentam-se do sangue de bovinos e equinos e reproduzem-se em habitats associados, como serapilheira, estrume e lama enriquecida organicamente (Leta *et al.*, 2019). As fêmeas adultas vão efetuar a oviposição em substratos desta lama enriquecida, pois a humidade e a nutrição são cruciais para o crescimento e desenvolvimento das fases larvais (Kettle, 1997). Nos meses mais quentes, as linhas de água vão diminuindo e os insetos têm nessas zonas um local ideal para se reproduzirem.

As larvas de *C. imicola* vivem na camada superficial do solo, enterradas a poucos centímetros de profundidade em zonas de lama mais seca. Em lagos e charcas artificiais, estas são encontradas nos primeiros 50 cm acima da linha de água (Foxi & Delrio, 2010). Isto corrobora as observações realizadas por Nevill (1967) que refere que as larvas não possuem a capacidade de flutuar na superfície da água e acabam por se afogar quando ocorre uma inundação do habitat.

Por outro lado, as larvas de *C. obsoletus* e *C. scoticus* preferem zonas húmidas que acumulam folhas, com mais sombra e arborizadas, e zonas de depósito de estrume e de fezes (de ovelha, cavalo e gado bovino) espalhadas pelo pasto (Foxi & Delrio, 2010; Carpenter, Mellor & Torr, 2008; Delrio, Deliperi, Foxi, Pantaleoni & Piras, 2002).

Os ovos têm forma de banana e medem aproximadamente 0,25mm de comprimento. Inicialmente são brancos, mas tornam-se castanhos ou pretos, podendo algumas espécies colocar cerca de 450 ovos por postura, com sete posturas durante a vida. Os ovos vão eclodir entre 2-10 dias após a postura.

As larvas precisam de humidade para se desenvolverem e as fases larvares podem durar desde duas semanas a um ano, dependendo da espécie, temperatura e área geográfica (Connelly, 2013). A fase de pupa geralmente dura dois a três dias. O ciclo completo destes insetos poder decorrer em duas a seis semanas, mas à semelhança de outras fases do ciclo, esta duração é influenciada pelas condições meteorológicas. Os machos eclodem primeiro do que as fêmeas para estarem prontos quando estas eclodirem, sendo que o acasalamento ocorre durante o voo quando as fêmeas voam para dentro de enxames de machos, ou no corpo dos hospedeiros após a fêmea se alimentar (Connelly, 2013).

1.7 Sazonalidade e ciclo circadiano

A sobrevivência e desenvolvimento dos insetos *Culicoides* é muito dependente da temperatura, dado que estes seres vivos são ectotérmicos. Desta forma, a sua atividade acaba por ser sazonal, podendo variar desde semanas a meses, visto que a maioria das espécies está mais adaptada a épocas com temperaturas quentes. O número de insetos começa a aumentar no fim da primavera, início do verão, sendo o seu pico no fim do verão, início do outono. Segundo um estudo de Goffredo *et al.* (2004), espécies do complexo *Obsoletus* foram capazes de sobreviver pelo menos 92 dias a temperaturas entre 17°C e -25°C sem uma refeição sanguínea. A média de sobrevivência destes artrópodes é de cerca de 10 a 20 dias.

Apesar de apresentarem hábitos predominantemente crepusculares e/ou noturnos, os insetos adultos do género *Culicoides* podem reduzir ou cessar sua atividade quando expostos a condições meteorológicas adversas, como temperaturas muito baixas ou ventos fortes (Mellor *et al.*, 2000; Baylis *et al.*, 1997). Mesmo sob essas condições desfavoráveis, a sua capacidade de transmitir vírus, permanece latente durante o período de inatividade, sendo retomada quando as condições climáticas se tornam mais favoráveis.

1.8 Hospedeiros do VDHE

O veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) foi o primeiro hospedeiro em que o VDHE foi reportado, sendo posteriormente detetado em gado bovino. Em relação ao gado caprino, ovino e camelídeos, estes podem ser propensos a ser infetados, mas não desenvolvem a doença. Apesar dos ovinos apresentarem uma alta suscetibilidade, com grandes taxas de mortalidade quando afetadas pela Língua Azul, estes animais são resistentes ao VDHE quando induzido, como foi provado em estudos experimentais (Sghaier *et al.*, 2022). De salientar que animais com infeções subclínicas atuam como reservatórios da doença, podendo amplificar a circulação do vírus. Ovelhas e cabras são disso exemplo, pois estão sujeitas a ser infetadas pelo VDHE, apesar de não apresentarem sinais clínicos da doença (Duan *et al.*, 2022; Mahmoud *et al.*, 2021). Outras espécies seropositivas foram o gamo (*Dama dama*), o corço (*Capreolus capreolus*), o uapiti (*Cervus canadensis*), bisontes (*Bison bonasus*) e o cervo-vermelho (*Cervus elaphus*) (Nol *et al.*, 2010).

O gado pode ser usado como um modelo fiável do VDHE apesar de serem necessários mais estudos experimentais em bovinos para elucidar os mecanismos de patogenicidade. Vários estudos indicaram infeção em raças europeias destinadas à produção de leite, o que apresenta grandes preocupações devido ao impacto económico desta doença (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023).

Um estudo recente realizado por Sailleau *et al.* (2019) demonstrou que ocorreu infeção experimental em vitelos através da inoculação via subcutânea de múltiplos serótipos do VDHE, sendo que os resultados em relação a sinais clínicos e parâmetros virológicos foram semelhantes a estudos anteriores (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023). O VDHE-7 resultou numa infeção com sinais clínicos severos, incluindo apatia, diarreia, prostração, ataxia e anorexia, que culminaram na necessidade de eutanásia dos animais.

1.9 Patogenia da Doença

A fêmea do género *Culicoides* infetada alimenta-se de um hospedeiro ruminante suscetível e o vírus infeta as células dendríticas e macrófagos na zona da

inoculação. Estas células infectadas vão migrar, através da circulação sanguínea, transportando o vírus para as células endoteliais dos vasos linfáticos e para os linfonodos próximos do local de inoculação (Sohn and Yuill, 1991). Aqui vai ocorrer a replicação primária, com disseminação do vírus pelos órgãos, em particular pelo baço e pulmões (Sohn and Yuill, 1991). Os fagócitos mononucleares e as células do endotélio são os principais tipos celulares infectados. No sangue, o vírus pode afetar linfócitos e hemácias, ficando em grande concentração durante longos períodos (J Gibbs & P Lawman, 1977). O vírus, ao replicar-se nos linfócitos, compromete a sua quantidade, desenvolvendo-se linfopenia e imunossupressão.

O vírus pode ser detetado no fígado, coração, cérebro e testículos (Rodrigues *et al.*, 2022). O VDHE causa frequentemente dano vascular generalizado, induzindo morte celular por apoptose, originando hemorragias, trombose, edema e necrose dos tecidos (Garret E. F., 2015). Acaba por ocorrer um aumento da permeabilidade dos vasos devido ao dano provocado no endotélio vascular. A replicação nos macrófagos e células endoteliais conduz à libertação de citocinas proinflamatórias, como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6). Esta acentuada libertação de citocinas pode potenciar a patogénese viral.

Na forma mais aguda da doença, observa-se frequentemente hiperemia da conjuntiva e da mucosa oral, edema pulmonar, derrame pleural, hemorragias multifocais em vários órgãos comprometidos por lesões vasculares e coagulopatia. O edema pulmonar compromete a respiração e predispõe a infeções secundárias que resultam em pneumonia.

O gado infectado com certas estirpes do VDHE desenvolve lesões orais semelhantes às da LA (Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011). A infeção é frequentemente subclínica em várias partes do Sudoeste Asiático, e é caracterizada por estomatite ulcerativa e disfagia nos animais afetados. Aborto e nados mortos foram descritos em alguns surtos, como, por exemplo, num estudo realizado em Israel, onde foi identificado o VDHE presente em fetos abortados, assim como casos de nados mortos em ruminantes (Golender *et al.*, 2021).

1.10 Período de incubação e de virémia, morbidade e mortalidade

A virémia pode persistir em gado bovino (*Bos taurus*), por 3 semanas após a infecção (Santos *et al.*, 2023), e em veados de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) durante 56 dias (Quist *et al.*, 1997). Desta forma, o envolvimento destes animais na transmissão do vírus não pode ser excluído, pois este longo período de virémia sugere que os animais podem atuar como reservatório para o vírus.

A duração da virémia com o VDHE-1 e -2 foi investigada em veados e bovinos, através de infecções naturais e experimentais. Todos os animais estavam virémicos no dia 4 após a infecção, sendo que nalguns foi possível detetar o vírus no segundo dia pós infecção. Foi possível isolar o vírus 50 dias após a infecção, mas na maior parte dos animais já não era possível detetar o agente patogénico ao fim de 3 semanas (Gaydos *et al.*, 2002; Quist *et al.*, 1997).

As repercussões económicas deveram-se às mortes, à diminuição de produção, restrições de movimento e o impedimento do comércio de gado em áreas afetadas (EFSA Journal, 2008). Em gado, a mortalidade causada pelo VDHE-8 é normalmente baixa, com valores que podem atingir os 2,2% (Sghaier *et al.*, 2022) enquanto a morbidade varia de 1% a 18% (EFSA Journal, 2008). Na Tunísia, o primeiro surto de VDHE foi descrito em 2006, e causou uma alta mortalidade e morbidade, o que resultou em perdas económicas elevadas nas explorações afetadas (Sghaier *et al.*, 2022). Em Israel, num surto ocorrido no mesmo ano, a morbidade variou de 90% a 100%, a duração do período de doença aguda foi 7 a 10 dias e a taxa de mortalidade aproximadamente de 1,5% (Yadin *et al.*, 2008). Durante este surto em Israel a duração da doença em animais variou de 3 a 30 dias (Savini *et al.*, 2011). Em Marrocos, um surto afetou explorações pequenas e foi caracterizada por uma morbidade de 18% e mortalidade 2,2% (Sghaier *et al.*, 2022).

1.11 Sinais Clínicos

Historicamente, sinais clínicos menos severos ou infecções assintomáticas foram observadas em bovinos, que são considerados reservatórios do vírus (Sghaier *et al.*, 2022). Nas últimas duas décadas, o número de surtos da DHE nestes animais teve

um aumento gradual (Sghaier *et al.*, 2022). Nestes surtos, os animais demonstraram sinais clínicos idênticos aos causados pelo VLA, que incluem pirexia/hiperemia, anorexia, edema facial (com possível edema da glote e cianose da mesma), conjuntivite, disfagia, letargia, sialorreia, lesões ulcerativas e necróticas na mucosa oral, língua e na região nasal, redução da ruminação, dispneia e taquipneia, hiperémia do úbere com possíveis úlceras, claudicação associada a coronite e alterações no crescimento dos cascos, diminuição na produção de leite, culminando, muitas vezes, na morte dos animais (Alessio Lorusso *et al.*, 2023). A disfagia, assim como a protusão/prolapso da língua, pode ser visível devido ao dano que o vírus gera a nível da musculatura estriada do esófago, faringe, laringe e língua, sendo que a língua cianótica (língua azul) é devida à falta de oxigenação (Savini *et al.*, 2011). Os animais ficam desidratados e emaciados, podendo desenvolver esclerose e edema cutâneo (Savini *et al.*, 2011) e, nalguns casos, a morte ocorre devido a pneumonias por aspiração (Inaba, 1975). As lesões são histologicamente caracterizadas por degeneração hialina, necrose e mineralização do músculo estriado, acompanhado por uma infiltração de neutrófilos, linfócitos e histiócitos.

A nível reprodutivo é verificada uma azoospermia ou oligozoospermia, com baixa motilidade e aumento das formas anormais dos espermatozoides, nos espermogramas de machos afetados. Nas fêmeas, podem ocorrer alterações no ciclo éstrico, abortos e nados mortos. Estes sinais clínicos apresentados pelos animais são bastante variáveis consoante a estirpe e o serótipo viral, existindo, igualmente, variabilidade individual. A epidemia em 1997 no Japão foi caracterizada por abortos, malformações fetais e nados-mortos (Sghaier *et al.*, 2022; Savini *et al.*, 2011; Ohashi *et al.*, 1999).

No surto europeu, foram observados casos severos e até fatais em gado devido às infeções pelo serótipo VDHE-8 nas regiões a sudoeste de Sardenha e Sicília (Alessio Lorusso *et al.*, 2023; Quaglia *et al.*, 2023), Sul de Espanha e Portugal (Quaglia *et al.*, 2023). A infeção com este serótipo produziu vários sinais clínicos nos animais, que incluíram apatia, diarreia, prostração, incapacidade de se manterem em estação e anorexia, o que culminou na eutanásia dos animais afetados (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023). Dados fornecidos por parte da DGAV, que referem a identificação do vírus,

assim como a manifestação de sinais clínicos por parte de bovinos domésticos e selvagens, no distrito de Castelo Branco na época da captura dos insetos, coincidem com a época da realização do presente estudo (Figura 4).

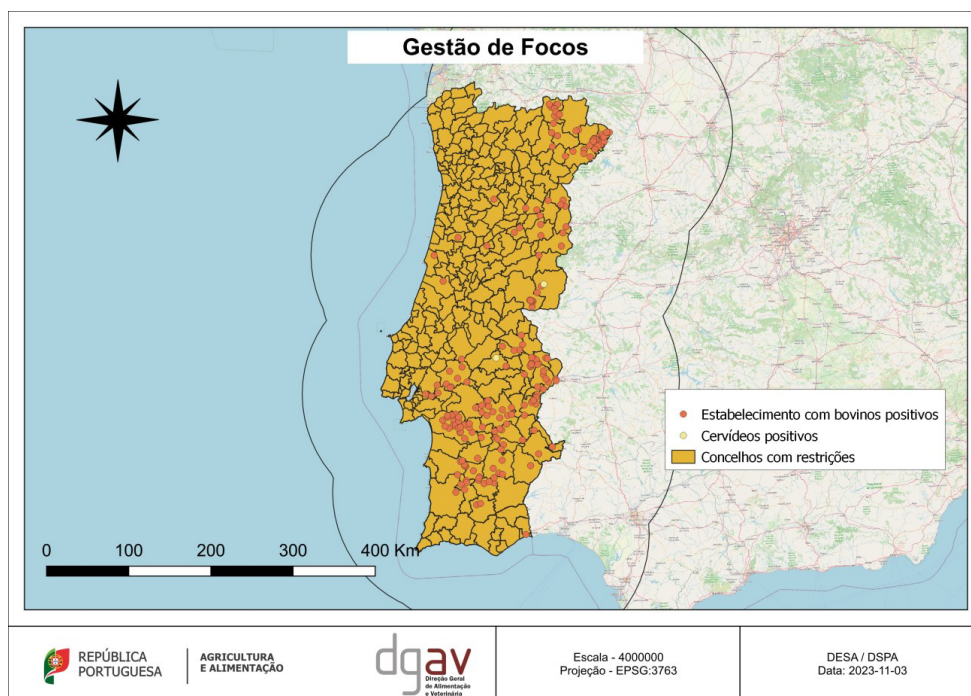


Figura 4 – Mapa da zona afetada pela DHE em Portugal a 03/11/2023
(DGAV, 2023)

1.12 Diagnóstico

Os sinais clínicos da DHE em ruminantes selvagens e domésticos são muito idênticos aos provocados pela LA, sendo na maioria das vezes facilmente identificados ao realizar o exame físico de animais afetados. Estes podem ser semelhantes a outras doenças de ruminantes domésticos, tais como Diarreia Viral Bovina (BVD), Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Febre Catarral Maligna (FCM) e Febre Efêmera Bovina (FEB). Como a cocirculação do VDHE e do VLA em países europeus se está a tornar um evento comum, esta situação faz com que o diagnóstico baseado apenas em sinais clínicos seja inconclusivo. Contudo, a utilização de métodos de diagnóstico complementares, permite descartar todos os diagnósticos diferenciais e

chegar ao agente viral causador da doença. A testagem em laboratório através de testes laboratoriais específicos é necessária para diferenciar as duas infeções virais e obter um diagnóstico definitivo (Savini *et al.*, 2011). Os testes de diagnóstico atuais são capazes de distinguir a infeção de VDHE e outros *Orbivirus*. No entanto, não existem testes rápidos comercialmente disponíveis para deteção do VDHE (Savini *et al.*, 2011).

O isolamento viral pode ser alcançado através de amostras de sangue e tecidos de animais virémicos, incluindo baço, fígado, pulmão e linfonodos de carcaças infetadas (OMSA, 2021; Natalia Golender *et al.*, 2019; Savini *et al.*, 2011). O vírus foi também isolado a partir tecido cerebral de fetos abortados, com deteções do vírus entre 22,4% a 36,7% (Golender, Khinich, Gorohov, Abramovitz & Bumbarov, 2021; Golender *et al.*, 2017), assim como de placentas, o que sugere que a infeção fetal ocorre previamente à morte fetal *in utero* (Natalia Golender *et al.*, 2019).

A técnica *gold standard* para a identificação e quantificação de anticorpos contra os diferentes serótipos do VDHE é o teste de seroneutralização (SN) que permite detetar e quantificar anticorpos serotipo-específicos, apesar de ser um procedimento moroso com muita mão de obra necessária, e que requer entre 4 a 6 dias para apresentar resultados (OMSA, 2021; Savini *et al.*, 2011).

São vários os testes de ELISA (*antigen capture, competitive, double-antibody sandwich, indirect, blocking*) disponíveis para deteção do VDHE; estes métodos já estabelecidos apresentam especificidade e sensibilidades de até 97% (Xin *et al.*, 2023). Segundo a OMSA (2021), dentro de todos estes testes ELISA, o competitivo (c-ELISA) é a técnica preferencial para detetar o vírus.

Para além dos meios de diagnóstico já referidos, existem outros de possível execução para a deteção do vírus, incluindo o isolamento através da inoculação do vírus em culturas celulares e imunodifusão em gel de agarose. Porém, estas técnicas laboratoriais não conseguem discriminar o VDHE e o VLA dada a sua falta de especificidade (OMSA, 2021). Outro teste laboratorial utilizado é o teste de fixação do complemento.

Métodos convencionais de RT-PCR e a técnica de (q)RT-PCR apresentam diversas vantagens pelo facto de possuírem uma elevada sensibilidade e

especificidade, com baixos requisitos em relação à quantidade das amostras (Xin *et al.*, 2023). A especificidade pode chegar a 100%, como já provado por Clavijo *et al.* (2010), e os valores de sensibilidade também são elevados (99%) como provado por Viarouge *et al.* (2015). Não obstante, deve-se reforçar sempre o facto de que todos os meios de diagnóstico deverem ser complementados.

No estudo realizado por Quaglia *et al.* (2023) foram utilizados *pools* de até 50 *Culicoides* para purificação de RNA e posterior testagem por (q)RT-PCR para a deteção do VDHE-8. Através da testagem por (q)RT-PCR, amplificando o segmento Seg-9 do genoma do VDHE, é possível detetar qualquer estirpe do vírus, independentemente do serótipo, de forma altamente sensível e específica (Maan *et al.*, 2016).

1.13 Prevenção e Controlo

O controlo e prevenção de doenças transmitidas por vetores corresponde a um dos desafios mais importantes a nível de Medicina Veterinária e de Medicina Humana (OMS, 2000), e a DHE é uma delas, pois assume diversas condicionantes bióticas e abióticas, assim como ambientais e económicas (Conte *et al.*, 2007). Como é uma doença transmitida por vetores, torna-se difícil controlar e erradicar a DHE uma vez estabelecida num país ou região, devido a diferentes variáveis impossíveis de controlar, tais como os fatores climáticos e geográficos, assim como a abundância dos vetores (Savini *et al.*, 2011).

São vários os fatores de risco que põem em causa o controlo do vírus, tais como mercados, leilões e feiras, já que o movimento dos animais facilita o contacto direto e indireto de diferentes rebanhos. O conceito *One Health* é, desta forma, importante, pois, apesar da doença não ser uma zoonose, apresenta complicações que afetam o ser humano e o meio ambiente (Webster *et al.*, 2016; Franco, Gomes, Rowland, Coleman & Davies, 2014).

As medidas e métodos que visam a prevenção e controlo desta doença foram revistos (EFSA Journal, 2008), mas alguns cuidados, tais como manter uma boa higiene na exploração e a remoção dos locais de reprodução dos insetos, é essencial.

A utilização de químicos, como, por exemplo os piretroides, são uma prática comum no controlo de inseto vetores, atuando como repelente, apesar da sua eficácia não estar provada (Savini *et al.*, 2011).

Se existe um risco de novas introduções, devem ser tomadas medidas de vigilância a longo prazo que incluem a monitorização de ruminantes enquanto hospedeiros e de insetos enquanto vetores (Savini *et al.*, 2011). Através de armadilhas montadas nas explorações, é investigada a presença de vetores em determinada zona geográfica (Savini *et al.*, 2011). O armazenamento de insetos capturados durante estes programas de vigilância entomológica pode ser muito útil para rastrear, no futuro, a circulação de arbovírus, assim como a extensão geográfica dos mesmos (Quaglia *et al.*, 2023; Savini *et al.*, 2011). Para isso, os serviços veterinários e as indústrias agrícolas devem cooperar, para que os programas de erradicação possam ser justificados politicamente assim como realizadas análises de custo-benefício e de risco-benefício. Ao longo dos programas, deve haver um duplo *feedback*.

Deve ser definido também um perímetro onde sejam tomadas medidas e restrições de movimento dos animais, com raio adequado dependendo da situação epidemiológica. A taxa de disseminação pode ser deduzida por análises da direção do vento, sendo que a movimentação animal não tem um papel tão importante (Kedmi *et al.*, 2011).

Para ser possível controlar o vetor, é necessário tomar medidas em 3 vertentes: a nível dos reservatórios, do vetor e do hospedeiro. O facto dos insetos *Culicoides* serem leves e facilmente transportados através de correntes de vento tem como consequência o transporte dos mesmos por centenas de quilómetros (Foster, Breckon, Luedke, Jones & Metcalf, 1977). Os adultos voadores podem ser controlados dentro das explorações, através de algumas medidas, tais como a utilização de repelentes nas paredes das instalações e nos veículos de transporte. A aplicação de inseticidas nos locais onde os dejetos dos animais são colocados podem apresentar resultados, mas vai ter um grande impacto ambiental a nível da fauna e flora, pois poderá ser posteriormente utilizado nas terras para fertilização e, desta forma, a sua utilização neste contexto deverá ser ponderada.

Uma medida de prevenção dos hospedeiros em relação à DHE, é a utilização fármacos de ação inseticida, que são aplicadas de forma tópica, como *spot on* ou *pour on*, utilizando moléculas como a deltametrina e a cipermetrina, ambos piretroides, que oferecem um efeito repelente de até 5 semanas após a aplicação. Contudo, esses tratamentos não garantem proteção total (Naqqash *et al.*, 2016; Carpenter *et al.*, 2008; Narladkar, Desphande, Vaniprasad, Shivpuge & Desphande, 2006). Além disso, o uso prolongado de pesticidas sintéticos pode levar ao desenvolvimento de resistência em determinadas pragas, limitando a eficácia dos programas de controle. Por exemplo, um estudo na Índia demonstrou que os insetos *C. nubeculosus* se tornaram menos suscetíveis à deltametrina (De Keyser *et al.*, 2017).

Relativamente aos ambientes onde os insetos *Culicoides* surgem, é necessário controlar e eliminar os criadouros através da ação mecânica, assim como as larvas por ação química/biológica. As populações de larvas podem ser controladas através de inseticidas com pouco impacto ambiental, solúveis em água, amigos do ambiente e com riscos nulos para a saúde animal e humana. Existem inseticidas de nova geração que preenchem estes requisitos, são baratos (Faheem Ahmad & Rakesh Pandey, 2024; Benelli *et al.*, 2015) e também são seletivos contra vetores específicos. O *Neem*, também conhecido por Amargosa (*Azadirachta indica*), é uma espécie de árvores pantropical de crescimento rápido (National Research Council 1992). Os produtos químicos extraídos possuem um grande potencial inseticida, inibindo a oviposição dos insetos *Culicoides* e atuando como agente ovicida, larvicida e pupicida (Benelli *et al.*, 2015; Blackwell, Evans, Strang, 2004), o que a torna uma das plantas mais prometedoras do século XXI (Benelli *et al.*, 2015; Nicoletti, Murugan & Serrone, 2014), como comprovam estudos realizados em condições de campo (Benelli, Conti, Garreffa & Nicolletti, 2014; Anjali, Sharma, Mukherjee & Chandrasekaran, 2012; Nicoletti, Maccioni, Coccioletti, Mariani, & Vitali (2012); Nicoletti, Mariani, Maccioni, Coccioletti & Murugan, 2012; Nicoletti, Serafini, Aliboni, D'Andrea & Mariani, 2010; Dua *et al.*, 2009), com poucos efeitos prejudiciais (Chandramohan *et al.*, 2016).

1.13.1 Vacinação

A vacinação é a medida estratégica mais eficaz para conter com sucesso a maior parte de doenças virais que afetam humanos e animais (Alessio Lorusso *et al.*, 2023; Jiménez-Cabello *et al.*, 2023; Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011). O controlo de doenças, quer apenas por vacinação ou por vacinação adicionada a outros métodos de controlo, são um processo contínuo que tem de ser mantido enquanto a doença apresentar importância económica (Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J., 2011). Dada a vasta expansão do VDHE-6 e -8 na bacia Mediterrânica e a recente chegada do VDHE-8 à Europa, o desenvolvimento e comercialização de vacinas eficazes deve ser promovido de modo a reduzir a circulação do vírus e prevenir perdas económicas diretas e indiretas (Alessio Lorusso *et al.*, 2023; Jiménez-Cabello *et al.*, 2023).

Os surtos ocorridos na Europa possuem o risco de voltar a ocorrer no futuro, e a potencial cocirculação de múltiplos serótipos aumenta a necessidade da produção de vacinas de nova geração (Sghaier *et al.*, 2022). Estas devem ter em consideração os problemas que ocorreram na vacinação contra o VLA e com o vírus da Peste Equina Africana, permitindo diferenciar se a infeção ocorreu de forma natural ou se o animal foi vacinado, através de vacinas marcadas, do inglês *Differentiating Infected from Vaccinated Animals* (DIVA), induzindo ainda proteção contra vários serótipos do VDHE (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023). Ainda não existem tais vacinas licenciadas para o VDHE na Europa (Savini *et al.*, 2011). As únicas vacinas disponíveis comercialmente são vacinas monovalentes vivas atenuadas, e uma vacina bivalente inativada (VDHE-2 e vírus da febre efémera bovina) produzida no Japão para o controlo do vírus Ibaraki. Já na América do Norte, o VDHE é controlado através de vacinas autógenas (Sghaier *et al.*, 2022). Um estudo mostrou que a vacina é capaz de induzir uma forte resposta imune e oferecer proteção contra a infeção pelo VDHE-2 em modelos animais, destacando seu potencial como uma vacina eficaz contra essa doença (Sunwoo *et al.*, 2020). Uma vacina destinada ao VDHE-6 pode ser eficaz contra a prevenção do VDHE-8, dada a semelhança entre os dois serótipos pelos resultados de seroneutralização (Anthony *et al.*, 2009) devendo ainda ser provado em estudos experimentais *in vivo* (Sghaier *et al.*, 2022).

A Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) autorizou provisoriamente, por um ano, a utilização da vacina Hepizovac, suspensão injetável para bovinos, com carácter voluntário, podendo ser aplicada nas áreas afetadas.

Dada a pouca informação acerca desta doença emergente, é necessário aprofundar o conhecimento sobre a mesma, o que se procurou alcançar com este estudo. Dado que muitos produtores não reportam os casos de animais doentes, a criação de um sistema de vigilância eficiente, que permita tomar medidas rapidamente ou, mesmo, prevenir a disseminação da doença quando estes surtos ocorrem, é de grande importância.

Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram os seguintes:

1 - Realizar um estudo epidemiológico sobre a presença de insetos do género *Culicoides* na região da Zebreira, Concelho de Idanha-a-Nova.

2 - Avaliar, por RT-PCR, a frequência de infeção pelo VDHE nas espécies vetores da doença.

3 - Recolher informação de vários produtores da região relativamente aos animais com sinais clínicos compatíveis com a DHE e as respetivas taxas de morbilidade e mortalidade.

2. Material e Métodos

2.1. Localização e captura de insetos *Culicoides*

O presente estudo foi realizado na freguesia da Zebreira, Concelho de Idanha-a-Nova, município do distrito de Castelo Branco (Figura 5). Para a realização do mesmo, foram recolhidas amostras de insetos durante vários dias no período compreendido entre setembro e novembro de 2023, numa exploração onde havia registo de animais com sinais clínicos compatíveis com DHE. No entanto, nenhum dos animais tinha sido submetido a um teste de diagnóstico para confirmação da doença.

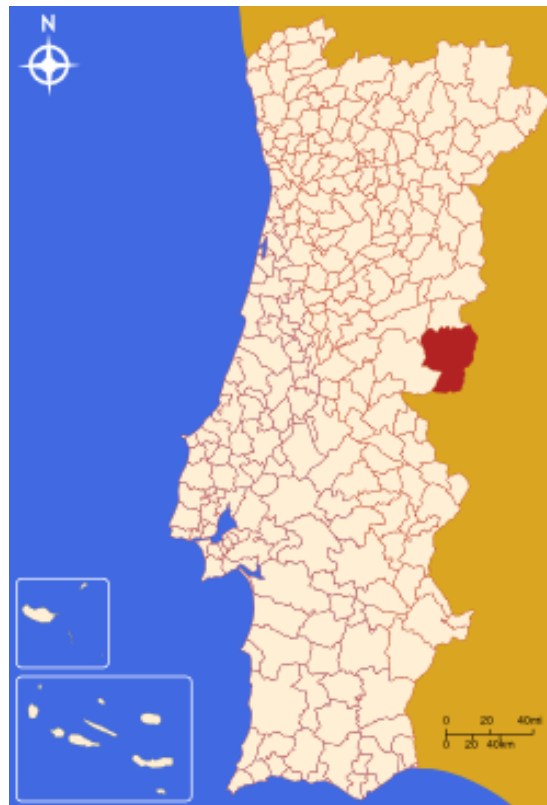


Figura 5 – Concelho de Idanha-a-Nova (assinalado a vermelho) onde foi realizado o estudo.

A captura dos insetos foi efetuada com o auxílio de armadilhas CDC miniatura [New Standard Miniature Black-Light (UV) CDC Trap, Model 1212, John W. Hock

Company, Gainesville, Florida, USA]. As armadilhas estavam equipadas com lâmpadas ultravioleta (UV) de 6W, com o intuito de atrair os insetos do gênero *Culicoides*, ventiladores de sucção e um sistema LCS-2 Photoswitch. Eram alimentadas através de baterias de 6V, o que facilitou a colocação das armadilhas em locais mais remotos, como é possível visualizar na Figura 6.

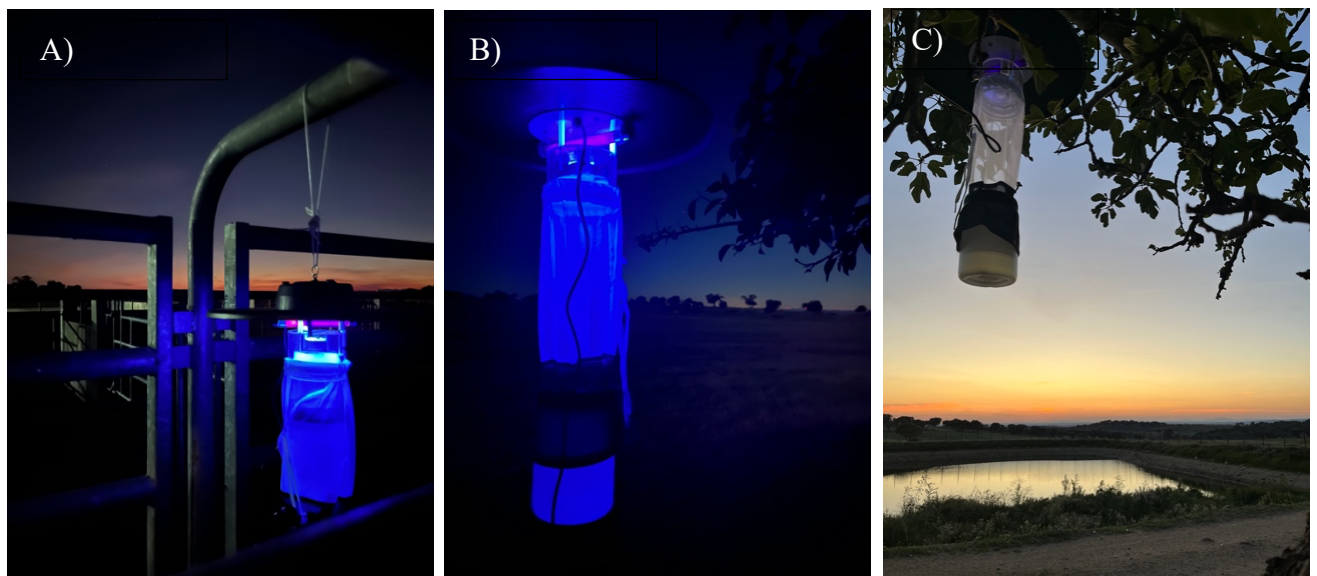


Figura 6 – Armadilhas do tipo CDC para captura de insetos *Culicoides* em funcionamento. A) Zona Z1 – Manga dos bovinos; B) Zona Z2 – Dentro do pavilhão; C) Zona Z3 – Figueira, junto a uma lagoa e áreas de pastagem dos bovinos (Fotografias originais do autor)

As armadilhas CDC foram colocadas ao entardecer, em zonas próximas dos animais, a uma altura mínima de 1,80 m em relação ao solo. O sistema LCS-2 Photoswitch ativa a armadilha quando a luz começa a diminuir, ao pôr do sol, e quando existe uma quantidade considerável de luz, o sistema apaga-se. As armadilhas foram colocadas em três zonas distintas da exploração: A) na manga dos bovinos, perto do depósito com os dejetos dos animais (Z1), B) dentro do pavilhão/adjacente a uma zona residencial (Z2) e C) próxima de uma figueira, junto a uma lagoa e a áreas de pastagem

de bovinos (Z3) (Figura 7). Pretendeu-se obter informação de diferentes locais dentro da exploração, visto que diferentes espécies de insetos possuem diferentes preferências edafoclimáticas.

Foram recolhidas amostras, pelo menos uma vez por semana, nos meses de setembro, outubro e novembro, num total de 27 capturas. Os insetos recolhidos foram colocados em frascos contendo uma mistura de etanol a 70% e detergente líquido, numa proporção de 95:5, num volume final de 250 a 300mL.

2.2 Identificação morfológica das amostras

A identificação dos insetos *Culicoides* foi realizada com o auxílio de uma lupa binocular S7 (Motic), através do padrão das asas dos insetos (Ramilo, 2016). O registo fotográfico dos exemplares capturados foi feito com recurso a uma câmara Moticam S3. Foi possível identificar *Culicoides imicola*, exemplares do grupo Obsoletus, *Culicoides newsteadi*, *Culicoides punctatus*, entre outros. O padrão das asas de *C. imicola* e de espécies do grupo Obsoletus encontra-se na Figura 7. A identificação dos insetos foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, e na Escola Agrária de Castelo Branco.

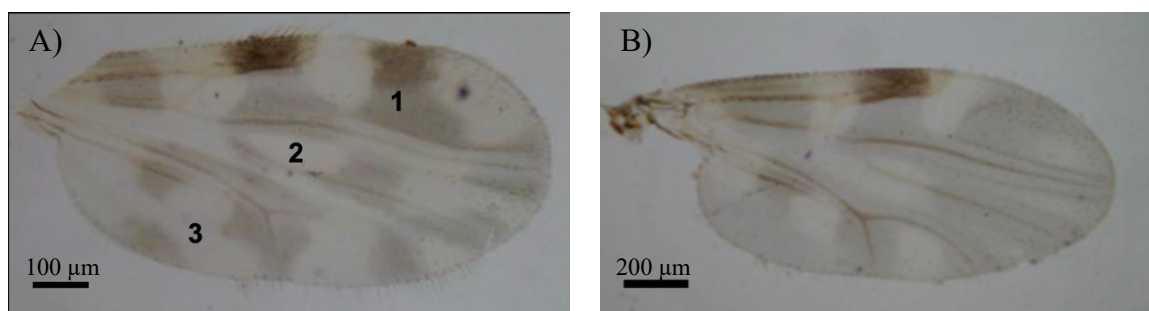


Figura 7 – Padrões das asas dos insetos das espécies A) *Culicoides imicola*, 1 - Presença de uma mancha escura característica; 2-Padrão branco em forma de amêndoa na zona medial; 3 - Padrão branco em forma de ampulheta; B) pertencentes ao grupo Obsoletus, (Ramilo, 2016).

2.3 Extração de ácidos nucleicos e quantificação

A partir das amostras de insetos identificados, foram feitos *pools* contendo entre 1 e 50 exemplares de cada espécie de *Culicoides* para serem submetidos a extração de RNA.

A cada *pool* de insetos foram adicionados 200µl de PBS estéril e 6 esferas de aço de 4,7mm de diâmetro. De seguida, foram submetidos a lise mecânica num homogeneizador de tecidos SpeedMill PLUS (Analytik JENA).

A extração de RNA dos lisados de insetos foi efetuada através do *kit* comercial “InviSorb Spin Universal Kit”, de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas.

1. Após a lise mecânica realizou-se um *short spin*;
2. Adicionaram-se ao microtubo com o lisado de insetos 200 µl de “Tampão de lise HLT”, 20 µl de “Carrier RNA” e 20 µl de “Proteinase K”;
3. Homogeneizou-se manualmente durante 10 segundos;
4. Realizou-se um *short spin*;
5. Incubaram-se os microtubos, em banho de água a uma temperatura de 65 °C, durante 10 minutos, agitando manualmente a cada 2 minutos;
6. Realizou-se um *short spin*;
7. De seguida, efetuou-se o mesmo processo, mas a uma temperatura de 95 °C durante 10 minutos, agitando manualmente a cada 2 minutos;
8. Realizou-se um *short spin*;
9. Adicionaram-se 260 µl de “Binding Solution” ao lisado de cada amostra e homogeneizou-se manualmente durante 10 segundos;
10. Foram incubadas as amostras à temperatura ambiente durante 5 minutos;
11. Realizou-se um *short spin*;
12. Transferiu-se cada amostra para uma coluna de filtração sobre um tubo coletor, e centrifugou-se durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g;
13. Descartou-se o tubo coletor com o filtrado da primeira centrifugação e a coluna de filtração foi colocado num novo tubo coletor estéril;

14. Adicionaram-se 600 µl de “Washing Buffer HTL” na coluna de filtração e foi realizada nova centrifugação, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g;
15. Descartou-se novamente o tubo recetor com o filtrado da segunda centrifugação, e a coluna foi colocada num novo tubo coletor;
16. Adicionaram-se 700 µl de “Washing Buffer” na coluna de filtração e fez-se nova centrifugação, durante 1 minuto, a uma velocidade de 11.000 ×g;
17. Descartou-se o filtrado e colocou-se a coluna de filtração no mesmo tubo coletor;
18. O passo 16 foi novamente repetido;
19. Removeu-se o etanol residual através de uma centrifugação durante 5 minutos a uma velocidade de 11.000 ×g;
20. Descartou-se o tubo coletor com o filtrado;
21. Colocou-se a coluna de filtração num microtubo de 1,5 ml estéril e identificou-se corretamente com os dados das amostras. Adicionaram-se 100 µl de água previamente aquecida a 65 °C, diretamente na superfície da coluna de filtração;
22. Incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente e, de seguida, centrifugou-se durante 1 minuto a uma velocidade de 11.000 ×g;
23. Descartou-se a coluna de filtração e fecharam-se os tubos finais com os ácidos nucleicos.

Os ácidos nucleicos isolados foram, em seguida, quantificados num espectrofotómetro NanoSNAP (Spex) e armazenados a -20 °C.

2.4 Amplificação, por PCR, de um fragmento do gene *ITS1* do género *Culicoides*

Para controlo da integridade dos ácidos nucleicos isolados e ausência de inibidores da DNA polimerase, foi realizada a amplificação por PCR convencional de um fragmento do gene *ITS1* do género *Culicoides* (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004). A região do gene *ITS1* amplificada é altamente conservada no genoma diferentes espécies de *Culicoides*. A PCR foi realizada utilizando *primers* específicos para o género,

denominados PanCulF e PanCulR, que permitiram a amplificação de fragmentos com dimensão entre 316 e 500 pb (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência de *primers* usados na amplificação da região do gene *ITS1* (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004).

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')
PanCulF	5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3'
PanCulR	5'-TGCGGTCTTCATCGACCCAT-3'

A preparação da mistura reacional foi realizada numa câmara C.B.S. Scientific Co. P-036-02, que é de uso exclusivo para esse procedimento, onde não são manipulados ácidos nucleicos. Para evitar a contaminação das amostras com DNA exógeno, procedeu-se à desinfeção das superfícies de trabalho e dos materiais utilizando uma solução de lixívia a 10%. Esta desinfeção incluiu micropipetas, caixas de pontas, microtubos, centrífuga e suportes para microtubos. Após a desinfeção, os materiais foram, ainda, expostos a radiação UV (ultravioleta) durante 15 minutos. Neste espaço, foram usadas micropipetas, pontas com filtro estéreis e microtubos estéreis reservados exclusivamente para uso dentro da câmara. A adição de DNA à mistura reacional foi efetuada numa bancada de trabalho separada, utilizando pontas com filtro. A reacção de PCR, com os *primers* PanCulF e PanCulR, foi realizada num volume total de 25 µL composto por 12,5 µL de NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech®, Lisboa, Portugal), 10 pmol de cada *primer*, 5 µL de DNA e água ultrapura estéril até perfazer o volume final. Em cada reacção foram incluídos dois controlos, um negativo (sem adição de DNA) e um controlo positivo (com DNA de uma amostra positiva conhecida), para validação dos resultados. A reacção foi realizada num termociclador qTower (Analytik Jena), de acordo com as condições referidas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições da reação de PCR para a amplificação da região do gene *ITS1*

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	5min	1
Desnaturação	94 °C	1min	30
Hibridação dos <i>primers</i>	58 °C	1min	
Extensão	72 °C	1min	
Extensão final	72 °C	10min	1

Após a reação de PCR, a presença de amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (m/v), conforme o seguinte protocolo:

1. Para a preparação de um gel de agarose com um volume de 150 ml pesaram-se 2,25 g de agarose utilizando uma balança técnica e colocou-se a agarose num frasco de Erlenmeyer;

2. Adicionaram-se 150 ml de tampão tris-borato EDTA (TBE) 1× ao Erlenmeyer contendo a agarose;

3. Fusão da agarose: A mistura foi aquecida no microondas de forma a fundir a agarose, resultando numa solução uniforme e translúcida, sem partículas em suspensão visíveis;

4. Montou-se o suporte para a formação do gel de agarose e posicionaram-se os pentes, destinados a criar os poços para a aplicação das amostras;

5. Antes de colocar a solução no molde, esta foi arrefecida sob água corrente, enquanto se agitava suavemente o Erlenmeyer;

6. Foram adicionados 0,63 µl de GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) à solução de agarose para permitir a visualização do DNA;

7. Colocou-se a solução no molde e aguardou-se a polimerização do gel, após o que foi transferido para uma tina de eletroforese;

8. Adicionou-se tampão TBE 1× à tina de eletroforese até cobrir totalmente o gel;
9. As amostras de DNA foram preparadas para serem colocadas nos poços do gel, misturando 8 µL de produto de PCR com 2 µL de *Loading Buffer* (Bioline®);
10. Num dos poços, foi aplicado o marcador de pesos moleculares HyperLadder 100 pb (Bioline®);
11. Após a aplicação das amostras nos respectivos poços, ligou-se a fonte de alimentação (Biometra PS 300TP) e realizou-se a eletroforese a 90 volts (V), durante 60 minutos;
12. Após o término da eletroforese, os resultados foram observados utilizando um transiluminador UV (AlfaGene®) onde foi possível visualizar a fluorescência emitida pelo GelRed intercalado no DNA.

2.5 Detecção do VDHE por RT-PCR em tempo real

Maan et al., (2016) descreveram uma técnica de PCR em tempo real quantitativo com transcrição reversa (qRT-PCR) para amplificar o gene *Seg-9*, que codifica a enzima helicase do VDHE. Os autores descreveram que a amplificação do gene *Seg-9* permite a detecção de qualquer estirpe do VDHE, independentemente do serótipo.

No presente trabalho, a detecção do VDHE nos mosquitos capturados foi feita através da amplificação do gene *Seg-9* pela técnica de RT-PCR em tempo real qualitativa com emissão de fluorescência por sonda TaqMan. A sequência dos *primers* e sonda encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Sequência de *primers* e sonda utilizados para detecção do VDHE (Maan et al., 2016)

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')
EHDV/Seg-9/F/15-32	ATGTCAGCTGCGGTYTTG
EHDV/Seg-9/R/112-85	TCCCAATCAACTAARTGRATYTG VATCT
EHDV/Seg-9/P/69-48	6-FAM-CCTCGGTCGAACGTTGGATCAC-BHQ1

Todas as amostras foram realizadas em triplicado, tendo sido consideradas positivas aquelas cujo valor médio do limiar de detecção (C_T , do inglês *cycle threshold*) era inferior a 40. Em todos os ensaios foram incluídos um controlo positivo e dois controlos negativos, para validação da amplificação e da ausência de contaminação com DNA exógeno, respetivamente.

De forma a evitar contaminações com DNA exógeno, foram adotadas todas as precauções e boas práticas laboratoriais anteriormente descritas em 2.4.

A amplificação foi realizada num volume final de 20 µl, contendo 10 µL de 2× qScript Virus 1-Step ToughMix, Low ROX (Quantabio®), 450 nM de cada *primer*, 150 nM de sonda, 5 µl de RNA e água ultrapura estéril para perfazer o volume final. A reação foi realizada num termociclador qTower (Analytik Jena), de acordo com as condições descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições da reação de RT-PCR em tempo real para amplificação do gene *Seg-9* do VDHE

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Transcrição reversa	55 °C	30min	1
Desnaturação inicial	95 °C	10 min	1
Desnaturação	95 °C	30seg	50
Hibridação	60 °C	1min	

2.6 Questionários efetuados a produtores da região em estudo

Com o objetivo de complementar a informação obtida pela captura e análise de insetos do género *Culicoides*, foram efetuados questionários a 21 produtores da região de Idanha-a-Nova, proprietários de explorações onde se registavam casos de animais com sinais clínicos compatíveis com a DHE (Apêndice I). Desta forma, pretendeu-se verificar se os sinais clínicos apresentados correspondiam aos descritos na literatura, assim como as taxas de mortalidade e morbilidade. Dada a falta de informação presente em Portugal, assim como na Europa, à data do início do estudo, a recolha e tratamento destes dados é uma mais-valia que contribui para o aprofundamento do conhecimento epidemiológico da DHE.

3. Resultados

3.1 Captura e identificação de insetos *Culicoides*

Entre setembro e novembro de 2023 foram realizadas 27 capturas de insetos do género *Culicoides*. Em todos os momentos de captura e em todas as zonas onde foram colocadas as armadilhas, foram sempre recolhidos insetos do género *Culicoides*. Devido ao elevado número de outras espécies de insetos capturados pelas armadilhas, foi necessária uma separação morfológica dos insetos *Culicoides*.

A grande maioria das amostras era constituída por *C. imicola*, seguidas de exemplares do grupo Obsoletus, *C. punctatus* e *C. newsteadi*. Para estes resultados contribuíram amostras provenientes das zonas Z1, Z2 e Z3, abrangendo, assim, todas as áreas de captura definidas no estudo. A espécie mais capturada foi a *C. imicola*, sendo possível observar um exemplar na Figura 8.



Figura 8 – Inseto fêmea da espécie *Culicoides imicola* (Fotografia original do autor)

3.2 Amplificação, por PCR, de um fragmento da região *ITS1* do género *Culicoides*

A amplificação de um fragmento do gene *ITS1* do género *Culicoides* foi bem-sucedida, conforme visualizado pela presença de um fragmento com dimensão entre 316 e 500 pb, após eletroforese em gel de agarose (Figura 9).

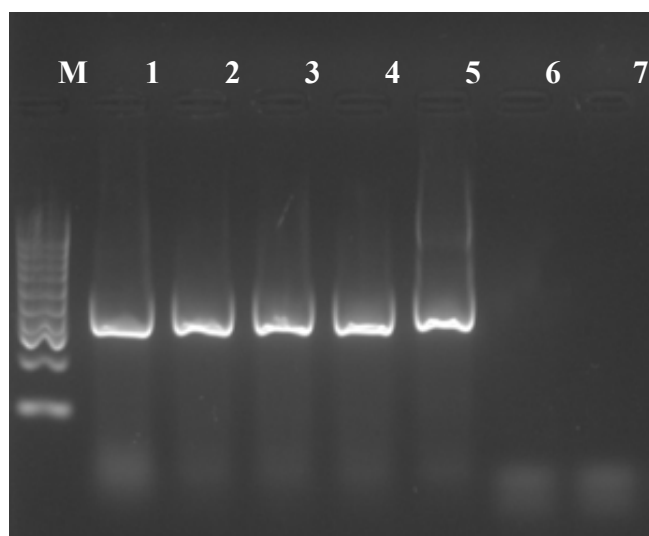


Figura 9 – Resultados da eletroforese após amplificação da região *ITS1* nas amostras de insetos do género *Culicoides*. M-Marcador de pesos moleculares (HyperLadder™ 100 bp, Bioline®); 1-4 produto de PCR de quatro amostras em estudo; 5: controlo positivo; 6-7: controlos negativos

Todas as amostras em estudo apresentaram amplificação positiva. Este resultado reflete a boa qualidade e integridade do DNA extraído das amostras, bem como a ausência de inibidores da DNA polimerase que pudessem conduzir a resultados falsos negativos. Nenhuma banda foi detetada no controlo negativo, confirmando a ausência de contaminação com DNA exógeno.

3.3 Detecção do VDHE por RT-PCR em tempo real

Após a separação, apenas 19 das 27 amostras foram utilizadas, pois no início do mês de novembro não foram reportados animais com sinais clínicos compatíveis com a DHE, pelo que as restantes amostras não foram incluídas no presente estudo.

Das 19 amostras testadas, 11 foram recolhidas em setembro, 6 em outubro e 2 em novembro. A amplificação do gene *Seg-9* do genoma do VDHE por RT-PCR em

tempo real foi bem-sucedida em 13 das 19 amostras, o que perfaz uma percentagem de 62% positivos e de 32% negativos. Na Figura 10 encontra-se um exemplo de uma das curvas de amplificação das amostras em estudo.

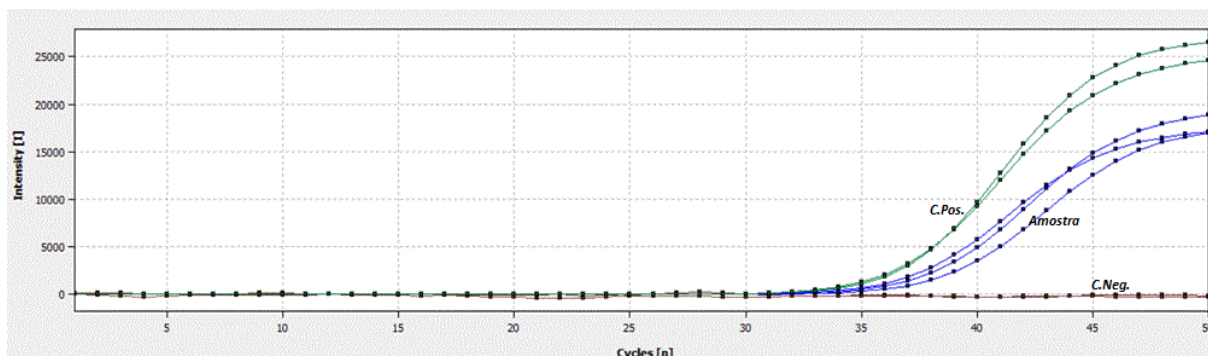


Figura 10– Resultados da amplificação por RT-PCR em tempo real do gene *Seg-9* do VDHE de uma das amostras em estudo.

3.4 Resultados referentes aos questionários efetuados aos produtores

Através dos questionários efetuados a 21 produtores, foi possível caracterizar as explorações inquiridas e obter dados epidemiológicos sobre os animais doentes. Estes resultados encontram-se expressos nos Gráficos 3 a 7 e na Tabela 6.

O Gráfico 3 evidencia que a grande maioria das explorações analisadas opera em regime extensivo (90,4%), enquanto apenas uma exploração segue um sistema intensivo (4,8%) e outra um regime semi-intensivo (4,8%). De forma semelhante, é possível observar no Gráfico 4 que a maioria dos animais se encontrava a campo (85,7%), enquanto uma menor proporção seguia um regime misto (9,5%) ou permanecia estabulada a tempo inteiro (4,8%). Estes dados refletem a predominância da produção extensiva na região estudada, o que pode influenciar a exposição dos animais aos vetores do VDHE.

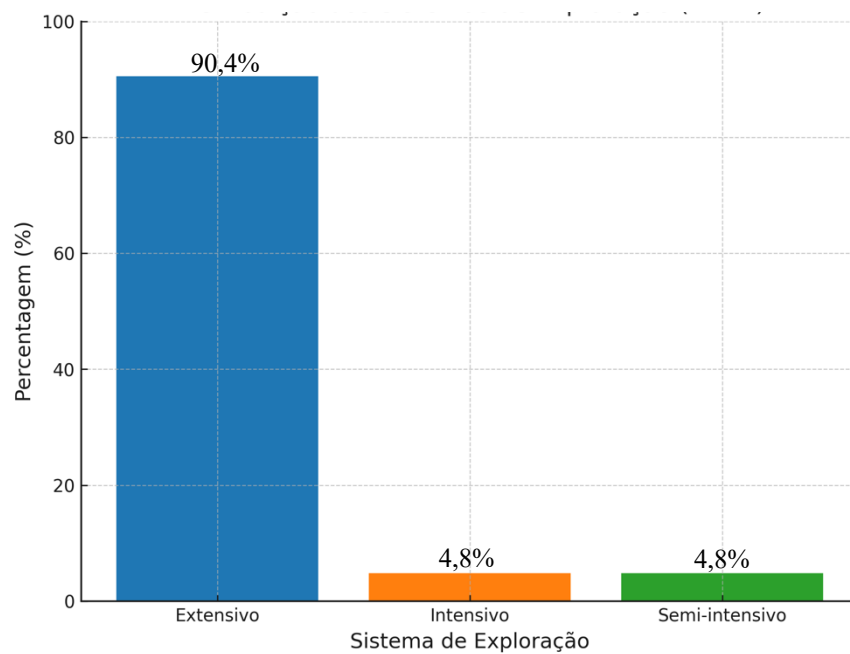


Gráfico 3 – Distribuição das explorações em função do regime de produção
($n=21$)

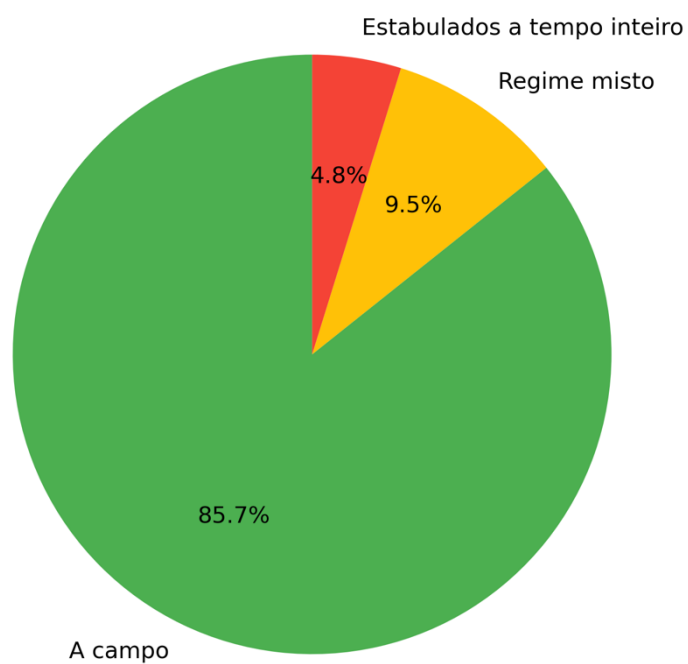


Gráfico 4 – Distribuição dos animais das explorações em função do regime
($n=21$)

A Tabela 6 apresenta uma visão detalhada das condições de produção e das características dos animais afetados pelo VDHE. Estes dados incluem fatores como a idade e a raça dos animais, bem como informações sobre o ecossistema e outros aspectos referentes às explorações. A análise destes parâmetros visa obter dados relevantes sobre os fatores de risco associados à infecção e a possível influência do sistema de produção na disseminação da doença.

Tabela 6 - Parâmetros das explorações e características associadas aos animais afetados

Parâmetro	Descrição
Número de animais	Entre 30 e 900, consoante a exploração.
Número de animais afetados	Entre 1 e 107, dentro de cada exploração.
Idade dos animais afetados	Entre 1 dia e 14 anos.
Ecossistema das explorações	Todas situadas em ecossistemas de Montado (florestas de azinheiras, sobreiros, carvalhos ou castanheiros), principalmente constituídas por azinheiras e sobreiros, com pequenas proporções de eucaliptos e oliveiras.
Desinsetização	11/21 explorações efetuaram desinsetização um mês antes de surgirem os sinais clínicos.
Armadilhas para insetos	Nenhum produtor possuía armadilhas para insetos.

No Gráfico 5 encontra-se a análise da distribuição dos animais com sinais clínicos mais evidentes em função da raça, onde o objetivo era avaliar a possível influência da suscetibilidade genética na manifestação da doença, contribuindo para uma melhor compreensão dos fatores de risco associados à infecção.

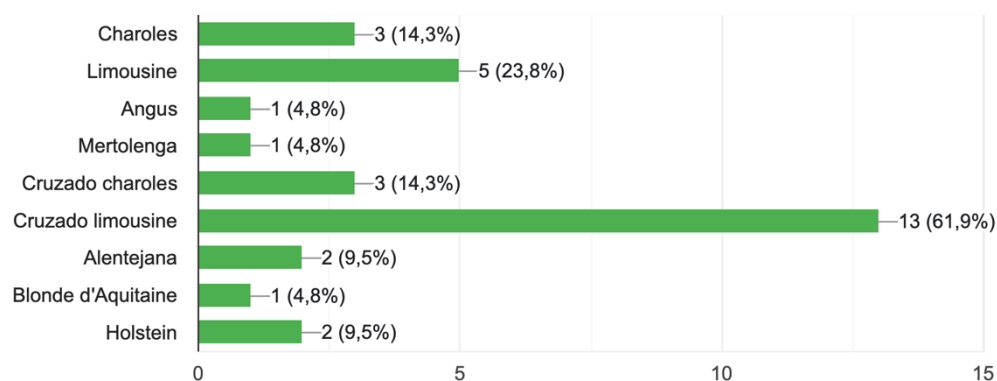


Gráfico 5 – Distribuição dos animais com sinais clínicos mais evidentes em função da raça ($n=21$). A soma das percentagens é maior do que 100% pois dentro de cada exploração inquerida existiram mais que do uma raça afetada.

A presença de linhas de água nas explorações (Gráfico 6) é um fator relevante na ecologia dos *Culicoides*, uma vez que estas zonas fornecem condições ideais para a oviposição e desenvolvimento larvar. Os *Culicoides* dependem de ambientes húmidos, ricos em matéria orgânica, para completar o seu ciclo de vida, o que pode favorecer a manutenção das populações e, conseqüentemente, o risco de transmissão do VDHE.

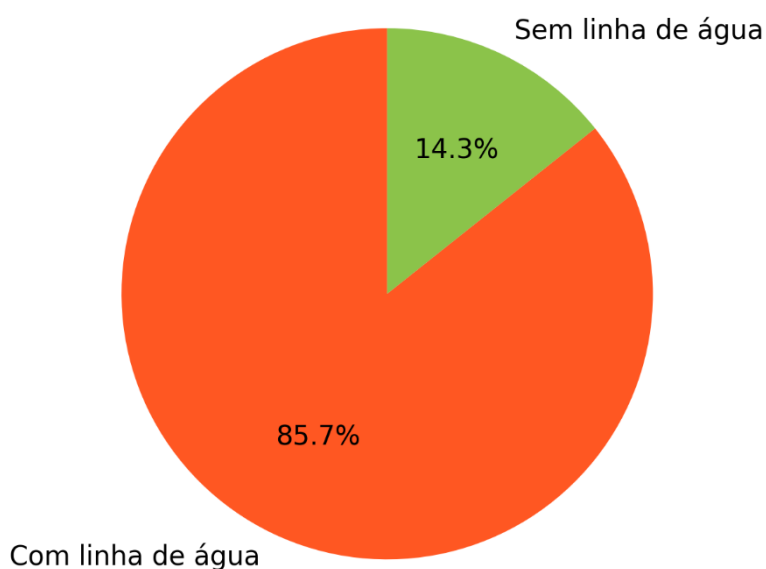


Gráfico 6 – Presença de linhas de água nas explorações ($n=21$)

O Gráfico 7 permite identificar os sinais mais frequentemente relatados pelos produtores. As manifestações clínicas mais frequentes foram alterações morfológicas da cavidade oral e protusão da língua (17,1%), seguidas de erosões e ulcerações da mucosa nasal (15,9%), rinorreia (14,6%), claudicações (14,6%), hiperemia conjuntival (8,5%), caquexia (7,3%), diarreia hemorrágica (7,3%), anorexia (7,3%), hiperemia da glândula mamária (4,9%), sialorreia (1,2%) e edema submandibular (1,2%). Estes dados sugerem um padrão clínico compatível com a infecção pelo VDHE.

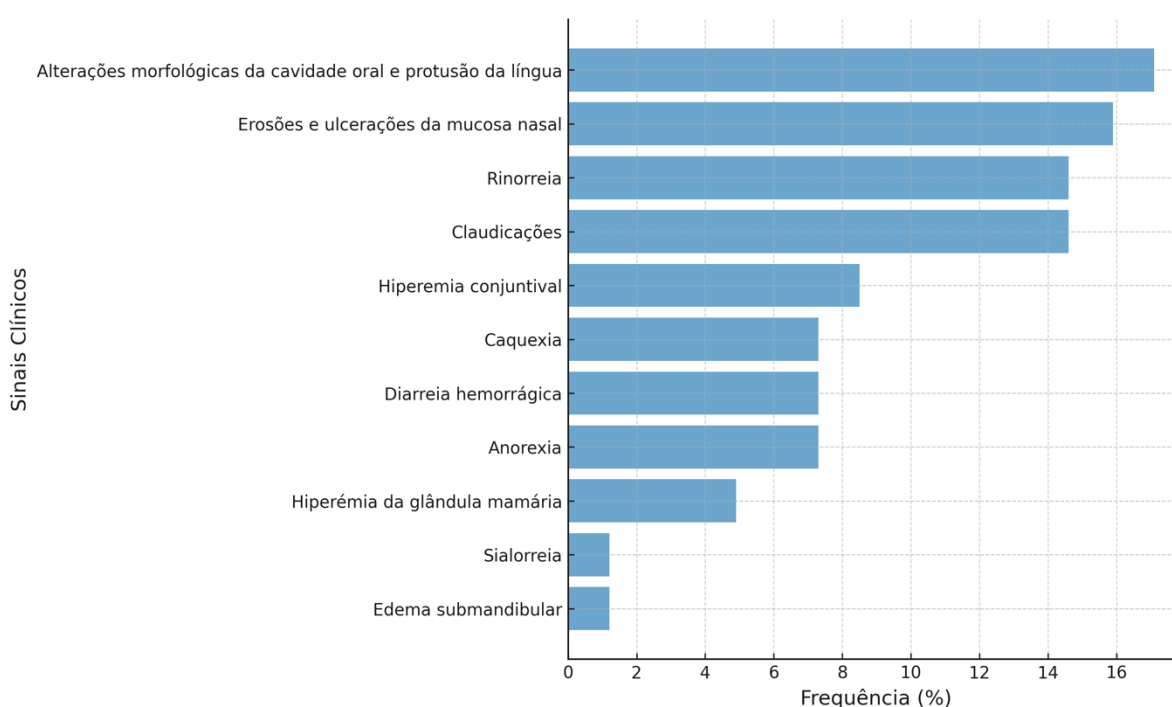


Gráfico 7 – Distribuição dos sinais clínicos evidenciados pelos animais das 21 explorações inquiridas

Alguns dos sinais clínicos descritos no Gráfico 7 podem ser observados na Figura 11.

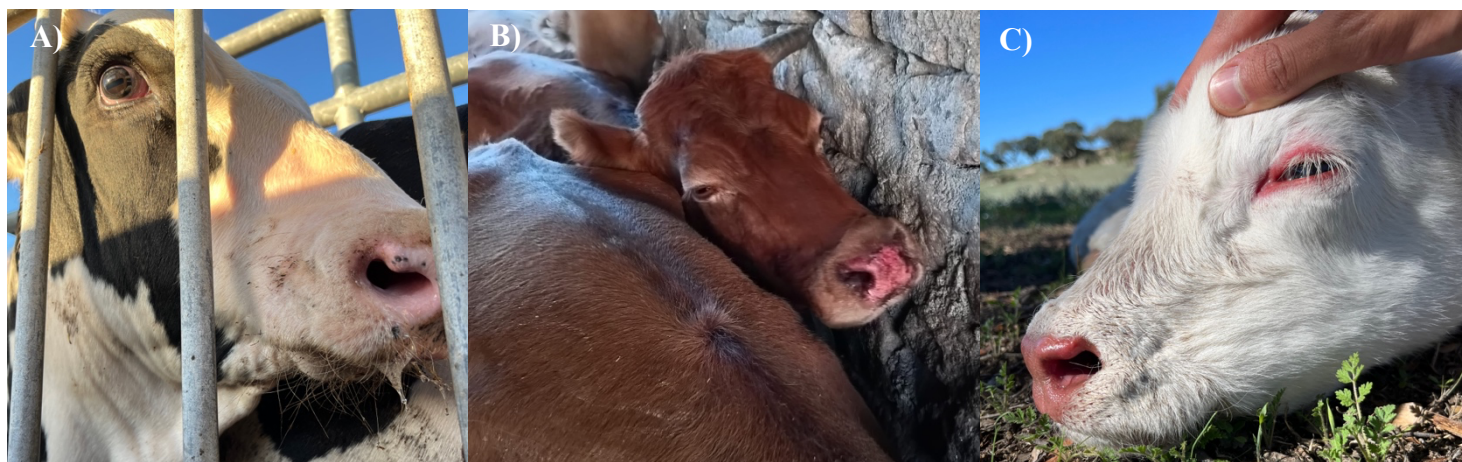


Figura 11 – Sinais clínicos evidenciados pelos animais doentes que são compatíveis com a DHE. A) hiperemia conjuntival, rinorreia e sialorreia, B) hiperemia nasal, lesões ulcerativas e necróticas da mucosa nasal e C) hiperemia conjuntival e nasal (Fotos originais do autor)

A taxa de morbilidade intrarrebanho variou entre 0,61% e 51,42% no conjunto das explorações inquiridas, enquanto o valor máximo referente à taxa de mortalidade não ultrapassou 3,75% em todas as explorações.

4. Discussão

Com o presente trabalho pretendeu-se detetar a presença do VDHE em amostras de insetos *Culicoides* capturados na região da Zebreira, Concelho de Idanha-a-Nova. Os resultados obtidos mostraram a presença do vírus nas três zonas de captura definidas no estudo (Z1, Z2 e Z3), o que se revelou consistente com os padrões esperados para esta região, onde existe uma elevada presença de gado bovino. É importante que as recolhas tenham sido feitas em vários locais da exploração, pois só assim é possível obter informação representativa sobre a presença e distribuição dos insetos do género *Culicoides*, dentro da exploração (Ramilo, 2016; Ribeiro *et al.*, 2015).

As amostras foram recolhidas em setembro, outubro e novembro, período de maior risco de transmissão, coincidindo com temperaturas médias mais elevadas e relatos de surtos e casos positivos de DHE, coincidindo com os resultados fornecidos pela DGAV, que descreve a circulação do vírus da DHE na região à data do presente estudo (DGAV, 2023). As capturas apresentaram uma quantidade volumosa e contínua de insetos do género *Culicoides imicola*, o que se encontra em conformidade com estudos prévios realizados nesta zona (Ribeiro *et al.*, 2015; Rawlings *et al.*, 1997), em que a espécie demonstrou atividade durante todo o ano. As armadilhas colocadas no campo foram do modelo utilizado em estudos epidemiológicos anteriores (Ribeiro *et al.*, 2015; Capela *et al.*, 2003), mostrando uma padronização no processo de captura dos insetos.

A identificação morfológica foi efetuada através dos padrões de asas dos insetos (Ramilo, 2016) como se encontra detalhado na Figura 8. A amplificação por PCR de um fragmento da região *ITS1* do género *Culicoides* foi realizada após a identificação morfológica e extração dos ácidos nucleicos dos insetos. Esta identificação prévia é importante pois confirma a taxonomia dos insetos, valida a integridade e qualidade dos ácidos nucleicos isolados e permite confirmar a ausência de inibidores da DNA polimerase que poderia comprometer a deteção molecular do VDHE (Ramilo, 2016; Viennet *et al.*, 2012; Meiswinkel *et al.*, 2004).

A deteção do VDHE, por RT-PCR em tempo real foi possível através da amplificação do gene *Seg-9* do genoma do VDHE, pois existem evidências que

demonstram que esta técnica apresenta uma elevada especificidade e sensibilidade na amplificação do RNA viral, em comparação com outros métodos de diagnóstico (Viarouge *et al.*, 2015). Esta técnica permite, ainda, detetar a estirpe do vírus independentemente do serotipo, embora tal não tenha sido o objetivo do presente trabalho (Maan *et al.*, 2016). Este método é descrito por vários autores para o diagnóstico da infeção pelo VDHE (Christiane O. L. Licínio, Flávio M. Ayres, 2021; Kawanami *et al.*, 2018).

A amplificação do RNA do VDHE foi conseguida em 13 das 19 amostras em estudo (68%); 6 amostras (32%) foram negativas para a presença do vírus. Desta forma, é possível afirmar que o vírus se encontrava em circulação pela região estudada no período das capturas, o que coincide com a informação publicada pela DGAV que, à data de 3 de novembro de 2023, descreve, no Distrito de Castelo Branco, a existência explorações pecuárias com bovinos positivos. Os resultados divulgados pela DGAV dão, ainda, conta da presença no Distrito de cervídeos positivos para o VDHE.

Segundo informação recolhida a 21 produtores da região, expressa nos Gráficos 3 a 7 e na Tabela 6, foi possível identificar nos animais sinais clínicos compatíveis com a DHE, sendo esta informação crucial para estimar as taxas de mortalidade e morbilidade, possivelmente, devidas à DHE no Concelho de Idanha-a-Nova. A recolha destes dados epidemiológicos é de extrema importância para a monitorização da dinâmica de transmissão do vírus e para elaboração de estratégias com vista a conter a disseminação do VDHE em ruminantes.

A análise da distribuição das explorações em função do regime de produção (Gráfico 3) revelou uma predominância de sistemas extensivos (90,5%), com apenas 4,8% das explorações operando sob regimes intensivos e 4,8% sob regimes semi-intensivos. Esta tendência é corroborada pela distribuição dos animais das explorações em função do regime (Gráfico 4), onde 85,7% dos animais se encontravam a campo, 9,5% num regime misto (a campo e estabulados) e 4,8% estabulados a tempo inteiro. Estes dados evidenciam que a maior parte das explorações e dos animais está exposta a condições ambientais externas, o que pode aumentar o contacto com os vetores responsáveis pela transmissão do VDHE, conforme descrito por Mellor *et al.* (2000).

Adicionalmente, a Tabela 6 permitiu identificar variáveis críticas, tais como o ecossistema das explorações, o número total de animais e o número de animais afetados dentro de cada exploração individualmente, a idade dos animais afetados, e o facto de ter sido feita a desinsetização em cada exploração. Estes fatores podem influenciar o risco de infeção e a propagação do vírus (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023; Mellor *et al.*, 2000).

No que respeita à distribuição dos animais com sinais clínicos mais evidentes em função da raça (Gráfico 5), observou-se que, apesar da soma das percentagens ultrapassar os 100% (devido à presença de mais de uma raça afetada em cada exploração) os sinais clínicos apresentam um padrão heterogéneo. Esta sobreposição indica que a suscetibilidade à doença não se restringe a uma única raça, evidenciando a necessidade de estratégias de controlo que considerem a diversidade genética das populações afetadas (Golender *et al.*, 2021).

A presença de linhas de água nas explorações (Gráfico 6) foi, também, um fator determinante, uma vez que ambientes aquáticos, associados à disponibilidade de matéria orgânica, criam condições ideais para a oviposição e desenvolvimento das larvas de *Culicoides* (Kettle, 1997).

As taxas de morbilidade (0,61%-51,42%) e mortalidade (3,75%) observadas neste estudo são semelhantes aos valores observados noutros surtos recentes descritos noutros países como a Tunísia, Itália ou Israel, onde se verificaram taxas de morbilidade entre 5% e 80%, e de mortalidade de 1% (Alessio Lorusso *et al.*, 2023; Sghaier *et al.*, 2022; Golender *et al.*, 2017; Yadin *et al.*, 2008). Estes valores relativos são referentes ao serotipo VDHE-8. Os estudos relativos a este serotipo em ruminantes domésticos são escassos, quando comparados com outros serotipos e com ruminantes selvagens. Embora os primeiros surtos de DHE sejam, geralmente, associados a taxas elevadas de morbilidade e mortalidade (Mellor *et al.*, 2000), os resultados do questionário efetuado aos produtores indicam taxas de morbilidade significativamente baixas (0,61%), o que pode ser explicado pela variabilidade na virulência dos diferentes sorotipos e pela heterogeneidade na resposta imune dos hospedeiros (Jiménez-Cabello *et al.*, 2023). Os valores de taxas de mortalidade e morbilidade estão descritos, maioritariamente, para espécies de cervídeos, sendo estes valores menos

comuns em bovinos, como é possível verificar no relatório de revisão sistemática de literatura desenvolvido por Santos *et al.* (2023). Estas taxas, assim como o potencial patogénico de cada serotipo, são bastante variáveis e dependentes da espécie animal, idade, sexo, raça e adaptabilidade às condições edafoclimáticas, assim como do sistema de produção presente (Bocanegra, 2024; Omori *et al.*, 1969).

Os sinais clínicos descritos na literatura vão desde pirexia/hiperemia a lesões ulcerativas e necróticas na mucosa oral, língua e na região nasal (que resultam em disfagia e anorexia, com consequente caquexia), claudicações associadas a coronite e alterações no crescimento dos cascos, hiperémia do úbere, diminuição na produção de leite, hiperemia conjuntival, rinorreia e sialorreia (Bocanegra, 2024; Alessio Lorusso *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023; Golender *et al.*, 2017; Golender *et al.*, 2021). Existe uma concordância entre os sinais clínicos relatados pelos produtores da região (Gráfico 7 e Figura 11) com os sinais clínicos descritos na literatura (Alessio Lorusso *et al.*, 2023; Golender *et al.*, 2017; Golender *et al.*, 2021). Os sinais clínicos relatados pelos produtores assim como as taxas de mortalidade e morbilidade calculadas através dos questionários, refletem a realidade observada em surtos anteriores no Mediterrâneo, em que a introdução inicial do vírus resultou em taxas de morbilidade e mortalidade significativas, sendo esperado que surtos em áreas previamente não afetadas, como é o caso de Portugal, resultem em taxas de morbilidade e mortalidade mais elevadas nas primeiras incidências, tal como ocorreu no Japão em 1959 (Omori *et al.*, 1969).

Tal como referido por Jiménez-Cabello *et al.* (2023), a doença, em Portugal, afetou a saúde e BEA animal, prejudicou as economias locais, regionais e nacionais, assim como implementou restrições ao movimento dos animais.

Em 11 das 21 explorações inquiridas, os produtores referem que realizaram a desinsetização um mês antes de surgirem os sinais clínicos nos animais; não obstante, a DHE acabou por afetar estas explorações. A DGAV, após a identificação do vírus em território nacional, recomendava o reforço de medidas de higiene assim como a aplicação de inseticidas para desinsetização das instalações para controlo vetorial, bem como os veículos de transporte. Porém, a eficácia da desinsetização depende da correta aplicação e abrangência do produto utilizado, não estando garantida proteção total (Carpenter *et al.*, 2008). O produto pode não atingir todas as áreas onde os vetores

residem, locais com matéria orgânica em decomposição ou águas estagnadas, locais propícios para reprodução dos insetos do género *Culicoides*. A migração de novos vetores de áreas vizinhas ou a presença de populações resistentes pode reintroduzir o vírus em zonas supostamente controladas (Mellor *et al.*, 2000). Existem estudos que documentam a resistência de insetos a piretroides, tais como a deltametrina e a cipermetrina. No estudo realizado por De Keyser *et al.*, (2017) foi demonstrado que *Culicoides nubeculosus* apresentaram menor suscetibilidade à deltametrina, evidenciado o risco de resistência em vetores submetidos a tratamento constante. Os inseticidas podem ter ação repelente ou letal temporária, mas não eliminam completamente a população de vetores. Por exemplo, moléculas piretroides apresentam eficácia limitada a longo prazo, como discutido noutros estudos por Narladkar *et al.* (2006) e Naqqash *et al.* (2016), que referem que o uso contínuo de inseticidas pode reduzir a eficácia devido a fatores como a degradação ambiental e resistência genética.

A amostra populacional utilizada neste estudo foi relativamente pequena (21 produtores), o que se deveu a várias limitações do trabalho, nomeadamente à disponibilidade restrita dos participantes e à escassez de tempo disponível para a recolha de dados. Adicionalmente, a recolha de dados através das armadilhas para a captura de insetos do género *Culicoides* também enfrentou obstáculos, como a falta de recursos e de condições logísticas para a instalação de mais equipamentos de captura em locais mais diversificados. Estas limitações influenciaram o volume de dados recolhidos, quer em termos de inquéritos, quer de amostras biológicas, o que pode ter impactado a representatividade global dos resultados obtidos.

Que seja do conhecimento do autor, o presente estudo foi o primeiro a realizar a deteção molecular do VDHE em insetos do género *Culicoides* no Concelho de Idanha-a-Nova. Dada a escassez de informação em Portugal e em grande parte da Europa sobre a propagação do vírus, o trabalho realizado assume-se como pioneiro ao documentar a circulação do vírus na região, em amostras de insetos do género *Culicoides* capturados numa exploração de ruminantes domésticos. A importância deste trabalho reside na sua capacidade de fornecer dados essenciais sobre

a presença do VDHE na região e os seus potenciais impactos na saúde animal, e ser um auxiliar à implementação de medidas de vigilância e controlo eficazes.

5. Conclusões

O estudo realizado no presente trabalho atingiu o objetivo proposto ao confirmar a deteção do VDHE em amostras de insetos do género *Culicoides*, recolhidas na região da Zebreira, Concelho de Idanha-a-Nova, nos meses de setembro, outubro e novembro de 2023, contribuindo, desta forma, para o aumento do conhecimento da epidemiologia da Doença Hemorrágica Epizootica.

A amplificação do gene *Seg-9* do VDHE foi possível em 68,4% das amostras de insetos do género *Culicoides* capturadas. Esta informação justifica a manifestação dos sinais clínicos compatíveis com a DHE, descritos por produtores de bovinos que responderam ao questionário. Através do questionário, foi também possível estimar a taxa de morbilidade, que variou entre 0,61% e 51,42%, e a taxa de mortalidade, que não ultrapassou os 3,75% intrarrebanho, no conjunto das explorações inquiridas.

Os resultados do presente estudo evidenciam a necessidade realizar estudos mais alargados e abrangentes que permitam obter mais informação sobre a variação da fauna de *Culicoides* ao longo do tempo e as áreas de risco dentro do território português. Só assim será possível estabelecer sistemas de vigilância e controlo viáveis, para que se possa atuar de forma rápida e precisa aquando da ocorrência de novos surtos, salvaguardando o bem-estar animal, assim como minimizando o impacto económico nacional gerado pelas perdas produtivas.

6. Referências bibliográficas

- Alessio Lorusso, Stefano Cappai, Frederica Loi, Luigia Pinna, Angelo Ruiiu, Giontonella Puggioni, & Annalisa Guercio. (2023). Italy 8 2023. *Emerging Infectious Diseases*, 29(5), 1063–1065. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2360>
- Anjali, C., Sharma, Y., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2012). Neem oil (Azadirachta indica) nanoemulsion-a potent larvicidal agent against Culex quinquefasciatus. *Pest Management Science*, 68(2), 158–163. <https://doi.org/10.1002/ps.2233>
- Anthony, S. J., Maan, S., Maan, N., Kgosana, L., Bachanek-Bankowska, K., Batten, C., Darpel, K. E., Sutton, G., Attoui, H., & Mertens, P. P. C. (2009). Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): Comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup. *Virus Research*, 145(2), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.012>
- Behar, A., Friedgut, O., Rotenberg, D., Zalesky, O., Izhaki, O., Yulzary, A., Rot, A., Wolkomirsky, R., Zamir, L., Hmd, F., & Brenner, J. (2022). Insights on Transmission, Spread, and Possible Endemization of Selected Arboviruses in Israel—Interim Results from Five-Year Surveillance. *Veterinary Sciences*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/vetsci9020065>
- Benelli, G., Conti, B., Garreffa, R., & Nicoletti, M. (2014). Shedding light on bioactivity of botanical by-products: Neem cake compounds deter oviposition of the arbovirus vector Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in the field. *Parasitology Research*, 113(3), 933–940. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3725-4>
- Benelli, G., Murugan, K., Panneerselvam, C., Madhiyazhagan, P., Conti, B., & Nicoletti, M. (2015). Old ingredients for a new recipe? Neem cake, a low-cost botanical by-product in the fight against mosquito-borne diseases. In *Parasitology Research* (Vol. 114, Issue 2, pp. 391–397). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4286-x>

Blackwell, A., Evans, K. A., & Strang, R. H. C. (2004). *Toward development of neem-based repellents against the Scottish Highland biting midge Culicoides impunctatus*. <http://www.afpmb.org>.

Borkent, A., & Dominiak, P. (2020). Catalog of the biting midges of the world (Diptera: Ceratopogonidae). In *Zootaxa* (Vol. 4787, Issue 1, pp. 1–377). Magnolia Press. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>

Braverman, Y., & Chechik, F. (1996). Air streams and the introduction of animal diseases borne on Culicoides (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel *. In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 15, Issue 3).

Capela, R., Purse, B. V., Pena, I., Wittman, E. J., Margarita, Y., Capela, M., ... & Baylis, M. (2003). Spatial distribution of Culicoides species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(2), 165-177.

Carpenter, S., Groschup, M. H., Garros, C., Felipe-Bauer, M. L., & Purse, B. V. (2013). Culicoides biting midges, arboviruses and public health in Europe. In *Antiviral Research* (Vol. 100, Issue 1, pp. 102–113). <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.020>

Carpenter, S., Mellor, P. S., & Torr, S. J. (2008). Control techniques for Culicoides biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. In *Medical and Veterinary Entomology* (Vol. 22, Issue 3, pp. 175–187). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00743.x>

Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delécolle, J.-C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., & Albina, E. (2004). Molecular detection of Culicoides spp. and Culicoides imicola, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet. Res*, 35(3), 325–337. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004015i>

Chaker, E. (1981). Contribution à l'étude des Culicoides (Diptera, Ceratopogonidae) de Tunisie. Systematics, Chorology and Ecology.

Chandramohan, B., Murugan, K., Panneerselvam, C., Madhiyazhagan, P., Chandirasekar, R., Dinesh, D., Kumar, P. M., Kovendan, K., Suresh, U.,

Subramaniam, J., Rajaganesh, R., Aziz, A. T., Syuhei, B., Alsalhi, M. S., Devanesan, S., Nicoletti, M., Wei, H., & Benelli, G. (2016). Characterization and mosquitocidal potential of neem cake-synthesized silver nanoparticles: genotoxicity and impact on predation efficiency of mosquito natural enemies. *Parasitology Research*, 115(3), 1015–1025. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4829-9>

Connelly, C. R. (2013). Biting midges, no-see-ums *Culicoides* spp. (Insecta: Diptera: Ceratopogonidae). *EDIS*, 2013(5). <https://doi.org/10.32473/edis-in626-2013>

Conte, A., Goffredo, M., Ippoliti, C., & Meiswinkel, R. (2007). Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the Obsoletus Complex in Italy. *Veterinary Parasitology*, 150(4), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.021>

De Keyser, R., Cassidy, C., Laban, S., Gopal, P., Pickett, J. A., Reddy, Y. K., ... & Logan, J. G. (2017). Insecticidal effects of deltamethrin in laboratory and field populations of *Culicoides* species: how effective are host-contact reduction methods in India?. *Parasites & vectors*, 10, 1-11.

De Regge, N., De Deken, R., Fassotte, C., Losson, B., Deblauwe, I., Madder, M., Vantieghem, P., Tomme, M., Smeets, F., & Cay, A. B. (2015). *Culicoides* monitoring in Belgium in 2011: Analysis of spatiotemporal abundance, species diversity and Schmallenberg virus detection. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(3), 263–275. <https://doi.org/10.1111/mve.12109>

Delrio, G. A. V. I. N. O. , D. S. A. L. V. A. T. O. R. E. , F. C. I. P. R. I. A. N. O. , P. R. A. , & P. S. (2002). Osservazioni in Sardegna sulla dinamica di popolazione di *Culicoides imicola* Kieffer vettore della Bluetongue. *XIX Congresso Nazionale Italiano Di Entomologia* , 10–15.

Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. (2023). Edital n.º 4 – Doença Hemorrágica Epizootica (atualização 03/11/2023).

Drake, V. A., & Farrow, R. A. (1988). THE INFLUENCE OF ATMOSPHERIC STRUCTURE AND MOTIONS ON INSECT MIGRATION. In *Ann. Rev. Entomol* (Vol. 33). www.annualreviews.org

Dua, V. K., Pandey, A. C., Raghavendra, K., Gupta, A., Sharma, T., & Dash, A. P. (2009). Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-124>

Duan, Y., Yang, Z., Zhu, P., Xiao, L., Li, Z., Li, Z., Li, L., & Zhu, J. (2022). A serologic investigation of epizootic hemorrhagic disease virus in China between 2014 and 2019. *Virologica Sinica*, 37(4), 513–520. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.06.005>

Ducheyne, E., De Deken, R., Bécu, S., Codina, B., Nomikou, K., Mangana-Vougiaki, O., Georgiev, G., Purse, B. V., & Hendrickx, G. (2007). *Quantifying the wind dispersal of Culicoides species in Greece and Bulgaria*. <http://www.alexandria.ucsb.edu>

Edgar F. Garrett, Eleonora Po, Elena R. Bichi, Suzette K. Hexum, Robert Melcher, & Andrew M. Hubner. (2015). Clinical disease associated with epizootic hemorrhagic disease virus in cattle in Illinois. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247(2), 190–195.

EFSA Journal, (2008), 6(7). (2008). Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on request from the Commission on bluetongue. *EFSA Journal*, 6(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.735>

Faheem Ahmad, & Rakesh Pandey. (2024). *Oilseed cake for nematode management*. <https://www.researchgate.net/publication/371867948>

Fauna Europaea (2024). Taxonomic Hierarchy. Acedido em 13 de Maio 2024 em <https://www.gbif.org/species/1631084>

Federici, V., Ippoliti, C., Goffredo, M., Catalani, M., Di Provvido, A., Santilli, A., Quaglia, M., Mancini, G., Di Nicola, F., Di Gennaro, A., Leone, A., Teodori, L., Conte, A., & Savini, G. (2016). Malattia emorragica epizootica del cervo in Italia: Competenza vettoriale delle specie di *Culicoides* indigene e valutazione del rischio di diffusione della malattia. *Veterinaria Italiana*, 52(3–4), 271–279. <https://doi.org/10.12834/VetIt.894.4516.2>

Foster, N. M., Breckon, R. D., Luedke, A. J., Jones, R. H., & Metcalf, H. E. (1977). TRANSMISSION OF TWO STRAINS OF EPIZOOTIC HEMORRHAGIC

DISEASE VIRUS IN DEER BY *Culicoides variipennis*. In *Journal of Wildlife Diseases* (Vol. 13). http://meridian.allenpress.com/jwd/article-pdf/13/1/9/2226112/0090-3558-13_1_9.pdf

Foxi, C., & Delrio, G. (2010). Larval habitats and seasonal abundance of *Culicoides* biting midges found in association with sheep in northern Sardinia, Italy. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(2), 199–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00861.x>

Foxi, C., Delrio, G., Falchi, G., Marche, M. G., Satta, G., & Ruiiu, L. (2016). Role of different *Culicoides* vectors (Diptera: Ceratopogonidae) in bluetongue virus transmission and overwintering in Sardinia (Italy). *Parasites & Vectors*, 9, 1-13.

Franco, A. O., Gomes, M. G. M., Rowland, M., Coleman, P. G., & Davies, C. R. (2014). Controlling malaria using livestock-based interventions: A one health approach. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101699>

Gao, H., Wang, L., Ma, J., Gao, X., Xiao, J., & Wang, H. (2021). Modeling the current distribution suitability and future dynamics of *Culicoides imicola* under climate change scenarios. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.12308>

García Bocanegra, I. (2024). *Epizootic haemorrhagic disease (EHD): An emerging risk in Europe* (4.2). European Food Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2024-01/4.2-ehd-epizootic-haemorrhagic-disease-emerg-risk.pdf>

Gaydos, J. K., Davidson, W. R., Ois Elvinger, F., Howerth, E. W., Murphy, M., & Stallknecht, D. E. (2002). CROSS-PROTECTION BETWEEN EPIZOOTIC HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS SEROTYPES 1 AND 2 IN WHITE-TAILED DEER. In *Journal of Wildlife Diseases* (Vol. 38, Issue 4). http://meridian.allenpress.com/jwd/article-pdf/38/4/720/2233634/0090-3558-38_4_720.pdf

Goffredo, M., Catalani, M., Federici, V., Portanti, O., Marini, V., Mancini, G., Quaglia, M., Santilli, A., Teodori, L., & Savini, G. (2015). Vector species of

Culicoides midges implicated in the 2012-2014 Bluetongue epidemics in Italy. *Veterinaria Italiana*, 51(2), 131–138. <https://doi.org/10.12834/VetIt.771.3854.1>

Goffredo, M., Romeo, G., Monaco, F., Gennaro, A. Di, & Savini, G. (2004). Laboratory survival and blood feeding response of wild-caught *Culicoides obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) through natural and artificial membranes. In *Epidemiology and vectors Vet. Ital* (Vol. 40, Issue 3).

Golender, N., Bumbarov, V., Kovtunenkov, A., David, D., Guini-rubinstein, M., Sol, A., Beer, M., Eldar, A., & Wernike, K. (2021). Identification and genetic characterization of viral pathogens in ruminant gestation abnormalities, Israel, 2015–2019. *Viruses*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/v13112136>

Golender, N., Khinich, Y., Gorohov, A., Abramovitz, I., & Bumbarov, V. (2017). Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 outbreak in Israeli cattle in 2015. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(6), 885–888. <https://doi.org/10.1177/1040638717726826>

Gomulski, L. M., Meiswinkel, R., Delécolle, J. C., Goffredo, M., & Gasperi, G. (2005). Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology*, 30(4), 619–631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00286.x>

Goto, M. (1959). Pathological studies on so-called bovine influenza. I. Changes in the visceral organs.

Hendrickx, G., Gilbert, M., Staubach, C., Elbers, A., Mintiens, K., Gerbier, G., & Ducheyne, E. (2008). A wind density model to quantify the airborne spread of *Culicoides* species during north-western Europe bluetongue epidemic, 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, 87(1–2), 162–181. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.06.009>

Hudson, A. R., McGregor, B. L., Shults, P., England, M., Silbernagel, C., Mayo, C., Carpenter, M., Sherman, T. J., & Cohnstaedt, L. W. (2023). *Culicoides*-borne

Orbivirus epidemiology in a changing climate. *Journal of Medical Entomology*, 60(6), 1221–1229. <https://doi.org/10.1093/jme/tjad098>

Inaba, Y. (1975). IBARAKI DISEASE AND ITS RELATIONSHIP TO BLUETONGUE.

J Gibbs, E. P., & P Lawman, hf J. (1977). INFECTION OF BRITISH DEER AND FARM ANIMALS WITH EPIZOOTIC HAEMORRHAGIC DISEASE OF DEER VIRUS.

Jiménez-Cabello, L., Utrilla-Trigo, S., Lorenzo, G., Ortego, J., & Calvo-Pinilla, E. (2023). Epizootic Hemorrhagic Disease Virus: Current Knowledge and Emerging Perspectives. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051339>

Kawanami, A. E., Oliveira, J. P. D., Arenales, A., Crossley, B., Woods, L. W., Duarte, J., & Werther, K. (2018). Detection of bluetongue virus in Brazilian cervids in São Paulo state. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, 137-142.

Kedmi, M., Levi, S., Galon, N., Bomborov, V., Yadin, H., Batten, C., & Klement, E. (2011). No evidence for involvement of sheep in the epidemiology of cattle virulent epizootic hemorrhagic disease virus. *Veterinary Microbiology*, 148(2–4), 408–412. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.09.015>

Kettle, D. S. (1977). *BIOLOGY AND BIONOMICS OF BLOODSUCKING CERATOPOGONIDS*. www.annualreviews.org

Li, G. Q., Hu, Y. L., Kanu, S., & Zhu, X. Q. (2003). PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawae*. *Veterinary parasitology*, 112(1-2), 101-108

Licínio, C. O., & Ayres, F. M. (2021). The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 57, e2882021.

Lee, H., Calvin, K., Dasgupta, D., Krinner, G., Mukherji, A., Thorne, P., ... & Park, Y. (2023). IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report, Summary for Policymakers. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment

Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.

Leta, S., Fetene, E., Mulatu, T., Amenu, K., Jaleta, M. B., Beyene, T. J., Negussie, H., & Revie, C. W. (2019). Modeling the global distribution of *Culicoides imicola*: an Ensemble approach. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50765-1>

Maan, N. S., Maan, S., Potgieter, A. C., Wright, I. M., Belaganahalli, M., & Mertens, P. P. C. (2016). Development of Real-Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1120–1132. <https://doi.org/10.1111/tbed.12477>

MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (Eds.). (2011). *Fenner's veterinary virology*. Academic press.

Mahmoud, A., Danzetta, M. L., di Sabatino, D., Spedicato, M., Alkhatal, Z., Dayhum, A., Tolari, F., Forzan, M., Mazzei, M., & Savini, G. (2021). First seroprevalence investigation of epizootic haemorrhagic disease virus in Libya. *Open Veterinary Journal*, 11(2), 301–308. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i2.15>

Martínez-de la Puente, J., Figuerola, J., & Soriguer, R. (2015). Fur or feather? Feeding preferences of species of *Culicoides* biting midges in Europe. In *Trends in Parasitology* (Vol. 31, Issue 1, pp. 16–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.002>

Mayo, C., McDermott, E., Kopanke, J., Stenglein, M., Lee, J., Mathiason, C., Carpenter, M., Reed, K., & Perkins, T. A. (2020). Ecological Dynamics Impacting Bluetongue Virus Transmission in North America. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00186>

Meiswinkel, R. (1997). Discovery of a *Culicoides imicola*-free zone in South Africa: preliminary notes and potential significance. In *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* (Vol. 64).

Meiswinkel, R., Gomulski, L. M., Delécolle, J. C., Goffredo, M., & Gasperi, G. (2004). The taxonomy of Culicoides vector complexes-unfinished business. *Vet Ital*, 40(3), 151-159.

Mellor, P. S., Boorman, J., & Baylis, M. (2000). CULICOIDES BITING MIDGES: Their Role as Arbovirus Vectors. In *Annu. Rev. Entomol* (Vol. 45). www.annualreviews.org

Naqqash, M. N., Gökçe, A., Bakhsh, A., & Salim, M. (2016). Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology research*, 115, 1363-1373.

Narladkar, B. W., Deshpande, P. D., Vaniprasad, V., Shivpuje, P. R., & Deshpande, A. R. (2006). Integrated management of Culicoides sp. of domesticated animals. *Journal of Veterinary Parasitology*, 20(2), 125-128.

Natalia Golender, Yevgeny Khinich, Michael Bernstein, Nir Edery, Marisol Guini, Evgeny Eyngor, & Velizar Bumbarov. (2019). Placenta e brain Israel . *HSOA Journal of Dairy Research & Technology*.

Nevill, E. M. (1967). Biological studies on some South African Culicoides species (Diptera: Ceratopogonidae) and the morphology of their immature stages. University of Pretoria (South Africa).

Nicoletti, M., Maccioni, O., Coccioletti, T., Mariani, S., & Vitali, F. (2012). Neem tree (Azadirachta indica A. Juss) as source of bioinsectides. *Insecticides-Advances in Integrated Pest Management*, 1-20.

Nicoletti, M., Mariani, S., MacCioni, O., Coccioletti, T., & Murugan, K. (2012). Neem cake: Chemical composition and larvicidal activity on Asian tiger mosquito. *Parasitology Research*, 111(1), 205–213. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2819-8>

Nicoletti, M., Murugan, K., & Serrone, P. Del. (2014). *Trends in Vector Research and Parasitology Current mosquito-borne disease emergencies in Italy and climate changes. The neem opportunity*. <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2054-9881-1-1.pdf>

- Nicoletti, M., Serafini, M., Aliboni, A., D'Andrea, A., & Mariani, S. (2010). Toxic effects of neem cake extracts on *Aedes albopictus* (Skuse) larvae. *Parasitology Research*, 107(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1838-6>
- Nol, P., Kato, C., Reeves, W. K., Rhyan, J., Spraker, T., Gidlewski, T., Vercauteren, K., & Salman, M. (2010). Epizootic hemorrhagic disease outbreak in a captive facility housing white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), bison (*Bison bison*), elk (*Cervus elaphus*), cattle (*Bos taurus*), and goats (*Capra hircus*) in Colorado, USA. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(3), 510–515. <https://doi.org/10.1638/2009-0216.1>
- Ohashi, S., Yoshida, K., Watanabe, Y., & Tsuda, T. (1999). Identification and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of a Variant of the Ibaraki Virus from Naturally Infected Cattle and Aborted Fetuses in Japan. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 37, Issue 12). <https://journals.asm.org/journal/jcm>
- Omori, T., Inaba, Y., Morimoto, T., Tanaka, Y., Ishitani, R., Kurogi, H., Munakata, K., Matsuda, K., & Matumoto, M. (1969). Ibaraki Virus, an Agent of Epizootic Disease of Cattle Resembling Bluetongue I. Epidemiologic, Clinical and Pathologic Observations and Experimental Transmission to Calves. In *J. Microbiol* (Vol. 13, Issue 2).
- Pedgley, D. E. (1983). Windborne spread of insect-transmitted diseases of animals and man. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 302(1111), 463–470. <https://doi.org/10.1098/rstb.1983.0068>
- Pereira, E. M. N., Nishida, T., Tokunaga, R., Iwata, H., & Inoue, T. (2000). Cloning and Expression of the M5 RNA Segment Encoding Outer Capsid VP5 of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Japan Serotype 2, Ibaraki Virus. In *J. Vet. Med. Sci* (Vol. 62, Issue 3).
- Pirbright, & Surrey, U. K. (1997). Spatial and seasonal distribution of *Culicoides imicola* in Iberia in relation to the transmission of African horse sickness virus PETER RAWLINGS, MARIA-JOSE PRO, * ISABEL PENA, + MARÍA-DOLores Ortega I: and RUBEN CAPELA t. In *Medical and Veterinary Entomology* (Vol. 11).

Purse, B. V., Carpenter, S., Venter, G. J., Bellis, G., & Mullens, B. A. (2015). Bionomics of temperate and tropical Culicoides midges: Knowledge gaps and consequences for transmission of Culicoides-borne viruses. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 60, pp. 373–392). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020614>

Quaglia, M., Foxi, C., Satta, G., Puggioni, G., Bechere, R., De Ascentis, M., D'alessio, S. G., Spedicato, M., Leone, A., Piscicella, M., Portanti, O., Teodori, L., Di Gialleonardo, L., Cammà, C., Savini, G., & Goffredo, M. (2023). Culicoides species responsible for the transmission of Epizootic Haemorrhagic Disease virus (EHDV) serotype 8 in Italy. *Veterinaria Italiana*, 59(1), 83–88. <https://doi.org/10.12834/VetIt.3347.22208.1>

Quist, C. F., Howerth, E. W., Stallknecht, D. E., Brown, J., Piseii, T., & Nettles1, V. F. (1997). *HOST DEFENSE RESPONSES ASSOCIATED WITH EXPERIMENTAL HEMORRHAGIC DISEASE IN WHITE-TAILED DEER* (Vol. 33, Issue 3). http://meridian.allenpress.com/jwd/article-pdf/33/3/584/2236608/0090-3558-33_3_584.pdf

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W. & CONSTABLE, P. D. (2007) Hemorrhagic diseases. In *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. London, W. B. Saunders. p 1305

Ramilo, D. W. R. (2016). Phenotypic and genetic characterization of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in Portugal and comparison of the effect of pyrethroid insecticides in their control (Doctoral dissertation, Universidade de Lisboa (Portugal)).

Rawlings, P., PRO, M. J., Pena, I., ORTEGA, M. D., & Capela, R. (1997). Spatial and seasonal distribution of Culicoides imicola in Iberia in relation to the transmission of African horse sickness virus. *Medical and veterinary entomology*, 11(1), 49-57.

Rádrová, J., Mračková, M., Galková, Z., Lamka, J., Račka, K., Barták, P., & Votýpka, J. (2016). Seasonal dynamics, parity rate, and composition of culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) occurring in the vicinity of wild and domestic ruminants in the

Czech Republic. *Journal of Medical Entomology*, 53(2), 416–424.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjv197>

Redlin, M., & Gries, T. (2021). Anthropogenic climate change: the impact of the global carbon budget. *Theoretical and Applied Climatology*, 146(1–2), 713–721.
<https://doi.org/10.1007/s00704-021-03764-0>

Ribeiro, R., Wilson, A. J., Nunes, T., Ramilo, D. W., Amador, R., Madeira, S., Baptista, F. M., Harrup, L. E., Lucientes, J., & Boinas, F. (2015). Spatial and temporal distribution of culicoides species in mainland Portugal (2005-2010). Results of the Portuguese entomological surveillance programme. *PLoS ONE*, 10(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124019>

Rocklöv, J., & Dubrow, R. (2020). Climate change: an enduring challenge for vector-borne disease prevention and control. In *Nature Immunology* (Vol. 21, Issue 5, pp. 479–483). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0648-y>

Rodrigues, T. C. S., Viadanna, P. H. O., Subramaniam, K., Hawkins, I. K., Jeon, A. B., Loeb, J. C., Krauer, J. M. C., Lednicky, J. A., Wisely, S. M., & Waltzek, T. B. (2022). Characterization of a Novel Reassortant Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serotype 6 Strain Isolated from Diseased White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) on a Florida Farm. *Viruses*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/v14051012>

Sailleau, C., Breard, E., Viarouge, C., Belbis, G., Lilin, T., Vitour, D., & Zientara, S. (2019). Experimental infection of calves with seven serotypes of epizootic hemorrhagic disease virus: Production and characterization of reference sera. *Veterinaria Italiana*, 55(4), 339–346. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2104.11179.1>

Santos, M. A. d. S., Gonzales, J. R., Swanenburg, M., Vidal, G., Evans, D., Horigan, V., ... & Dórea, F. (2023). Epizootic Hemorrhagic Disease (EHD)—Systematic Literature Review report. *EFSA Supporting Publications*, 20(11), 8027E.

Savini, G., Afonso, A., Mellor, P., Aradaib, I., Yadin, H., Sanaa, M., Wilson, W., Monaco, F., & Domingo, M. (2011). Epizootic heamorrhagic disease. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 91, Issue 1, pp. 1–17).
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.004>

Sghaier, S., Sailleau, C., Marcacci, M., Thabet, S., Curini, V., Ben Hassine, T., Teodori, L., Portanti, O., Hammami, S., Jurisic, L., Spedicato, M., Postic, L., Gazani, I., Ben Osman, R., Zientara, S., Bréard, E., Calistri, P., Richt, J. A., Holmes, E. C., ... Lorusso, A. (2022). Epizootic Haemorrhagic Disease Virus Serotype 8 in Tunisia, 2021. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/v15010016>

Shope, R. E., Macnamara, L. G., & Mangold, R. (1959). *A VIRUS-INDUCED EPIZOOTIC HEMORRHAGIC DISEASE OF THE VIRGINIA WHITE-TAILED DEER (ODOCOILEUS VIRGINIANUS)**. <http://rupress.org/jem/article-pdf/111/2/155/1647637/155.pdf>

Sohn, R., & Yuill, T. M. (1991). Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in wild ruminants.

Stallknecht, D. E., Blue, J. L., Roilor, E. A., Nettles, I. F., Davidson, W. R., & Pearson, J. E. (1991). PRECIPITATING ANTIBODIES TO EPIZOOTIC HEMORRHAGIC DISEASE AND BLUETONGUE VIRUSES IN WHITE-TAILED DEER IN THE SOUTHEASTERN UNITED STATES. In *Journal of Wildlife Diseases* (Vol. 27, Issue 2). http://meridian.allenpress.com/jwd/article-pdf/27/2/238/2233339/0090-3558-27_2_238.pdf

Sunwoo, S. Y., Noronha, L. E., Morozov, I., Trujillo, J. D., Kim, I. J., Schirtzinger, E. E., Faburay, B., Drolet, B. S., Urbaniak, K., Scott Mcvey, D., Meekins, D. A., Palmer, M. V., Balaraman, V., Wilson, W. C., & Richt, J. A. (2020). Evaluation of a baculovirus-expressed VP2 subunit vaccine for the protection of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from epizootic hemorrhagic disease. *Vaccines*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/vaccines8010059>

Tabachnick, W. J. (2010). Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epizootics in a changing world. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 946–954. <https://doi.org/10.1242/jeb.037564>

Takamatsu, H., Mellor, P. S., Mertens, P. P. C., Kirkham, P. A., Borroughs, J. N., & Parkhouse, R. M. E. (2003). A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. In *Journal of General Virology* (Vol. 84, Issue 1, pp. 227–235). <https://doi.org/10.1099/vir.0.18705-0>

- Temizel, E. M., Yesilbag, K., Batten, C., Senturk, S., Maan, N. S., Mertens, P. P. C., & Batmaz, H. (2009). Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerging Infectious Diseases*, 15(2), 317–319. <https://doi.org/10.3201/eid1502.080572>
- Thabet, S., Sghaier, S., Ben Hassine, T., Slama, D., Ben Osmane, R., Ben Omrane, R., Mouelhi, W., Spedicato, M., Leone, A., Teodori, L., Curini, V., Othmani, M., Berjaoui, S., Ripà, P., Orabi, M., Mohamed, B. B., Sayadi, A., Slama, S. Ben, Marcacci, M., ... Hammami, S. (2023). Characterization of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serotype 8 in Naturally Infected Barbary Deer (*Cervus elaphus barbarus*) and *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Tunisia. *Viruses*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/v15071567>
- Viarouge, C., Breard, E., Zientara, S., Vitour, D., & Sailleau, C. (2015). Duplex real-time RT-PCR assays for the detection and typing of epizootic haemorrhagic disease virus. *PLoS ONE*, 10(7), 1DUUMY. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132540>
- Viennet, E., Garros, C., Gardes, L., Rakotoarivony, I., Allene, X., Lancelot, R., ... & Balenghien, T. (2012). Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges: implications for transmission of orbiviruses. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(3), 255-266.
- Webster, J. P., Gower, C. M., Knowles, S. C. L., Molyneux, D. H., & Fenton, A. (2016). One health - an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evolutionary Applications*, 9(2), 313–333. <https://doi.org/10.1111/eva.12341>
- Werner, D., Groschupp, S., Bauer, C., & Kampen, H. (2020). Breeding habitat preferences of major *culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Germany. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(14), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145000>
- Whitehorn, J., & Yacoub, S. (2019). Global warming and arboviral infections. In *Clinical Medicine* (Vol. 19, Issue 2).

Wilson, A. J., & Mellor, P. S. (2009). Bluetongue in Europe: Past, present and future. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1530, pp. 2669–2681). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0091>

Wilson, R. J., & Maclean, I. M. D. (2011). Recent evidence for the climate change threat to Lepidoptera and other insects. *Journal of Insect Conservation*, 15(1), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10841-010-9342-y>

Wittmann, E. J., & Baylis, M. (2000). Climate Change: Effects on Culicoides-Transmitted Viruses and Implications for the UK. In *Veterinary Journal* (Vol. 160, Issue 2, pp. 107–117). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0470>

WOAH. (2019). *EPIZOOTIC HAEMORRHAGIC DISEASE Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References*. <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home>].

WOAH. (2021). *EPIZOOTIC HAEMORRHAGIC DISEASE (INFECTION WITH EPIZOOTIC HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS)*.

Yadin, H., Brenner, J., Bumbrov, V., Oved, Z., Stram, Y., Klement, E., Perl, S., Anthony, S., Maan, S., Batten, C., & Mertens, P. P. C. (2008). Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel. *Veterinary Record*, 162(2), 53–56. <https://doi.org/10.1136/vr.162.2.53>

Apêndice I

Questionário realizado a produtores de bovinos no Concelho de Idanha-a-Nova

O presente questionário foi desenvolvido no âmbito do projeto de um estudo epidemiológico relativo à Doença Hemorrágica Epizootica no Concelho de Idanha-a-Nova, e visa a recolha de informação sobre dados relativos a animais com sinais clínicos compatíveis com a doença. Todos os dados recolhidos serão confidenciais e usados apenas para investigação científica.

- 1. É produtor/veterinário/outro?**
- 2. Exploração Extensiva/Semi-intensiva/Intensiva?**
- 3. Os animais afetados encontravam-se a campo ou estabulados?**
- 4. Número total do efetivo**
- 5. Raças dos animais afetados**
- 6. Número de animais afetados por raça**
- 7. Idade dos animais afetados**
- 8. Quantos óbitos relaciona com a doença?**
- 9. Quais os sinais clínicos observados mais evidentes?**
- 10. A exploração é arborizada? Se sim, porque tipo de árvores?**
- 11. Presença de linhas de água/charcas na exploração?**

- 12. Os animais foram vacinados com a vacina da Língua Azul (serótipo 1 e 4)? Se sim, quando?**
- 13. Foi realizada a desinsetização dos animais e/ou da exploração? Se sim, quando?**
- 14. Tem alguma armadilha para insetos na exploração?**