



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado integrado em medicina veterinária

Dissertação de mestrado

CONHECIMENTOS ATUAIS SOBRE A DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA EM BOVINOS

Elora Hémard

Coimbra, (outubro 2024)



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado integrado em medicina veterinária

Dissertação de mestrado

CONHECIMENTOS ATUAIS SOBRE A DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA EM BOVINOS

Coimbra, (outubro 2024)

Elora Hémard

Constituição do Júri

*Presidente do Júri: Professor Doutor Hugo Corte-Real
Vilhena*

*Argente: Professora Doutora Vera Purificação
Carvalho Pessoa*

Orientador: Professora Doutora Rosa Lino Neto

Trabalho realizado sob a orientação da Professora

Rosa Maria Lino Neto Pereira



Dissertação do Mestrado integrado em medicina veterinária



Agradecimentos

Gostaria exprimir a minha gratidão a todos aqueles que me apoiaram e acompanharam ao longo do meu curso e na elaboração desta dissertação.

Em primeiro lugar, agradeço calorosamente a minha família por me permitir realizar o meu sonho de criança e pelo seu apoio incondicional, pela paciência e pelos encorajamentos ao longo desta jornada. Obrigada a Coimbra, onde descobri uma nova cultura, aprendi uma nova língua e onde também construí amizades e memórias preciosas. A sua presença foi uma fonte de conforto e motivação, mesmo nos momentos de dúvida.

Agradeço igualmente aos meus professores e a minha orientadora pelo seu acompanhamento, pelos conselhos e pela disponibilidade ao longo do meu percurso académico. O seu apoio foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento profissional.

Por fim, um grande obrigado às clínicas e aos veterinários que me acolheram durante os estágios e que partilharam comigo o seu saber-fazer e a sua experiência. Estou profundamente grata pelos conhecimentos práticos e humanos que pude adquirir ao seu lado.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Índice geral	
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	v
Lista de siglas, símbolos e abreviaturas.....	v
Resumo	2
1. INTRODUÇÃO.	4
2. AGENTE ETIOLÓGICO.	5
2.1 APRESENTAÇÃO DO VÍRUS.	5
2.2 AS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS.	5
2.2.1 A cápside externa.	5
2.2.2 A cápside interna.	6
2.3 AS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS.....	7
3. EPIDEMIOLOGIA.	7
3.1 HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS SURTOS.	7
3.1.1 Disseminação do vírus.	10
3.2 VETOR.....	11
4. PATOGENIA.	13
4.1. INFEÇÃO DO VETOR CULICOIDES.	13
4.1.1. Progressão temporal e tropismo viral na infecção do culicídeo.	13
4.1.2. Impacto da temperatura e de fatores biológicos.	13
4.2. INFEÇÃO DO RUMINANTE HOSPEDEIRO.	14
4.2.1. Os locais de replicação primários e secundários.	14
4.2.2. A resposta do interferon de tipo 1.	15
4.2.3. O papel da libertação das interleucinas 1 e 6.	15
4.3. FORMA CLÍNICA DA DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA.	16
4.3.1. Sinais clínicos.	16
4.3.2. Exame pós-mortem.	19
5. METODOS DE DIAGNOSTICO.	20
5.1. METODOS LABORATORIAIS.	20
5.2. ENSAIOS DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	21
5.3. ENSAIOS RECENTEMENTE DESENVOLVIDOS.	21
5.4. OS TESTES SEROLÓGICOS.	22

6.	ABORDAGENS DE PREVENÇÃO e COMBATE AO VÍRUS DA DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA.	22
6.1.	TRATAMENTO DA DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA.....	22
6.2.	VACINAS.....	22
6.2.1.	Vacinas autólogas.	22
6.2.2.	Vacinas vivas modificadas ou inativadas.....	23
6.2.3.	Vacina de subunidade recombinante.....	24
6.2.4.	Outras vacinas candidatas experimentais.....	24
6.3.	MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLO DE SURTOS.	25
7.	CONCLUSÃO.	25
8.	BIBLIOGRAFIA.	27



Índice de figuras

Figura 1. Epidemiologia do EHDV no mundo e na Europa.

Figura 2. Desenvolvimento de doença clínica em veado de cauda branca pelo EHDV-2.

Figura 3. Conjuntiva inchada de vaca seropositiva para o EHDV, Turquia, 2007.

Figura 4. Lesão erosiva na mucosa oral de vaca seropositiva para o EHDV, Turquia, 2007.

Figura 5. Infecção experimental com inoculado de EHDV-8 em vitelo Holstein-Friesian de 4-5 meses de idade.

Figura 6. Lesões no esófago da vaca necropsizada, Japão, 2015.

Figura 7. Lesões macroscópicas resultantes de doença clínica em veados de cauda branca infetados com EHDV.

Índice de tabelas

Tabela 1. Abundância relativa de espécies de culicídeos coletadas durante os surtos de DHE na Sardenha.

Tabela 2. Fêmeas adultas de Culicídeos coletados durante os surtos de DHE na Sardenha positivas para EHDV-8 e BTV-3.

Tabela 3. Análises hematológicas de vitelos Holstein-Friesian de 4-5 meses experimentalmente infetado por EHDV-8.

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

AGID: Imunodifusão em gel de ágar

AINES: Anti-inflamatórios não esteroides

AHSV: Vírus da peste equina africana

BTV: Vírus da Língua Azul

cELISA: Ensaio imunoenzimáticos competitivos

CLPs: Partículas semelhantes ao núcleo

DHE: Doença hemorrágica epizoótica

DIVA: Diferenciação entre animais infetados e vacinados

EHDV: Vírus da doença hemorrágica epizoótica

ELISAs: Ensaio imunoenzimáticos

EPI: Período de incubação extrínseco

FMIA: Imunoensaio com Microesferas Fluorescentes

OMS: Organização mundial da saúde

RNA: Ácido ribonucleico

RT-LAMP: Transcrição reversa mediada por loop isotérmico amplificação

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

rVP2: Proteínas da cápside externa VP2 recombinantes

USA: Estados unidos de América

VLPs: Partículas semelhantes a vírus

VNT: teste de neutralização viral

WOAH: Organização Mundial de Saúde Animal



Conhecimentos atuais sobre a doença hemorrágica epizootica em bovinos

Elora Hémard^a, Rosa M Lino Neto_Pereira^b

^a Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (elorahemard@gmail.com)

^b Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (rosa.neto@euvg.pt); Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Unidade de Biotecnologias e Recursos Genéticos, Quinta da Fonte Boa, 2025-048 Vale de Santarém, Portugal.

Resumo

As epidemias de arbovírus nos ruminantes domésticos podem provocar perdas económicas significativas na produção pecuária, e surtos de doença grave nas espécies selvagens. Assim o controlo destas doenças é tão fundamental para o bem-estar animal como para a estabilidade económica. O vírus da doença hemorrágica epizoótica (EHDV), pertencente ao género *Orbivirus*, é semelhante ao vírus da língua azul (BTV), é transmitido por insetos hematófagos vetores do género *Culicoides*. A primeira descrição do EHDV data de 1955, quando ocorreu um grave surto em veados de cauda branca nos Estados Unidos da América, desde vários surtos sugeriram em diversas regiões do mundo, tanto em animais selvagens como domésticos. Em 2022, o EHDV foi detetado pela primeira vez em Europa, e responsável de casos clínicos graves em bovinos na Sicília e na Sardenha, onde as espécies de *Culicoides spp.* nativas apresentam capacidade de transmissão do serótipo envolvido, o EHDV-8. A transmissão da doença ocorre via hematófaga, por alimentação num animal infetado, disseminando o vírus nas glândulas salivares do culicoide com posterior transmissão para outros animais suscetíveis. Os sinais clínicos incluem letargia, febre, esforço respiratório, secreções nasais e oculares, ptialismo, ulcerações orais, diminuição da produção de leite, laminites e, no casos mais graves, a morte do animal. Desde 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu a doença hemorrágica epizoótica (DHE) na lista de doenças de notificação obrigatória. O diagnóstico deve ser laboratorial devido à similaridade clínica com outras doenças bovinas. Vacinas autógenas para os veados foram desenvolvidos nos Estados Unidos da América, e o Japão comercializou uma vacina viva inativada contra estirpe Ibaraki. Contudo, existe desvantagens nestas vacinas, como baixa segurança, eficácia limitada e sem capacidade de diferenciação entre animais infetados e vacinados (DIVA). Os recentes avanços tecnológicos permitam o desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficientes, e capazes de proteger contra os orbivírus, com abordagens inovadoras como a veiculação de antígenos por micro ou nanopartículas. Estas estratégias representam novas perspectivas nas medidas profiláticas eficientes das doenças causadas por arbovírus, especialmente através da diferenciação fundamental entre animais vacinados e infetados. Assim, as pesquisas contínuas nestas áreas prometem oferecer melhores soluções na proteção dos rebanhos contra os orbivírus e limitar os impactos económicos associados.

Palavras-chave:

Bovinos, *Culicoides*, Doença hemorrágica epizoótica, EHDV, *Orbivirus*

Abstract

Arbovirus epidemics in domestic ruminants can cause significant economic losses in livestock production, and outbreaks of serious disease in wild species. Therefore, controlling these diseases is essential for both animal welfare and economic stability from local to national levels. EHDV, belonging to the genus *Orbivirus*, is similar to bluetongue virus, and is also transmitted by hematophagous insect vectors of the genus *Culicoides*. The first

description of EHDV dates back to 1955, when a serious outbreak occurred in white-tailed deer in the United States of America, since several outbreaks have appeared in different regions of the world, both in wild and domestic animals. In 2022, EHDV was detected for the first time in Europe, and was responsible for serious clinical cases in cattle in Sicily and Sardinia, where native culicoides species have the capacity to transmit the serotype involved, EHDV-8. Transmission of the disease occurs through a blood meal in an infected animal, disseminating the virus in the culicoid's body with subsequent transmission to other susceptible animals. Clinical signs include lethargy, fever, respiratory effort, nasal and ocular secretions, ptyalism, oral ulcerations, decreased milk production, laminitis and, in the most serious cases, death of the animal. Since 2008, the World Health Organization has included epizootic hemorrhagic disease on the list of notifiable diseases. Diagnosis must be laboratory based due to the clinical similarity with other bovine diseases. Autogenous vaccines for deer have been developed in the United States of America, and Japan has commercialized a live inactivated vaccine against the Ibaraki strain. However, there are notable disadvantages to these vaccines, such as low safety, limited efficacy and no ability to differentiate between infected and vaccinated animals. Recent technological advances allow the development of safer, more efficient vaccines, and capable of protecting against orbiviruses, with innovative approaches such as the delivery of antigens by micro or nanoparticles. These strategies represent new perspectives on efficient prophylactic measures for arboviral diseases, especially through the fundamental differentiation between vaccinated and infected animals. Therefore, continued research in these areas promises to offer better solutions to protect livestock against orbiviruses and limit the associated economic impacts.

Key words:

Cattle, Culicoides, Epizootic hemorrhagic disease, EHDV, Orbivirus

1. INTRODUÇÃO.

A Doença Hemorrágica Epizootica é uma doença viral de espécies silvestres e domésticas da subordem Ruminantia, que afeta principalmente os cervídeos, nomeadamente os veados de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), e mais raramente os bovinos, mas que causa um impacto significativo na produção pecuária mundial. Na América do Norte, as epizootias DHE também tiveram efeitos substanciais na produção comercial de veados – uma indústria em rápido crescimento que teve um impacto económico total estimado em 7,9 mil milhões de dólares na economia dos Estados Unidos da América em 2015 (Sunwoo et al. 2020). Esta doença é incluída na lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) desde 2008 (Hairgrove et al. 2018; Jiménez-Cabello et al. 2023).

O agente patogénico é o EHDV, um membro do género *Orbivirus* da família Reoviridae. O EHDV compartilha semelhanças com outros orbivírus importantes, como o vírus da língua azul e o vírus da peste equina africana (AHSV). É uma doença vetorial transmitida por insetos hematófagos do género *Culicoides*, da família Ceratopogonidae (Hairgrove et al. 2018; Jiménez-Cabello et al. 2023). Estes mosquitos são vetores de vários arbovírus através do mundo, especialmente de orbivirus, incluindo aqueles com ácido ribonucleico (RNA) de cadeia dupla da família dos reoviridae, como o BTV e o EHDV (Mills et al. 2017; Sghaier et al. 2017; Rivera et al. 2021).

O número de serótipos de EHDV existentes foi alvo de controvérsia na literatura, mas o Comitê Internacional para a Taxonomia de Vírus identificou, com base em análises sorológicas e moleculares recentes, sete serótipos do vírus, que são o EHDV-1, EHDV-2, EHDV-4 até o EHDV-8 (Maclachlan et al. 2015).

O EHDV foi inicialmente identificado em veados de cauda branca nos Estados Unidos da América em 1955, onde o EHDV-1 e EHDV-2 são endémicos (Shope, MacNamara and Mangold 1960). No Japão em 1962 ocorreu um grave surto de doença de Ibaraki, que foi posteriormente associado a uma estirpe de EHDV do sorotipo 2, o EHDV-2 Ibaraki, provocando nos bovinos casos clínicos com disfagia e pneumonias severas, assim como abortos e mortalidade. Nos últimos anos, vários surtos apareceram em diferentes regiões do mundo, com serótipos não endémicos, e com severas consequências clínicas e económicas na produção bovina, como mais recentemente, em 2022, com a primeira deteção do EHDV em Europa (Quaglia et al. 2023).

Nos bovinos, as infeções pelo EHDV apresentam geralmente formas subclínicas. No entanto, no caso de desenvolvimento de sinais clínicos, estes incluem letargia, febre, esforço respiratório, secreções nasais e oculares, ptialismo, ulcerações orais, diminuição da produção de leite, laminites e, no casos mais severos, a morte do animal. Um diagnóstico laboratorial é necessário devido à similaridade nos sinais clínicos com outras doenças bovinas, como a língua azul. Os Estados-Unidos, no objetivo de controlar a DHE nas criações de veados cativos, usaram vacinas autógenas contra EHDV-1 e EHDV-2, e no Japão desenvolveu vacinas monovalente viva atenuada contra estirpe Ibaraki em bovinos. Até agora, estas são as únicas vacinas disponíveis, mas apresentam

pouca segurança, uma eficácia limitada e não têm capacidade DIVA, o que restrinjam a suas utilizações como medidas profiláticas (Maclachlan *et al.* 2015). Com a expansão das áreas de repartição da doença e o aparecimento de casos clínicos mais severos nos bovinos, as perspectivas vacinais apresentam mais interesse. Assim, novas tecnologias profiláticas estão em desenvolvimento, como vacinas recombinantes e partículas semelhantes a vírus (VLPs) que já foram mais estudadas para o controle dos surtos de BTV (Jiménez-Cabello *et al.* 2022). Na presente revisão, pretende-se apresentar uma visão geral dos conhecimentos atuais sobre o EHDV, incluindo a descrição do agente etiológico, as alterações na sua distribuição e virulência, uma análise da infeção e desenvolvimento clínico da doença, assim como, dos métodos de diagnóstico e potenciais tratamentos para a controlar.

2. AGENTE ETIOLOGICO.

2.1 APRESENTAÇÃO DO VÍRUS.

O EHDV apresenta pelo menos sete serótipos diferentes que são classificados como: EHDV-1, EHDV-2, EHDV-4 a EHDV-8 (Maan *et al.* 2016). Antigamente eram considerados dez serótipos, no entanto na ajuda de análises genéticas e filogenéticas foi mostrado que, o serótipo EHDV-3 é uma estirpe de EHDV-1, que o EHDV-318 (também referido como EHDV-9) é uma estirpe de EHDV-6, e por fim, que o vírus Ibaraki corresponde a uma estirpe asiática de EHDV-2 (Maan *et al.* 2016). Dois novos serótipos foram recentemente relatados, um daqueles é o EHDV-10 que foi descrito pela primeira vez em 1998 no Japão (Yang *et al.* 2020; Duan *et al.* 2022; Xin *et al.* 2023; He *et al.* 2024).

Geralmente, os orbivírus possuem vírions icosaédricos com um genoma de dez a onze segmentos de RNA de cadeia dupla, no caso do EHDV, o seu genoma compreende dez segmentos identificados como segmentos 1-10 (Seg-1 a Seg-10), codificando sete proteínas estruturais (VP1 – VP7) e pelo menos quatro proteínas não estruturais (NS1 – NS4) (Russell, Parbhoo and Gildenhuis 2018; Sung *et al.* 2019; Rodrigues *et al.* 2022; Thabet *et al.* 2023). Os vírions BTV e EHDV consistem numa cápside externa que envolve uma cápside interna, esta última é composta por duas camadas de proteínas, um núcleo e um subnúcleo (Russell, Parbhoo and Gildenhuis 2018; Thabet *et al.* 2023).

2.2 AS PROTEÍNAS ESTRUTURAS.

2.2.1 A cápside externa.

A cápside externa consiste em duas proteínas: 60 trómeros de VP2 e 120 trómeros de VP5 (Anbalagan *et al.* 2014; Jiménez-Cabello *et al.* 2023). A proteína VP2, codificada por Seg-2, é a proteína mais exposta do vírion, é responsável pela ligação ao recetor na célula hospedeira, e é o principal determinante do serótipo do vírus através da especificidade de suas interações com anticorpos neutralizantes (Maan *et al.* 2016; Thabet *et al.*

2023). Foi demonstrado que a proteína VP5, codificada por Seg-6, aumenta a resposta de anticorpos neutralizantes induzida apenas pela VP2 (Rodrigues *et al.* 2022). Tanto a VP2 quanto a VP5 variam de maneira específica do serótipo e são, respetivamente, os segmentos de proteínas/genoma do EHDV com maior variabilidade (Maan *et al.* 2016; Russell, Parbhoo and Gildenhuis 2018; Rodrigues *et al.* 2022; Jiménez-Cabello *et al.* 2023; Thabet *et al.* 2023). De acordo com Russell, Parbhoo and Gildenhuis (2018), a flexibilidade da sequência da VP5 pode ser vital para permitir a existência de mutações e evitar o sistema imunológico, pois faz parte da camada externa que está exposta a potenciais anticorpos.

2.2.2 A cápside interna.

O papel principal da cápside interna é a proteção do genoma. Esta cápside é composta por duas camadas adicionais: a camada intermédia, chamada também o núcleo, constituída por 260 trímeros de proteína VP7, codificada por Seg-7, e a camada interna, também chamada subnúcleo, formada por 60 dímeros de VP3, codificados por Seg-3 (Maan *et al.* 2016; Russell, Parbhoo and Gildenhuis 2018; Rodrigues *et al.* 2022; Jiménez-Cabello *et al.* 2023). A VP7 é o antígeno específico do grupo que distingue cada Orbivírus, independentemente do serótipo. Para além do seu papel de proteção do genoma, esta proteína serve também de ponte entre a cápside externa e a camada de VP3, e tem uma sequência de aminoácidos altamente conservada (mais de 90% de identidade de sequência) entre os serótipo de EHDV. Assim, a VP7 é a proteína específica do serogrupo imunodominante e é usada em ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) específicos do serogrupo para diagnóstico de doenças (Russell, Parbhoo and Gildenhuis 2018).

O interior do núcleo contém também o complexo RNA polimerase com as proteínas estruturais VP1, VP4 e VP6, respetivamente codificadas pelos segmentos Seg-1, Seg-4 e Seg-9, que estão intimamente associadas aos dez segmentos de RNA de cadeia dupla do genoma viral (Russell, Parbhoo and Gildenhuis 2018; Jiménez-Cabello *et al.* 2022). Desta maneira, a VP3 é uma proteína de ligação ao RNA que interage tanto com o genoma do RNA viral como com as proteínas menores VP1, VP4 e VP6. A automontagem da VP3 controla o tamanho e a organização da estrutura da cápside (Anbalagan *et al.* 2014). Também, o Seg-3 varia entre as estirpes isoladas de diferentes regiões, permitindo a identificação do topótipo do vírus (Xin *et al.* 2023). A proteína VP1, que é altamente conservada, funciona como uma RNA polimerase dependente do RNA viral, e a VP4 é a enzima de captação e acredita-se que a VP6 desempenha várias funções críticas na replicação do orbivírus, incluindo o empacotamento do RNA genómico na cápside, interações com outras proteínas do capsídeo e potencialmente atividades enzimáticas relacionadas à manipulação do RNA (Anbalagan *et al.* 2014; Sung *et al.* 2019). Estas três proteínas são altamente conservadas: as estirpes orientais e ocidentais foram consideradas separadamente e mostraram pelo menos 85% de identidade nas sequências de aminoácidos (Jiménez-Cabello *et al.* 2023).

2.3 AS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS.

As proteínas não estruturais (NS1 – NS4) não se encontram nas partículas virais, mas nas células infetadas e desempenham papéis de suporte como o empacotamento do genoma, o transporte intracelular, a montagem da cápside, a libertação do vírus e o controlo da resposta imune (Russell, Parbhoo and Gildenhuis 2018; Jiménez-Cabello *et al.* 2023). A NS1, altamente expressa durante a replicação dos orbivírus, forma túbulos no citoplasma, facilitando o transporte viral intracelular e afetando a patogenicidade, também atua como um regulador positivo, promovendo a tradução do mRNA viral e a expressão gênica nos Orbivirus (Boyce, Celma & Roy 2012). Acredita-se que a sequência proteica de NS1, codificada por Seg-5, é altamente conservada, com mais de 90% de sequência homóloga entre os serótipos de EHDV (Jiménez-Cabello *et al.* 2023). Codificada pelo Seg-8, a NS2 atua como ATPase, influenciando o empacotamento e tradução do RNA. Esta fosfoproteína é o principal componente dos corpos de inclusão viral, atuando como locais de montagem do vírus. Os aminoácidos da NS2 variam mais do que os da NS1. A semelhança na sequência da NS2 observada entre todas as estirpes varia em torno de 79,7%, estas variações entre as estirpes ocidentais e orientais poderiam explicar diferenças de patogenicidade em bovinos (Jiménez-Cabello *et al.* 2023). A NS4, codificada pelo Seg-9, ainda não foi comparada entre serótipo de EHDV, é considerada um fator de virulência no BTV. A sua rápida acumulação no citoplasma sugere inicialmente um papel no ciclo de replicação viral, e nos estágios tardios da infecção a NS4, em conjunto com a NS3 expressa em níveis elevados, pode facilitar a libertação viral nas células de *Culicoides spp.* (Belhouchet *et al.* 2011; Jiménez-Cabello *et al.* 2023).

3. EPIDEMIOLOGIA.

3.1 HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS SURTOS.

A doença hemorrágica epizootica foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos de América (USA) em 1955 após um grave surto da doença em veados de cauda branca, *Odocoileus virginianus*, em Nova Jersey (Shope, MacNamara and Mangold 1960). Estes vírus têm sido historicamente distribuídos entre as latitudes de 40°N–50°N e 35°S, seguindo a presença dos vetores *Culicoides spp.* (Maclachlan *et al.* 2015; Allen *et al.* 2019). Desde a sua descrição inicial no leste dos Estados Unidos, a Doença Hemorrágica Epizootica foi identificada em várias regiões do mundo, como nas Américas (incluindo o Caribe, América Central e do Sul), África, Ásia (Leste, Central e Sudeste Asiático), Austrália, ilhas do Oceano Índico como Maurício e Reunião, e no Oriente Médio. Embora a infecção pelo EHDV seja comum em ruminantes domésticos em muitas áreas endêmicas, ela raramente causa doença evidente, principalmente afetando os bovinos em vez dos pequenos ruminantes (Maclachlan *et al.* 2015). No entanto, a epidemiologia desse patógeno está em mudança, com décadas de expansão em direção ao norte,

alcançando áreas da Europa e América do Norte que possuem hospedeiros sem imunidade prévia contra este patógeno (Allen *et al.* 2019).

Os diferentes serótipos não se encontram nas mesmas regiões, assim, após investigações posteriores, o serótipo EHDV-1 seria responsável do surto de 1955 nos Estados Unidos (Shope, MacNamara and Mangold 1960; Noronha *et al.* 2021). Em 1962 ocorreu um outro surto na província de Alberta, no Canadá, onde o EHDV-2 foi isolado. De fato, estes dois serótipos são considerados endêmicos da América do Norte, e foram os únicos detetados no continente até 2006, ano que marcou a primeira detecção do EHDV-6 no estado de Indiana (Stallknecht *et al.* 2015; Ruder *et al.* 2017; Noronha *et al.* 2021). Nos últimos 30 anos nos Estados Unidos, houve um aumento dos casos relatos de DHE que diferem entre as regiões, com o Nordeste e o Meio-Oeste apresentando um aumento maior em comparação com o Sudeste, onde a DHE é endêmica (Stallknecht *et al.* 2015). Nestas localizações o EHDV-2 é o sorotipo o mais detetado, mesmo se encontram-se também os EHDV-1 e EHDV-6. Os surtos de o EHDV-2 e EHDV-6 em 2017 mostraram que o EHDV se propagou no norte dos Estados Unidos e no Sudeste do Canadá (Anbalagan *et al.* 2014; Stallknecht *et al.* 2015; Allen *et al.* 2019; Allen *et al.* 2020).

A expansão do EHDV, tal como do seu vetor e a sua sobrevivência, não são totalmente compreendidos, mas provavelmente estão relacionados com vários fatores climáticos e paisagísticos ou ligados ao habitat. Em particular, condições de seca, parecem estar correlacionadas com os padrões de DHE, especialmente durante anos de surtos extremos (Stallknecht *et al.* 2015; Allen *et al.* 2020; Noronha *et al.* 2021).

Vários autores evidenciaram através de análises genética que o EHDV-6 Indiana apresenta nas sequências dos segmentos 2 e 6 (VP2 e VP5) até 98 % de semelhança nucleotídica e uma forte relação filogenética com o EHDV-6 australiano (estirpe CSIRO 753), e os oito outros segmentos seriam derivados dos segmentos do EHDV-2 Alberta, sugerindo que este rearranjo teria como origem uma divergência com um EHDV-6 australiano e o EHDV-2 Alberta (Allison *et al.* 2012; Maclachlan *et al.* 2015; Ruder *et al.* 2017; Brown-Joseph *et al.* 2019; Rajko-Nenow *et al.* 2019; Noronha *et al.* 2021). Depois da identificação do EHDV-6 Indiana em 2006, um aumento repentino da doença causada pelo EHDV-6 foi relatado no Nebraska, South Dakkota, Michigan e Missouri em bovinos domésticos e veados de cauda branca. O EHDV-6 estabeleceu-se em todo os Estados Unidos e circulou também fora das Américas do Norte pouco tempo depois da sua identificação inicial, como nas ilhas do Caribe (Maclachlan *et al.* 2015; Brown-Joseph *et al.* 2019; Noronha *et al.* 2021). No entanto, o EHDV-6 isolado em Trinidad parece similar ao EHDV-6 encontrado nos Estados Unidos e nas ilhas vizinhas, como a Guadalupe e a Martinica, embora, filogeneticamente distinto. De fato, foi realizada a sequenciação completa do genoma do EHDV-6 Trinidad que sugere que este vírus veio das Américas e recebeu nove segmentos de um ancestral australiano e o segmento 8 de um serótipo não identificado por agora (Brown-Joseph *et al.* 2019; Rajko-Nenow *et al.* 2019).

Assim, os rearranjos de Orbivirus é um processo que ocorre frequentemente quando uma mesma célula está co-infetada com pelo menos duas estirpes diferentes, e tem provavelmente um papel importante na evolução do EHDV (Rajko-Nenow *et al.* 2019). Nos Estados Unidos, os surtos de EHDV-1 e EHDV-2 provocaram nos veados

doenças clínicas graves, com alta mortalidade, mas ao contrario os bovinos ficaram assintomáticos, ou com quadros subclínicos. No entanto, a produção bovina sofreu de outros surtos através o mundo, provocando graves perdas económicas, o desenvolvimento de doenças clínicas e até mortalidade, como no Japão entre 1959 e 1960 com o grave surto de doença de Ibaraki gerado pelo EHDV-2 estirpe Ibaraki (Urata, Watanabe and Iwata 2015; Duan *et al.* 2022).

Mais recentemente, a Israel e a Bacia do Mediterrâneo sofreram também das epidemias de EHDV, levando a importantes perdas na produção leiteira, com surtos em Israel primeiramente de EHDV-7 em 2006, seguindo de ambas EHDV-6 e EHDV-7 em 2015, e na Bacia do Mediterrâneo de EHDV-6 em 2006 (Dhaou *et al.* 2016; Golender *et al.* 2017; Mejri *et al.* 2018; Golender and Bumbarov 2019; Sghaier *et al.* 2022). Em Setembro de 2021, na Tunísia, foram reportados em várias explorações bovinas casos clínicos de DHE, que se espalharam rapidamente para as regiões mais ao norte do país. Foi identificado que este surto se encontra associado ao EHDV-8 (Sghaier *et al.* 2022). A primeira aparição do EHDV na Europa, com casos clínicos nomeadamente nos bovinos, foi detetada em Itália (na Sicília e na Sardenha em Outubro de 2022), seguindo a Espanha, onde também foi identificado o sorotipo EHDV-8 (Quaglia *et al.* 2023). De acordo com os relatórios do Sistema Mundial de Informação Zoossanitária (WAHIS <https://wahis.woah.org/#/event-management>, último acesso no dia 16/04/2024), existem dois focos em Portugal na região do Alentejo e 226 em França, mas até agora o serótipo envolvido não está confirmado.

Para sintetizar, a prevalência dos diferentes serótipos de EHDV varia consideravelmente em diferentes partes do globo como é visível na figura 1. Por exemplo, na América do Norte e do Sul, os serótipos mais comuns são EHDV-1, EHDV-2 e EHDV-6 (Allen *et al.* 2019, Noronha *et al.* 2021), enquanto que no Japão e China predominam EHDV-1, EHDV-2, EHDV-7 e EHDV-10 (Kamomae *et al.* 2018; Xin *et al.* 2023; Yang *et al.* 2020). O EHDV tem se disseminado na América do Norte, seguindo para o norte dos Estados Unidos até no Canadá. Na América do Sul, foi encontrado no Equador, Guadalupe Francesa, Trinidad e Tobago, Guiana Francesa e Brasil. Na Oceânia, o EHDV está restrito à Austrália onde encontramos vários serótipos (Jiménez-Cabello, *et al.* 2023). Em África, a sua presença foi registada na Iha da Reunião, em Mauritânia (África Ocidental), e na Bacia do Mediterrâneo foi identificado os serótipos EHDV-6, e o EHDV-7 em Israel (Golender *et al.* 2017; Golender and Bumbarov 2019). Em 2021 o EHDV-8 foi detetado na Tunísia, seguindo em 2022 na Itália, o que foi o primeiro relato do vírus na Europa (Sghaier *et al.* 2022; Quaglia *et al.* 2023).

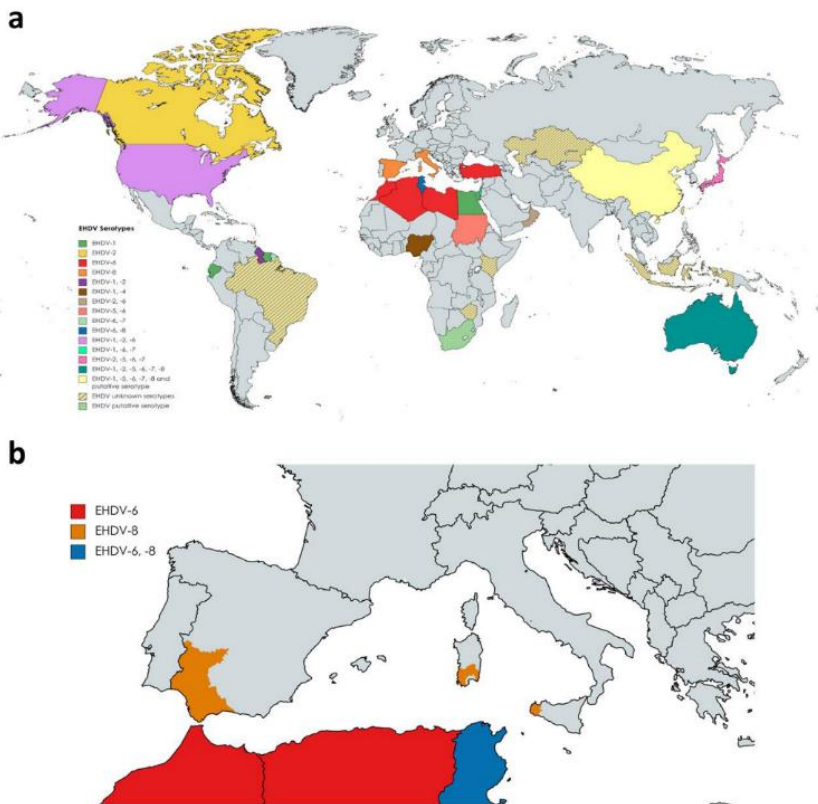


Figura 1. Epidemiologia do EHDV no mundo (a) e na Europa (b). (a) As áreas coloridas representam os países onde diferentes serótipos de EHDV causaram surtos ao longo dos anos ou onde existem evidências serológicas. Os serótipos correspondentes em cada país estão indicados. Quando os surtos estão localizados numa região específica, todo o país é indicado como infetado. (b) Representação das regiões italiana e espanhola afetadas (Jiménez-Cabello, et al. 2023).

3.1.1 Disseminação do vírus.

A disseminação do vírus pode ocorrer por várias vias, como o transporte de *Culicoides spp.* infetados pelo vento, especialmente dentro da Bacia do Mediterrâneo, e talvez da Bacia do Mediterrâneo para a Europa, com as tempestades de areia (Garrett *et al.* 2015; Sghaier *et al.* 2022). Também os *Culicoides spp.* infetados podem ser associados ao transporte de animais, humanos ou transporte de mercadorias, nomeadamente plantas e flores cortadas; mas pode também ocorrer pela importação de animais com virémia (Carpenter *et al.* 2013).

3.2 VETOR.

Os *Culicoides spp.* são pequenas moscas da família Ceratopogonidae, as fêmeas são hematófagas e apresentam um grande leque de hospedeiros para alimentarse-se, onde se incluem pequenos ruminantes, bovinos, equinos e humanos. Através todo o mundo, estes insetos são vetores importantes nos ruminantes de vários arbovírus, especialmente de Orbivirus, e incluindo aqueles com RNA de cadeia dupla da família dos Reoviridae, como o BTV e o EHDV (Mills *et al.* 2017; Sghaier *et al.* 2017; Rivera *et al.* 2021). A OMS, no objetivo de confirmar um vetor natural e a sua competencia para um patógeno, estabeleceu os quatro critérios seguintes: o patógeno deve ser detetado em insetos não alimentados e coletados em campo; os insetos devem ser capazes de serem infetados com o patógeno alimentando-se de um hospedeiro infetado ou de uma refeição de sangue artificial; os insetos infetados devem ser capazes de transmitir com sucesso o patógeno durante a alimentação; deve haver uma associação no espaço e no tempo entre o vetor suspeito e o hospedeiro infetado no campo (McGregor *et al.* 2019; McGregor, Shults and McDermott 2022).

Nos Estados Unidos de América, encontram-se atualmente apenas duas espécies do gênero *Culicoides* que correspondem aos critérios da OMS para serem consideradas como vetores confirmados do BTV e/ou EHDV, que são o *Culicoides sonorensis* e o *Culicoides insignis* (Ruder, Howerth, *et al.* 2012; Mills *et al.* 2017; McGregor, Shults and McDermott 2022). Ambas as espécies são associadas à produção pecuária, nomeadamente de bovinos (McGregor, Shults and McDermott 2022). *C. insignis* encontra-se na Florida e é um conhecido vetor do BTV, mas McGregor *et al.* destacaram a sua capacidade de transmissão do EHDV-2, mesmo que de forma menos eficiente do que o *C. sonorensis* (McGregor, Shults and McDermott 2022). O *C. sonorensis* é endêmico nos Estados Unidos e encontra-se principalmente no Oeste do país. É um vetor confirmado dos serótipos EHDV-1 e EHDV-2 e apresenta capacidade vetorial para EHDV-7 (Ruder, Howerth, *et al.* 2012; Mills *et al.* 2017; McGregor, Shults and McDermott 2022). Como o *C. sonorensis* apresenta capacidade de ser colonizado, permissividade a vários patógenos e disponibilidade de ferramentas celulares e moleculares, para além de ser reconhecido como um vetor confirmado pela OMS, é a espécie de *Culicoides* usada como vetor modelo de BTV e EHDV (Ruder, Howerth, *et al.* 2012; Mills *et al.* 2017; McGregor, Shults and McDermott 2022).

O EHDV-8 foi detetado nas espécies seguintes: o *C. imicola* que está presente no sul da Europa nas regiões mediterrânicas, o grupo *C. obsoletus* e *C. scoticus* para o qual a abundância mensal aumenta gradualmente do norte da Espanha até o meio da Escandinávia, e pela primeira vez em *C. newsteadi* e *C. pulicaris* (Federici *et al.* 2016; Cuéllar *et al.* 2018; Quaglia *et al.* 2023). No estudo de Quaglia *et al.* (2023), os *Culicoides obsoletus/scoticus* eram o táxon mais abundante, representando 56 % da população total coletada de mosquitos, seguido por *Culicoides imicola* (19 %), *Culicoides pulicaris s.s.*, *Culicoides newsteadi* (9 %), outras espécies (4 %), *Culicoides bysta* (1,5 %) e *Culicoides punctatus* (0,5 %) (Tabela 1). Como é visível na tabela 2, dos 411 grupos testados (5.721

mosquitos), 18 resultaram positivos para EHDV-8, consistindo em 283 fêmeas. Destes, dez pools eram compostos por *Culicoides imicola* (186 mosquitos), quatro por *Culicoides obsoletus/scoticus* (54 mosquitos), dois por *Culicoides pulicaris s.s.* (14 mosquitos), um de *Culicoides newsteadi* (25 mosquitos) e um de *Culicoides bysta* (4 mosquitos).

Tabela 1. Abundância relativa de espécies de culicoides coletadas durante os surtos de DHE na Sardenha. (novembro de 2022 – fevereiro de 2023) (Quaglia et al. 2023).

EXPLORAÇÃO (número de recolhas)	<i>C. imicola</i>	<i>C. newsteadi</i>	<i>C. punctatus</i>	<i>C. pulicaris s.s.</i>	<i>C. obsoletus/ scoticus</i>	<i>C. bysta</i>	Outras espécies	TOTAL
1 (34)	828	271	43	802	7 972	133	88	10 137
2 (25)	857	640	8	340	640	41	143	2 669
3 (3)	122	84	0	325	2	47	46	626
4 (7)	721	13	1	1	1	6	279	1 022
5 (2)	370	360	39	0	6	6	104	885
TOTAL	2898	1368	91	1468	8621	233	660	15339

Tabela 1. Fêmeas adultas de culicoides coletadas durante os surtos de DHE na Sardenha (novembro de 2022 – fevereiro de 2023) positivas para EHDV-8 e BTV-3 (Quaglia et al. 2023).

Espécies	Número de grupos positivos/testados para o EHDV-8; Número de mosquitos testados (taxa mínima de infecção%)	Número de grupos positivos/testados para o BTV-3; Número de mosquitos testados (taxa mínima de infecção%)
<i>C. imicola</i>	*10/55; 912 (1,1)	*15/55; 912 (1,6)
<i>C. obsoletus / scoticus</i>	4/186; 3542 (0,1)	0/186; 3542
<i>C. newsteadi</i>	1/42; 365 (0,5)	0/42; 365
<i>C. pulicaris ss</i>	2/58; 572 (0,7)	0/58; 572
<i>C. bysta</i>	1/24; 78 (1,3)	0/24; 78
<i>C.punctatus</i>	0/8; 23	0/8; 23
Outras espécies	0/38; 229	0/38; 229
TOTAL	18/411; 5721 (0,31)	0/411; 5721

*Dois grupos eram positivos para os dois vírus.

De acordo com Federici *et al.*, o *C. imicola* pode infetar-se com vários serótipos e apresenta os três primeiros critérios da OMS para ser considerado como um vetor do EHDV. As outras espécies europeias apresentadas

podem ser consideradas como vetores potenciais, mas precisam de mais estudos sobre as suas capacidades para a transmissão deste vírus (Federici *et al.* 2016; Cuéllar *et al.* 2018; Quaglia *et al.* 2023).

4. PATOGENIA.

4.1. INFEÇÃO DO VETOR CULICOIDES.

4.1.1. Progressão temporal e tropismo viral na infeção do culicoide.

A transmissão da doença hemorrágica epizootica começa com a infeção do vetor *Culicoides spp.*. Essa etapa acontece depois da ingestão de uma refeição de sangue infetado pelo EHDV, que ocorre naturalmente quando o mosquito se alimenta num mamífero com virémia, ou em contexto laboratorial através de refeição artificial com membrana de Parafilm e uma solução de sangue desfibrinado e de uma suspensão do EHDV (Ruder, Howerth, *et al.* 2012; Mills *et al.* 2017).

Diferentes estudos sobre a progressão no tempo e o tropismo do EHDV nos tecidos do vetor (*C. sonorensis*), mostraram que o primeiro local de infeção é o intestino médio, onde a replicação viral pode ter início 48h após a alimentação, mas essa replicação parece limitada e restrita às células epiteliais do intestino médio até 5 dias após a alimentação (Mills *et al.* 2017). A partir de 5 dias após a ingestão do sangue infetado, o EHDV é disseminado pela hemolinfa para infetar os tecidos secundários suscetíveis, como: a lamela neural dos gânglios cerebrais, o intestino médio posterior, o órgão de Johnston (antena), os gânglios óticos e omatídeos do olho, o corpo gorduroso e as glândulas salivares (Mills *et al.* 2017; Nayduch *et al.* 2019). Através da imunohistoquímica observou-se também a presença do EHDV nas tráqueas e traquéolas, assim que no ovário, mas ausente na bainha ovariana, ovariolos, epitélio folicular, ovócitos e células nutrízes, pelo que não existe transmissão vertical do EHDV (Mills *et al.* 2017). Dos 6 a 10 dias após a alimentação, a replicação nos tecidos secundários aumenta, principalmente no corpo gorduroso, no intestino e nas glândulas salivares. Estas últimas são responsáveis pela transmissão do vírus durante a refeição de sangue seguinte num hospedeiro ruminante suscetível, como os cervídeos e os bovinos (Mills *et al.* 2017).

4.1.2. Impacto da temperatura e de fatores biológicos.

Os artrópodes são poiquilotérmicos, e assim a temperatura é um fator importante na capacidade de replicação e de transmissão dos orbivirus (Carpenter *et al.* 2011). Também foi evidenciado que a temperatura tem um impacto no período de incubação extrínseco (EPI), que representa o intervalo de tempo entre a ingestão da refeição infetante e a capacidade de transmitir o patogénio (Ruder *et al.* 2015). De facto, a temperatura necessária para a replicação do EHDV-1 nos *C. sonorensis* é de 19,5°C, o que é mais elevado do que nos outros orbivirus (Carpenter *et al.* 2011). Foi demonstrado que um aumento da temperatura resulta numa diminuição

do EPI, com 12 a 16 dias para obter mosquitos potencialmente competentes a 20°C, contra 2 a 4 dias a 30°C, o que sugere que as mudanças climáticas podem ter impacto epidemiológico na DHE. No entanto, são necessários mais estudos nas outras espécies de culicídeos e com mais serótipos, e aquisição de dados sobre outros fatores como, por exemplo, a humidade relativa (Ruder *et al.* 2015).

Como a transmissão do EHDV para o hospedeiro ruminante ocorre durante a alimentação hematófaga, com introdução de saliva do *Culicoides spp.*. Assim as propriedades da saliva do vetor apresenta um papel importante na eficácia da transmissão viral. De fato foi demonstrado que a saliva dos *Culicoides spp.*, nomeadamente de *C. sonorensis*, contém proteases capazes de clivar as proteínas VP2 da cápside externa do orbivirus, com clivagem completa numa estripe oriental de EHDV-2 mas pouco eficiente na estirpe ocidental do mesmo serótipo. Esta clivagem gera partículas subvirais infecciosas e, assim, aumenta a infeciosidade das partículas virais, em dez vezes para células derivadas de *C. sonorensis* (Darpel *et al.* 2011).

O nível da virémia também pode afetar a capacidade vetorial dos culicídeos, pois refeições sanguíneas em animais que apresentavam uma viremia baixa resultaram em menor eficiência da infeção do vetor e de posterior transmissão viral do EHDV-7 em *C. sonorensis* (Ruder, Howerth, *et al.* 2012). Por outro lado, a capacidade vetorial pode variar individualmente, os fatores ainda não foram completamente elucidados, mas poderiam incluir barreiras físicas, como matriz peritrófica e tecidos do intestino médio, assim que as defesas imunomediadas com as respostas imunes inatas e a via do siRNA (Nayduch *et al.* 2019).

4.2. INFEÇÃO DO RUMINANTE HOSPEDEIRO.

4.2.1. Os locais de replicação primários e secundários.

O hospedeiro ruminante suscetível é contaminado pelo EHDV via a saliva infetada do *Culicoides spp.* infetado durante a alimentação hematófaga. Nos ruminantes o primeiro local de infeção são as células dendríticas e os macrófagos. A migração destes últimos transporta o vírus para os gânglios linfáticos regionais, onde ocorre a primeira replicação viral (Howerth 2016; Jiménez-Cabello *et al.* 2023). A circulação linfática dissemina o vírus para os órgãos, especialmente o baço e os pulmões. No entanto, o EHDV já foi também detetado no fígado, no coração, no cérebro e cerebelo, na pele, nos rins, assim como, nos testículos. Depois da sua disseminação no organismo, a segunda replicação viral ocorre nos macrófagos e nas células epiteliais (Bréard *et al.* 2013; Howerth 2016; Jiménez-Cabello *et al.* 2023).

4.2.2. A resposta do interferon de tipo 1.

Inicialmente existe uma resposta do interferon de tipo 1 (IFN-1) na infecção viral, que parece dificultar a replicação viral nos estudos usando o BTV como modelo de arbovírus (Hardy *et al.* 2023). De fato os IFNs-1 são mediadores que propagam sinais dentro e entre células para induzir a expressão de efetores antivirais. Nos veados de cauda branca bem como nos ovinos infetados pelo BTV, a resposta do IFN-1 corresponde a um pico de virémia, e ao contrário, nas células endoteliais de bovinos, esta resposta é mais pronunciada, mas não é associada a virémia (Vitour *et al.* 2014; Howerth 2016; Hardy *et al.* 2023). Estes resultados sugerem que nos bovinos esta produção mais importante de IFN-1 ajuda a ter uma maior tolerância aos arbovírus (Hardy *et al.* 2023). A resposta do interferon-1 precisa de ser mais estudada, nomeadamente no caso das infeções com o EDHV.

4.2.3. O papel da libertação das interleucinas 1 e 6.

Além dos danos diretamente provocados pela replicação do EHDV nos macrófagos e nas células epiteliais, foi observado a libertação de citocinas pró-inflamatórias, as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6). Da mesma maneira, foi mostrado um aumento da transcrição dos genes que codificam IL-1 e IL-6 em culturas de células endoteliais microvasculares, de ovelhas e bovinos, infetados pelo BTV (Sharma *et al.* 2016). Estas interleucinas são mediadores da inflamação e da vasodilatação, como também o óxido nítrico, e podem contribuir na severidade da doença clínica (Howerth 2016; Sharma *et al.* 2016; Jiménez-Cabello *et al.* 2023). De fato, a libertação de IL-1 conduz as respostas da fase aguda, como a vasodilatação e um aumento da permeabilidade vascular, o que induz a febre, a hiperémia e a exsudação de fluido nos tecidos moles e nas cavidades corporais (Howerth 2016; Sharma *et al.* 2016). Em resposta as lesões teciduais, e outros estímulos inflamatórios, a IL-1 pode também estimular a produção de IL-6 pelos macrófagos e células endoteliais (Sharma *et al.* 2016). De acordo com estes autores, a IL-6 pode promover uma resposta tanto pró-inflamatória, quanto anti-inflamatória, e representa um dos principais mediadores das manifestações clínicas associadas a lesões teciduais que foram observadas nos veados de cauda branca (febre, caquexia, leucocitose e trombocitose, elevação dos níveis plasmáticos de proteínas de fase aguda e diminuição dos níveis plasmáticos de albumina).

O papel das interleucinas nas diferenças de severidade clínica nas diversas espécies suscetíveis ao EHDV merecem estudos mais aprofundados. Para além dos danos provocados pela libertação das citocinas, o EHDV otimiza as condições de replicação nas células epiteliais, através as vias celulares, como a autofagia e a apoptose (Shai *et al.* 2013). Nos ensaios que utilizam células do endotélio da artéria carótida e da artéria pulmonar de bovinos, mostraram que *in vitro*, o EHDV parece beneficiar do stress celular para induzir autofagia, e contribuir para replicação viral. Igualmente a apoptose foi induzida diretamente pela replicação viral e sugerida como um mecanismo importante na patogenia do EHDV (Shai *et al.* 2013; Sharma, Stallknecht and Howerth 2016). De fato,

a lesão provocada pela apoptose das células do epitélio vascular leva a hemorragias e trombozes (Shai *et al.* 2013; Howerth 2016; Jiménez-Cabello *et al.* 2023).

4.3. FORMA CLÍNICA DA DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA.

O EHDV geralmente provoca doença grave com alta morbidade e mortalidade nos cervídeos cativos e selvagens, especialmente nos veados de cauda branca com síndrome febril (Zientara *et al.* 2023). De fato, esta espécie serve como o principal modelo animal. Os bovinos também suscetíveis, mas desenvolvem raramente a doença clínica, ou de forma menos severa do que nos ruminantes selvagens. No entanto, mesmo com infecções assintomáticas, os bovinos podem desenvolver altos níveis de viremia em função da exposição ao vírus, e podem servir então de hospedeiro amplificador na epidemiologia do EHDV. Esta característica permite a utilização desta espécie pecuária como animal sentinela (Nol *et al.* 2010; Garrett *et al.* 2015; Ruder *et al.* 2016; Hairgrove *et al.* 2018; Becker *et al.* 2020; Spedicato *et al.* 2023).

4.3.1. Sinais clínicos.

Os sinais clínicos mais comuns reportados nos veados de cauda branca compreendem febre, depressão, anorexia, eritema nas regiões de pêlo fino, pêlo com mau aspeto, hiperémia das conjuntivas e da mucosa oral, dificuldade respiratória, desidratação e perda de peso (Figura 2). São também observados casos com edema da face e do pescoço, ptialismo, decúbito e relutância em levantar e tendência para quadros hemorrágicos como hemorragias orais (Nol *et al.* 2010; Ruder, Allison, *et al.* 2012; Garrett *et al.* 2015; Stevens *et al.* 2015; Hairgrove *et al.* 2018; Zientara *et al.*, 2023). Nos indivíduos que sobrevivem à doença aguda pode-se desenvolver uma forma crônica com inapetência e letargia contínua, laminite e deformação dos cascos, assim como, ulceração no rúmen e no trato gastrointestinal (Nol *et al.* 2010; Zientara *et al.* 2023).



Figura 2. Desenvolvimento de doença clínica em veado de cauda branca pelo EHDV-2. Este animal no dia 4 após a infecção apresentou má condição corporal e pêlo com mau aspeto. Se observa eritema da pele periorbitária (Howerth 2016).

Na maioria do tempo, os bovinos são assintomáticos ou manifestam doença subclínica. Contudo casos clínicos, com graves consequências econômicas, ocorreram em exploração bovinas durante os surtos de EHDV-2 Ibaraki no Japão, de EHDV-7 em Israel (Kamomae *et al.* 2018). De maneira geral, como nos ruminantes selvagens, as manifestações clínicas da DHE nos bovinos são similares às da doença da Língua Azul. Assim, os animais apresentam anorexia, febre, secreções nasais e ptialismo, pálpebras e língua inchadas (Figura 3), edema submandibular e disfagia, lesões ulcerativas na mucosa oral (Figura 4), desidratação, laminites e também uma importante diminuição da produção leiteira (Temizel *et al.*, 2009; Bréard *et al.* 2013; Garrett *et al.* 2015; Hairgrove *et al.* 2018; Becker *et al.* 2020; Spedicato *et al.* 2023). Existem também casos onde foram relatados cessação da ruminação, e ao nível reprodutivo abortos e má-formações congênitas (Bréard *et al.* 2013; Golender *et al.* 2021). Os bovinos afetados pelo EHDV normalmente recuperam, e se ocorrer a morte, não está geralmente relacionada com uma patogênese viral aguda, mas com uma doença secundária (Garrett *et al.* 2015).



Figura 3. Conjuntiva inchada de vaca seropositiva para o EHDV, Turquia, 2007 ().



Figura 4. Lesão erosiva na mucosa oral de vaca seropositiva para o EHDV, Turquia, 2007 (Temizel *et al.*, 2009).

Os vitelos desenvolvem virémia, que é detetável a partir de 2 a 4 dias após a inoculação do vírus, mas eles parecem menos afetados do que os animais adultos. De fato, nos surtos de EHDV-6 na Turquia e em Marrocos, os bovinos afetados tinham entre dois e cinco anos, no entanto na ilha da Reunião a doença atingia animais de

seis meses a dez anos, sugerindo que essa variação de suscetibilidade dependente da idade para desenvolver doença clínica seria também dependente do serótipo e da estirpe de EHDV (Bréard *et al.* 2013). Estudos onde foram realizadas infecções experimentais em vitelos de 2 a 5 meses mostraram que os serótipos EHDV-7 (estirpe Israel) e EHDV-8 emergente na Europa são capazes de provocar doença clínica nestes animais jovens (Ruder *et al.* 2016; Sailleau *et al.* 2019; Spedicato *et al.* 2023). Os sinais clínicos observados compreendem para os dois serótipos febre, nas infecções por EHDV-7 foi identificada apatia, diarreia, prostração, incapacidade de ficar de pé e anorexia, e nas infecções por EHDV-8 eritema, úlceras e hemorragias nasais evoluindo em lesões crostosas e salivação excessiva (Figura 5). No entanto, não foram observadas lesões orais. Demais foram efetuados análises hematológicas, nos animais infetado por EHDV-8 foi observado uma diminuição significativa da contagem das células vermelhas e um aumento da contagem das células da linha branca (Tabela 3) (Ruder *et al.* 2016; Sailleau *et al.* 2019; Spedicato *et al.* 2023).

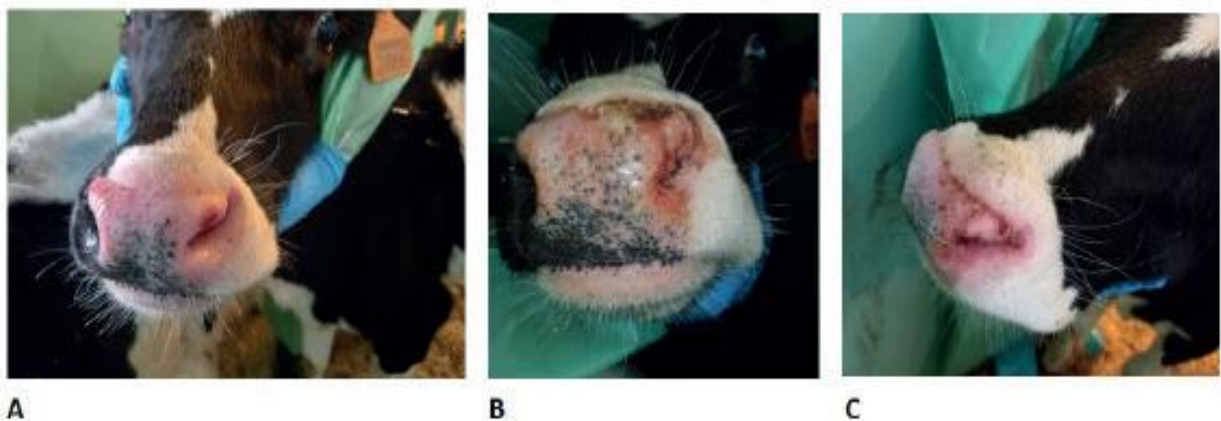


Figura 5. Infecção experimental com inoculado de EHDV-8 em vitelo Holstein-Friesian de 4-5 meses de idade. A partir de 6 dpi, um dos quatros vitelos apresentou sinais clínicos compatível com a DHE, incluindo eritema, úlceras e hemorragias nas narinas (A). Essas lesões pioraram em lesões crostosas e úlceras no nariz (B). Foi também observado ptialismo leve, mas não houvesse lesões orais. Aos 10 dpi, após a descamação das crostas, foram observadas úlceras e hemorragias (C) (Spedicato *et al.* 2023).

Tabela 3. Análises hematológicas de vitelos Holstein-Friesian de 4-5 meses experimentalmente infectados por EHDV-8 (Spedicato et al. 2023).

Parâmetros	mediana pré-infecção	mediana pós-infecção	Valor P
hematócrito (%)	28,1	27,5	0,456
concentração de hemoglobina (g/dL)	10,75	10,25	0,053
contagem de plaquetas (10^3 /mCL)	570,5	517	0,288
contagem das células vermelhas (10^6 /mCL)	8,905	8,065	<0,001
contagem das células da linha branca (10^3 /mCL)	10,09	11,875	0,04

4.3.2. Exame pós-mortem.

Como geralmente nos bovinos as manifestações clínicas da doença são menos importantes do que nos cervídeos, também nas necropsias habitualmente não se observam lesões tão graves. Contudo, macroscopicamente foram descritas lesões como, edema do esôfago, faringe e língua em vaca infectada pelo EHDV-6 que apresentava sinais de disfagia, assim como dilatação do lúmen do esôfago (Figura 6) (Kamomae *et al.* 2018). Num outro estudo, uma vaca inoculada com o EHDV-7 tinha uma efusão pleural severa (Ruder *et al.* 2016).



Figura 6. Lesões no esôfago da vaca necropsizada, Japão, 2015. Dilatação do lúmen. Secção transversal do esôfago fixado em formalina: controlo (esquerda) e da vaca afetada pelo EHDV-6 onde observamos uma dilatação do lúmen (direita) (Kamomae *et al.* 2018).

Nos veados de cauda branca, as lesões observadas referem petéquias até hemorragias equimóticas em vários tecidos, incluindo o pericárdio, as serosas e mucosas gastrointestinais, edema e congestão pulmonar e efusões pleurais (Figura 7), necrose e até úlceras perforantes no duodeno (Ruder, *et al.* 2012).



Figura 7. Lesões macroscópicas resultantes de doença clínica em veados de cauda branca infetados com EHDV. (A) A doença pode ser hiperaguda com a morte no prazo de 4 dias após a infecção, geralmente como resultado de edema pulmonar grave. (B) Os animais que sobrevivem durante mais tempo desenvolvem a forma aguda mais típica de doença caracterizada por hemorragias graves, como se verifica no rúmen deste veado de cauda branca no dia 8 após a infecção. (C) Danos vasculares resultam na ulceração da cavidade oral e do trato gastrointestinal na forma subaguda da doença (Howerth 2016).

As observações histopatológicas geralmente correspondem ao quadro da doença, com congestão, edema, e hemorragias com ou sem necrose nos pulmões, no baço, na mucosa do rúmen e nas camadas musculares do trato gastrointestinal, trombose e necrose fibrinóide no epitélio vascular (Nol *et al.* 2010; Ruder, Allison, *et al.* 2012; Kamomae *et al.* 2018). No entanto, como nos bovinos a severidade clínica, e mortalidade quando acontece, é habitualmente causada por uma doença ou infeção secundária, pode ser complicado determinar se as lesões são parcialmente ou totalmente da responsabilidade do EHDV (Garrett *et al.* 2015; Sailleau *et al.* 2019).

5. METODOS DE DIAGNOSTICO.

5.1. METODOS LABORATORIAIS.

Nos bovinos as infeções pelo EHDV são frequentemente subclínicas, ou assintomáticas, contudo quando a doença clínica se manifesta, os sinais clínicos ficam inespecíficos e semelhantes aos outras doenças, como na doença da língua azul. Por esta razão, um diagnóstico laboratorial é indispensável. A partir das amostras clínicas (sanguíneas ou tecidos provenientes de necrópsias como os pulmões, o baço ou linfonodos por exemplo), a identificação do EHDV passava inicialmente por métodos de isolamento do vírus em células de cultura, ou ovos embrionados de galinha, seguido de um teste de neutralização viral (VNT) utilizando soros de referência. Mas infelizmente, estes últimos não estão disponíveis para cada serótipo (Viarouge *et al.* 2015).

5.2. ENSAIOS DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

Como os procedimentos de isolamento viral e os VNT são muitos demorados (pelo menos duas semanas), foram desenvolvidos métodos mais rápidos: os ensaios de reacção em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) (Maan *et al.* 2010; Viarouge *et al.* 2015). Estes diversos métodos de PCR permitem detetar o RNA do EHDV em amostras clínicas, como sangue ou baço, sem a necessidade de isolar o vírus. Os ensaios de RT-PCR são direccionados para NS1 ou NS3, que são codificadas por genes altamente conservados, ou por VP2 ou VP3, que apresentam uma maior variabilidade genética (Clavijo *et al.* 2010). Estes métodos apresentam boa sensibilidade e especificidade. No entanto, devido à alta variabilidade encontrada na região S2 do segmento 2 do vírus, é provável que novas estirpes tenham alterações nos locais de ligação dos primers e sondas utilizados nesses ensaios. Diversos estudos mostram uma variabilidade de 30 a 35 % nas sequências nucleotídicas da região S2 entre estirpes do mesmo serótipo (Viarouge *et al.* 2015; Portanti *et al.* 2023).

5.3. ENSAIOS RECENTEMENTE DESENVOLVIDOS.

Viarouge *et al.* (2015) criaram um ensaio pan-EHDV duplex RT-PCR que amplifica uma região do segmento 9 de todas as estirpes de EHDV, juntamente com ensaios de serotipagem específicos para amplificar a parte do segmento 2 de cada serótipo. Também foi incluído um ensaio para amplificar o gene β -actina como controlo interno. Estes ensaios foram desenvolvidos e validados para serem aplicados em amostras biológicas de campo, permitindo a deteção e caracterização do EHDV de diferentes serótipos, e apresentam uma especificidade e sensibilidade de 98 e 99%, respetivamente.

Recentemente, ensaios de transcrição reversa mediada por loop isotérmico amplificação (RT-LAMP) foram desenvolvidos para deteção rápida e precisa do EHDV, com potencial de uso em campo. Devido à diversidade da sequência deste orbivírus, foram projetados dois conjuntos de iniciadores para deteção das estirpes de topótipo ocidental (s9.W) e oriental (s9.E), ambos direccionados ao Seg-9 do genoma do EHDV (Rajko-Nenow *et al.* 2021). Ambos os conjuntos de iniciadores demonstraram alta especificidade para o EHDV, detetando mais de 40 isolados de EHDV representando oito serótipos conhecidos, de diferentes locais do mundo. Os ensaios RT-LAMP podem ser usados tanto em formato único quanto multiplex, sendo mais sensíveis no formato único, e poderiam ser úteis em áreas com suspeita de circulação de várias estirpes. A sensibilidade do ensaio s9.W RT-LAMP foi calculada em 72,2% em relação à RT-qPCR. O RT-LAMP é económico, pode ser adaptado para uso em laboratórios de diagnóstico existentes e representa uma alternativa viável ao RT-qPCR (Rajko-Nenow *et al.* 2021).

5.4. OS TESTES SEROLÓGICOS.

Nos Estados Unidos da América, os testes serológicos mais comuns realizados pela National Animal Health Laboratory Network são a imunodifusão em gel de ágar (AGID) e ensaios imunoenzimáticos competitivos (cELISA). No entanto, o AGID apresenta alguns problemas de sensibilidade e de especificidade a causa da alta reatividade cruzada entre BTV e EHDV, tornando este teste como inapropriado na determinação do estado serológico negativo em animais individuais. Os kits comerciais cELISA são mais sensíveis e específicos, porém caros e exigem testes individuais para cada vírus (Drolet and Reister-Hendricks 2021). De um outro lado, uma nova tecnologia foi desenvolvida: o Imunoensaio com Microesferas Fluorescentes (FMIA), a fim de detetar os anticorpos contra os dois orbivírus numa única amostra, oferecendo assim uma maior sensibilidade, e a capacidade de diferenciar o BTV e o EHDV simultaneamente (Drolet and Reister-Hendricks 2021). Comparada ao cELISA comercial, a FMIA duplex apresentou um maior desempenho na deteção de anticorpos BTV, embora com menor especificidade, e na deteção de anticorpos EHDV com maior sensibilidade. A FMIA oferece vantagens em termos de capacidade de deteção simultânea e rápida, reduzindo o tempo e o custo necessários para testes de regulamentação do comércio animal e identificação de riscos para rebanhos vizinhos (Drolet and Reister-Hendricks 2021).

6. ABORDAGENS DE PREVENÇÃO e COMBATE AO VÍRUS DA DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA.

6.1. TRATAMENTO DA DOENÇA HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA.

Atualmente não existe tratamento específico contra o EHDV, então no caso de desenvolvimento de doença clínica, só um tratamento de suporte adaptado pode ser implementado. Este baseia-se no isolamento do animal para obter condições permitindo o seu repouso, a realização de fluidoterapia com eletrólitos para corrigir a desidratação e o desequilíbrio eletrolítico assim que a anorexia, a administração de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) no objetivo de reduzir a inflamação e controlar a pirexia, e também de diuréticos, como a furosemida, a fim de reduzir o edema associado à vasculite (Garrett *et al.* 2015; Gamsjäger and Chigerwe 2023). Não devem ser esquecidas os riscos de infeções secundárias, e no caso onde existe, devem ser tratadas com a administração de antibióticos adaptados (Gamsjäger and Chigerwe 2023).

6.2. VACINAS.

6.2.1. Vacinas autólogas.

Os Estados Unidos, onde a DHE é endêmica, no objetivo de controlar a doença nas explorações de veados cativos, elaboraram vacinas autógenas a partir de amostras biológicas, através do isolamento e da cultura da

estirpe específica do vírus envolvido na infeção (Scott and James 2015; Jiménez-Cabello *et al.* 2023). Os agentes patogénicos são então inativados para produzir a vacina destinada ao rebanho (Scott and James 2015). Nos Estados Unidos, as vacinas autógenas têm sido desenvolvidas usando antígenos inativados do BTV e EHDV, assim a maioria contém múltiplos serótipos de EHDV e BTV. Estas vacinas são amplamente empregadas em ovelhas e na produção de cervídeos em cativeiro. Embora, consideradas relativamente seguras, a eficácia e a efetividade destas vacinas levantam algumas dúvidas (Scott and James 2015).

6.2.2. Vacinas vivas modificadas ou inativadas.

No Japão a doença de Ibaraki provocou casos clínicos graves em bovinos, com alta mortalidade e consequências económicas importantes, para controlar os surtos e a gravidade destes, foi desenvolvido e utilizado uma vacina viva modificada monovalente e uma vacina viva inativada bivalente, ambas derivadas da estirpe EHDV-2 Ibaraki (Spedicato *et al.* 2014; Scott and James 2015; Jiménez-Cabello *et al.* 2022). Nos orbivírus como o BTV e o EHDV, os antígenos neutralizantes dos orbivírus estão localizados na proteína VP2 da cápside externa, enquanto a proteína VP5, pode influenciar a conformação de epítomos individuais em VP2. Assim, as respostas imunes provocadas pela vacinação e a recuperação pós-infeção, incluem produção de anticorpos neutralizantes contra VP2, bem como respostas imunes celulares humorais não neutralizantes, e citotóxicas, direcionadas a outras proteínas virais estruturais e não estruturais (Scott and James 2015; Jiménez-Cabello *et al.* 2023).

As vacinas realizadas a partir de vírus inteiros inativados são consideradas muitas seguras quando são produzidas corretamente, e podem ser altamente eficientes. Em teoria seria possível desenvolver estratégias para distinguir animais infetados de animais vacinados, com esse tipo de vacinação, embora ainda não estejam disponíveis (Scott and James 2015). Estudos indicam que as vacinas inativadas contra o BTV são eficazes para reduzir a virémia e os sintomas da doença em animais vacinados. Além disso, observa-se que as respostas de anticorpos podem perdurar por vários anos em muitos casos. Essa redução da virémia permitiu, durante os surtos de BTV-8, na Europa prevenir a transmissão vetorial e transplacentária (Scott and James 2015). A segurança da vacina viva inativada contra EHDV-2 foi avaliada em vacas gestantes, e mostrou que esta vacina é inócua. Do fato, não houve ocorrência de sinais clínicos ou abortos. A deteção de virémia em apenas um animal, por um dia, após a vacinação, sugere que o produto é seguro em relação à propagação do vírus da vacina no ambiente. Também, contrariamente aos vírus das vacinas contra a língua azul, os contra a DHE não atravessaram a placenta e não infetaram os tecidos fetais (Spedicato *et al.* 2014).

As vacinas vivas modificadas são economicamente viáveis para produção em larga escala, conferem imunidade protetora com uma única aplicação e demonstraram eficácia na prevenção da doença clínica da língua azul nas regiões onde são utilizadas, como por exemplo nos rebanhos de pequenos ruminantes em Portugal. A capacidade dessas vacinas de estimular uma resposta robusta de anticorpos está diretamente ligada à sua capacidade de

replicação no organismo vacinado. Contudo, estas vacinas apresentam diferentes consequências adversas potenciais, como doença clínica com reduções importantes da produção leiteira, e a possibilidade de disseminação através de vetores, podendo resultar em reversão para virulência e/ou rearranjo genético entre as vacinas vivas modificadas e estirpes virais de campo (Scott and James 2015).

6.2.3. Vacina de subunidade recombinante

As vacinas de proteína recombinante oferecem vantagens significativas como estratégias potenciais contra o EHDV. Ao contrário das vacinas vivas modificadas, que podem reorganizar seus genes com estirpes selvagens, as vacinas de subunidade recombinante apresentam risco mínimo para o meio ambiente. Compostas por um número limitado de antigénios selecionados, podem ser projetadas com compatibilidade DIVA em mente, que é a capacidade de distinguir animais infetados de vacinados. Assim, recentemente foram produzidas num sistema de expressão de baculovírus, proteínas da cápside externa VP2 recombinantes (rVP2) dos serótipos EHDV-2 e EHDV-6. Foi mostrado que a formulação contendo rVP2 estimulou respostas de anticorpos neutralizantes em ratos e bovinos, e protegeu veados de cauda branca contra o EHDV virulento em testes de desafio. No entanto, a longevidade da imunidade protetora e a capacidade de resposta a múltiplos serótipos ainda precisam ser estudadas para aprimorar a eficácia e a formulação das vacinas contra o EHDV (Sunwoo *et al.* 2020).

6.2.4. Outras vacinas candidatas experimentais.

Como a DHE é menos severas nas espécies pecuárias do que a doença da língua azul, houve menos esforços nas pesquisas para desenvolver vacinas de proxima gerações contra o EHDV, do que contra o BTV. Mas com a recente detecção de casos de EHDV-8 na União Europeia, um reforço da investigação seria possível. No entanto, com a imprevisibilidade da epidemiologia do EHDV, é necessário encontrar novas abordagens vacinais que abranjam múltiplos serótipos (Jiménez-Cabello *et al.* 2023). Por isso, foi recentemente desenvolvido um sistema genético reverso, e também, os conhecimentos adquiridos na produção de partículas semelhantes a vírus (VLPs) de BTV, foram aplicados para gerar partículas semelhantes a núcleo (CLPs) e VLPs de EHDV (Jiménez-Cabello *et al.* 2022). As CLPs do EHDV, compostas pelas proteínas intermediárias VP7 e internas VP3, fornecem a estrutura para a montagem dos VLPs. Foi mostrado que os VLPs do EHDV são capazes de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes específicos para um mesmo serótipo, mas níveis mais baixos contra os outros serótipos. Também, produzir VLPs recombinantes do EHDV via baculovírus pode encontrar limitações, assim a produção baseada em plantas seria uma abordagem altamente desejável (Scott and James 2015; Jiménez-Cabello *et al.* 2022).

6.3. MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLO DE SURTOS.

Entre as várias estratégias possíveis no controlo da DHE, uma consiste na exclusão da infeção da região, ou país, em causa, evitando então a introdução do hospedeiro mas também de vetores infetados. Nas áreas endêmicas ou invasivas, as estratégias de eleição são profiláticas ou terapêuticas (Maclachlan *et al.* 2015). Nos animais selvagens, geralmente é considerado impraticável de tratar. Nos bovinos a doença de Ibaraki provoca uma alta mortalidade devida a disfagia e a pneumonia por aspiração, nas infeções por outras estirpes de EHDV, a letalidade é mais rara, e quando ocorre a morte do animal é geralmente a consequência de infeções secundárias, assim a prevenção e tratamento dessas complicações não devem ser negligenciados (Maclachlan *et al.* 2015). Hoje em dia, no mercado não existe vacinas seguras e eficientes, então o melhor método para diminuir a transmissão do EHDV entre a fauna selvagem e as espécies pecuárias fica, o controlo dos insetos vetores, através a redução das populações de mosquitos com a aplicação de tratamentos químicos direcionados aos mosquitos imaturos e adultos e a redução dos habitats larvares. Desta maneira, a limitação do contato entre os vetores e os hospedeiros, diminui a transmissão viral durante os surtos (Noronha *et al.* 2021). Contudo, em pastagens extensas fica um desafio, devido as grandes superficies geograficas a tratar, os esforços de manejo e uma quantidade importante de produtos são necessários para uma aplicação eficaz de inseticidas. Demais o tratamento do ambiente tão como os tratamentos pour-ons dos animais apresentam impactos ecologicos negativos que não podem ser descartados. Por isso, estão em desenvolvimento pesticidas de próxima geração baseados em tecnologias de controlo de mosquitos, ao fim de reduzir a exposição a pesticidas químicos e minimizar o impacto em espécies não-alvos. Outras técnicas visando o controlo dos surtos de EHDV, através de tratamentos específicos dos vetores, estão em desenvolvimento, como técnicas do inseto estéril, infeções por Wolbachia e também RNAi. O estudo da epidemiologia e a identificação contínua de novas espécies vetores são fundamentais para antecipar e controlar a doença (Noronha *et al.* 2021).

7. CONCLUSÃO.

Os recentes surtos e deteções do vírus da Doença Hemorrágica Epizoótica em novas regiões do mundo, nomeadamente na União Europeia, motivaram um avanço significativo dos conhecimentos atuais sobre a DHE. De fato, com a expansão da área de repartição geográfica do EHDV, aprofundar os conhecimentos sobre a epidemiologia, a patogénese e as estratégias de controlo da doença parecem agora ainda mais importante.

Diversos estudos revelaram que este orbivírus transmitido por artrópodes do género *Culicoides*, afeta os ruminantes silvestres e domésticos, com uma maior severidade clínica nas espécies selvagens, especialmente nos veados de cauda branca. Contudo, nos últimos anos algumas estirpes causam doenças mais severas nos

bovinos e impactam a produção pecuária. Assim, virulência do vírus nas espécies domésticas preocupa sempre mais.

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais eficientes e rápidos na identificação das infeções por EHDV em bovinos faz parte dos desafios atuais, permitindo de implementar melhores medidas de controlo e a lutar contra a propagação da doença, e assim, reduzindo o impacto económico na produção animal.

Demais, num objetivo de prevenção de futuros surtos, a investigação de vacinas contra o EHDV aumentou substancialmente, no fim de obter vacinas seguras, eficientes e com capacidade DIVA. Neste processo, a utilização de modelos animais desempenha um papel fundamental na análise da eficácia e segurança das vacinas candidatas.

Uma outra parte primordial é o controlo da transmissão, através da monitorização contínua dos vetores *Culicoides spp.* e da distribuição geográfica destes. De fato, com o aumento das atividades humanas e as mudanças climáticas, existe uma necessidade crescente de perceber o impacto destes fatores na ecologia dos vetores e na dinâmica da doença.

Por fim, os recentes progressos nos conhecimentos sobre a DHE em bovinos mostram o papel fundamental da investigação multidisciplinar, nomeadamente na epidemiologia, na imunologia, na virologia e no controlo dos vetores. Estes esforços são essenciais para melhorar a prevenção e o controlo da doença, no âmbito da proteção da saúde animal e da economia pecuária.

8. BIBLIOGRAFIA.

- Allen, SE, Jardine, CM, Hooper–McGrevy, K, Ambagala, A, Bosco-Lauth, AM, Kunkel, MR, Mead, DG, Nituch, L, Ruder, MG & Nemeth, NM 2020, “Serologic evidence of Arthropod-Borne virus infections in wild and captive ruminants in Ontario, Canada,” *the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(5):2100–2107, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0539>.
- Allen, SE, Rothenburger, JL, Jardine, CM, Ambagala, A, Hooper–McGrevy, K, Colucci, N, Furukawa-Stoffer, TL, Vigil, SL, Ruder, MG & Nemeth, NM 2019, “Epizootic hemorrhagic disease in White-Tailed Deer, Canada,” *Emerging Infectious Diseases (Print)*, 25(4):832–834, <https://doi.org/10.3201/eid2504.180743>.
- Allison, AB, Holmes, EC, Potgieter, AC, Wright, IM, Sailleau, C, Bréard, E, Ruder, MG & Stallknecht, DE 2012, “Segmental configuration and putative origin of the reassortant orbivirus, epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6, strain Indiana,” *Virology*, 424(1):67–75, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.004>.
- Anbalagan, S, Cooper, E, Klumper, P, Simonson, RR & Hause, BM 2014, “Whole genome analysis of epizootic hemorrhagic disease virus identified limited genome constellations and preferential reassortment,” *Journal of General Virology (Print)*, 95(2):434–441, <https://doi.org/10.1099/vir.0.059659-0>.
- Becker, ME, Roberts, JL, Schroeder, ME, Gentry, GT & Foil, LD 2020, “Prospective study of epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus transmission in captive ruminants,” *Journal of Medical Entomology*, 57(4):1277–1285, <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa027>.
- Belhouchet, M, Jaafar, FM, Firth, AE, Grimes, JM, Mertens, PPC & Attoui, H 2011, “Detection of a fourth orbivirus Non-Structural protein,” *PloS One*, 6(10):e25697, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025697>.
- Boyce, M, Celma, CP & Roy, P 2012, “Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis,” *Virology Journal*, 9(1):, <http://www.virologyj.com/content/9/1/178>.
- Bréard, E, Belbis, G, Viarouge, C, Riou, M, Desprat, A, Moreau, J, Laloy, E, Martin, G, Sarradin, P, Vitour, D, Batten, C, Doceul, V, Sailleau, C & Zientara, S 2013, “Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 experimentation on adult cattle,” *Research in Veterinary Science/Research in Veterinary Science*, 95(2):794–798, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.06.026>.
- Brown-Joseph, T, Rajko-Nenow, P, Hicks, H, Sahadeo, N, Harrup, LE, Carrington, CVF, Batten, C & Oura, C 2019, “Identification and characterization of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 in cattle co-infected with bluetongue virus in Trinidad, West Indies,” *Veterinary Microbiology (Amsterdam. Print)*, 2291–6, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.12.009>.
- Carpenter, S, Groschup, MH, Garros, C, Felipe-Bauer, ML & Purse, BV 2013, “Culicoides biting midges, arboviruses and public health in Europe,” *Antiviral Research (Print)*, 100(1):102–113, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.020>.

- Carpenter, S, Wilson, AJ, Barber, J, Veronesi, E, Mellor, PS, Venter, GJ & Gubbins, S 2011, "Temperature dependence of the extrinsic incubation period of orbiviruses in culicoides biting midges," *PloS One*, 6(11):e27987, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027987>.
- Clavijo, A, Sun, F, Lester, T, Jaspersen, DC & Wilson, WC 2010, "An improved Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Simultaneous Detection of All Serotypes of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus," *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(4):588–593, <https://doi.org/10.1177/104063871002200414>.
- Cuéllar, AC, Kjær, LJ, Kirkeby, C, Skovgård, H, Nielsen, SA, Stockmarr, A, Andersson, G, Lindström, A, Chirico, J, Lühken, R, Steinke, S, Kiel, E, Gethmann, J, Conraths, FJ, Larska, M, Hamnes, IS, Sviland, S, Hopp, P, Brugger, K, Rubel, F, Balenghien, T, Garros, C, Rakotoarivony, I, Allène, X, Lhoir, J, Chavernac, D, Delécolle, J-C, Mathieu, B, Delécolle, D, Setier-Rio, M-L, Venail, R, Scheid, B, Miranda, MÁ, Barceló, C, Lucientes, J, Estrada, R, Mathis, A, Tack, W & Bødker, R 2018, "Spatial and temporal variation in the abundance of Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in nine European countries," *Parasites & Vectors*, 11(1):, <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2706-y>.
- Darpe, KE, Langner, K, Nimtz, M, Anthony, SJ, Brownlie, J, Takamatsu, H, Mellor, PS & Mertens, PPC 2011, "Saliva proteins of vector culicoides modify structure and infectivity of bluetongue virus particles," *PloS One*, 6(3):e17545, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017545>.
- Dhaou, SB, Sailliau, C, Babay, B, Viarouge, C, Sghaier, S, Zientara, S, Hammami, S & Bréard, E 2016, "Molecular characterisation of epizootic haemorrhagic disease virus associated with a Tunisian outbreak among cattle in 2006," *Acta Veterinaria Hungarica*, 64(2):250–262, <https://doi.org/10.1556/004.2016.025>.
- Drolet, BS & Reister-Hendricks, LM 2021, "A duplex fluorescent microsphere immunoassay for detection of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease virus antibodies in cattle sera," *Viruses*, 13(4):682, <https://doi.org/10.3390/v13040682>.
- Duan, Y, Yang, ZJ, Zhu, P, Liu, X, Li, Zhanhong, Li, Zhuoran, Li, L & Zhu, J 2022, "A serologic investigation of epizootic hemorrhagic disease virus in China between 2014 and 2019," *Virologica Sinica/Virologica Sinica*, 37(4):513–520, <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.06.005>.
- Federici, V, Ippoliti, C, Catalani, M, Di Provvido, A, Santilli, A, Quaglia, M, Mancini, G, F, DN, Di Gennaro, A, Leone, A, Teodori, L, Conte, A & Savini, G 2016, "Epizootic haemorrhagic disease in Italy: vector competence of indigenous Culicoides species and spatial multicriteria evaluation of vulnerability.," *PubMed*, 52(3–4):271–279, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27723036>.
- Gamsjäger, L & Chigerwe, M 2023, "Clinical presentation, medical management, and outcomes in 35 hospitalized sheep diagnosed with bluetongue virus disease," *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 38(1):514–519, <https://doi.org/10.1111/jvim.16944>.

- Garrett, EF, Po, E, Bichi, ER, Hexum, SK, Melcher, R & Hubner, AM 2015, "Clinical disease associated with epizootic hemorrhagic disease virus in cattle in Illinois," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247(2):190–195, <https://doi.org/10.2460/javma.247.2.190>.
- Golender, N & Bumbarov, V 2019, "Detection of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus serotype 1, Israel," *Emerging Infectious Diseases*, 25(4):825–827, <https://doi.org/10.3201/eid2504.180149>.
- Golender, N, Bumbarov, V, Kovtunenکو, 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):2136, <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>.
- Hairgrove, T, Rodgers, SJ, Cook, WM, Budke, CM & Smith, WB 2018, "Review of epizootic hemorrhagic disease in cattle and a study defining seroprevalence of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 2 in Texas cattle," *the α Bovine Practitioner*, 10–15, <https://doi.org/10.21423/bovine-vol52no1p10-15>.
- Hardy, A, Bakshi, S, Furnon, W, MacLean, OA, Gu, Q, Varjak, M, Varela, M, Aziz, MA, Shaw, A, Pinto, RM, Ruiz, NC, Mullan, C, Taggart, A, Da Silva Filipe, A, Randall, RE, Wilson, SJ, Stewart, M & Palmarini, M 2023, "The Timing and Magnitude of the Type I Interferon Response Are Correlated with Disease Tolerance in Arbovirus Infection," *MBio*, 14(3);, <https://doi.org/10.1128/mbio.00101-23>.
- He, Y, Meng, J, Li, N, Zhao, L, Wang, D, Kou, M, Yang, ZX, Li, Y, Zhang, L & Wang, J 2024, "Isolation of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Serotype 10 from *Culicoides tainanus* and Associated Infections in Livestock in Yunnan, China," *Viruses*, 16(2):175, <https://doi.org/10.3390/v16020175>.
- Howerth, EW 2016, "Cytokine release and endothelial dysfunction: a perfect storm in orbivirus pathogenesis," *PubMed*, 51(4):275–81, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26741244>.
- Jiménez-Cabello, L, Utrilla-Trigo, S, Barreiro-Piñeiro, N, Pose-Boirazian, T, Martínez-Costas, J, Marín-López, A & Ortego, J 2022, "Nanoparticle- and Microparticle-Based Vaccines against Orbiviruses of Veterinary Importance," *Vaccines*, 10(7):1124, <https://doi.org/10.3390/vaccines10071124>.
- Jiménez-Cabello, L, Utrilla-Trigo, S, Lorenzo, G, Ortego, J & Calvo-Pinilla, E 2023, "Epizootic Hemorrhagic Disease Virus: Current knowledge and emerging perspectives," *Microorganisms*, 11(5):1339, <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051339>.
- Kamomae, Y, Kamomae, M, Ohta, Y, Nabe, M, Kagawa, Y, Ogura, Y, Kato, T, Tanaka, S, Yanase, T & Shirafuji, H 2018, "Epizootic Hemorrhagic Disease virus serotype 6 infection in cattle, Japan, 2015," *Emerging Infectious Diseases*, 24(5):902–905, <https://doi.org/10.3201/eid2405.171859>.
- Maan, NS, Maan, S, Nomikou, K, Johnson, DJ, Harrak, ME, Madani, H, Yadin, H, İnçođlu, Ş, Yeşilbağ, K, Allison, AB, Stallknecht, DE, Batten, C, Anthony, SJ & Mertens, PPC 2010, "RT-PCR Assays for Seven Serotypes of

- Epizootic Haemorrhagic Disease Virus & Their Use to Type Strains from the Mediterranean Region and North America,” *PloS One*, 5(9):e12782, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012782>.
- Maan, NS, Maan, S, Potgieter, AC, Wright, IM, Belaganahalli, MN & Mertens, PPC 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, NJ, Zientara, S, Savini, G & Daniels, PW 2015, “Epizootic haemorrhagic disease,” *Revue Scientifique Et Technique - Office International Des Épizooties (Imprimé)*, 34(2):341–351, <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2361>.
- McGregor, BL, Shults, P & McDermott, EG 2022, “A review of the vector status of North American culicoides (Diptera: ceratopogonidae) for bluetongue virus, epizootic hemorrhagic disease virus, and other arboviruses of concern,” *Current Tropical Medicine Reports*, 9(4):130–139, <https://doi.org/10.1007/s40475-022-00263-8>.
- McGregor, BL, Sloyer, KE, Sayler, KA, Goodfriend, O, Krauer, JMC, Acevedo, C, Zhang, X, Mathias, D, Wisely, SM & Burkett-Cadena, ND 2019, “Field data implicating Culicoides stellifer and Culicoides venustus (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of epizootic hemorrhagic disease virus,” *Parasites & Vectors*, 12(1):, <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3514-8>.
- Mejri, S, Dhaou, SB, Jemli, M, Bréard, E, Sailleau, C, Sghaier, S, Zouari, M, Lorusso, A, Savini, G, Zientara, S & Hammami, S 2018, “Epizootic haemorrhagic disease virus circulation in Tunisia.,” *HAL (Le Centre Pour La Communication Scientifique Directe)*, 54(1):87–90, <https://hal.inrae.fr/hal-02621503>.
- Mills, MK, Michel, K, Pfannenstiel, RS, Ruder, MG, Veronesi, E & Nayduch, D 2017, “Culicoides–virus interactions: infection barriers and possible factors underlying vector competence,” *Current Opinion in Insect Science*, 227–15, <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.003>.
- Nayduch, D, Shankar, V, Mills, MK, Robl, T, Drolet, BS, Ruder, MG, Scully, ED & Saski, C 2019, “Transcriptome Response of Female Culicoides sonorensis Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) to Early Infection with Epizootic Hemorrhagic Disease Virus (EHDV-2),” *Viruses*, 11(5):473, <https://doi.org/10.3390/v11050473>.
- Nol, P, Kato, C, Reeves, WK, Rhyon, JC, Spraker, TR, Gidlewski, T, VerCauteren, KC & 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>.
- Noronha, L, Cohnstaedt, LW, Richt, JA & Wilson, WC 2021, “Perspectives on the changing landscape of epizootic hemorrhagic disease virus control,” *Viruses*, 13(11):2268, <https://doi.org/10.3390/v13112268>.
- Portanti, O, Thabet, S, Abenza, E, Ciarrocchi, E, Piscicella, M, Irelli, R, Savini, G, Hammami, S, Pulsoni, S, Casaccia, C, Coetzee, L, Marcacci, M, Di Domenico, M & Lorusso, A 2023, “Development and validation of an RT-

- qPCR for detection and quantitation of emerging epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8 RNA from field samples,” *Journal of Virological Methods*, 321114808, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114808>.
- Quaglia, M, Foxi, C, Satta, G, Puggioni, G, Bechere, R, De Ascentis, M, D’Alessio, SG, 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.,” *PubMed*, 59(1):83–89, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37731311>.
- Rajko-Nenow, P, Brown-Joseph, T, Tennakoon, C, Flannery, J, Oura, C & Batten, C 2019, “Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 in cattle in Trinidad, West Indies, containing nine RNA segments derived from exotic EHDV strains with an Australian origin,” *Infection, Genetics and Evolution (Print)*, 74103931, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103931>.
- Rajko-Nenow, P, Howson, ELA, Clark, DA, Hilton, N, Ambagala, A, Svitek, N, Flannery, J & Batten, C 2021, “Development of a novel loop Mediated isothermal amplification assay (LAMP) for the rapid detection of epizootic haemorrhagic disease virus,” *Viruses*, 13(11):2187, <https://doi.org/10.3390/v13112187>.
- Rivera, NA, Varga, C, Ruder, MG, Dorak, SJ, Roca, AL, Novakofski, J & Mateus-Pinilla, NE 2021, “Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in the United States of America at the Wildlife–Livestock Interface,” *Pathogens*, 10(8):915, <https://doi.org/10.3390/pathogens10080915>.
- Rodrigues, TCS, Viadanna, PHO, Subramaniam, K, Hawkins, IK, Jeon, AB, Loeb, JC, Krauer, JMC, Lednicky, JA, Wisely, SM & Waltzek, TB 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):1012, <https://doi.org/10.3390/v14051012>.
- Ruder, MG, Allison, AB, Stallknecht, DE, Mead, DG, McGraw, S, Carter, DL, Kubiski, SV, Batten, C, Klement, E & Howerth, EW 2012, “SUSCEPTIBILITY OF WHITE-TAILED DEER (*ODOCOILEUS VIRGINIANUS*) TO EXPERIMENTAL INFECTION WITH EPIZOOTIC HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS SEROTYPE 7,” *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3):676–685, <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.676>.
- Ruder, MG, Howerth, EW, Stallknecht, DE, Allison, AB, Carter, DL, Drolet, BS, Klement, E & Mead, DG 2012, “Vector competence of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) to epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7,” *Parasites & Vectors*, 5(1):, <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-236>.
- Ruder, MG, Johnson, DJ, Ostlund, EN, Allison, AB, Kienzle, C, Phillips, JE, Poulson, RL & Stallknecht, DE 2017, “The first 10 years (2006–15) of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 in the USA,” *Journal of Wildlife Diseases*, 53(4):901–905, <https://doi.org/10.7589/2016-12-284>.
- Ruder, MG, Mead, DG, Stallknecht, DE, Kedmi, M, Klement, E, Brown, JD, Carter, DL & Howerth, EW 2016, “Experimental infection of Holstein cows and calves with EHDV-7 and preliminary evaluation of different inoculation methods.,” *PubMed*, 51(4):289–99, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26741239>.

- Ruder, MG, Stallknecht, DE, Howerth, EW, Carter, DL, Pfannenstiel, RS, Allison, AB & Mead, DG 2015, "Effect of Temperature on Replication of Epizootic Hemorrhagic Disease Viruses in *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae)," *Journal of Medical Entomology*, 52(5):1050–1059, <https://doi.org/10.1093/jme/tjv062>.
- Russell, BL, Parbhoo, N & Gildenhuys, S 2018, "Analysis of Conserved, Computationally Predicted Epitope Regions for VP5 and VP7 Across three Orbiviruses," *Bioinformatics and Biology Insights*, 12117793221875534, <https://doi.org/10.1177/1177932218755348>.
- Sailleau, C, Bréard, 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.," *HAL (Le Centre Pour La Communication Scientifique Directe)*, 55(4):339–346, <https://hal.inrae.fr/hal-02914013>.
- Scott, McVeyD & James, MacLachlanN 2015, "Vaccines for Prevention of bluetongue and epizootic hemorrhagic Disease in Livestock: A North American perspective," *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 15(6):385–396, <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1698>.
- Sghaier, S, Hammami, S, Goffredo, M, Hammami, M, Portanti, O, Lorusso, A, Savini, G & Delécolle, JC 2017, "New species of the genus *Culicoides* (Diptera Ceratopogonidae) for Tunisia, with detection of Bluetongue viruses in vectors.," *PubMed*, 53(4):357–366, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307131>.
- Sghaier, S, Sailleau, C, Marcacci, M, Thabet, S, Curini, V, Hassine, TB, Teodori, L, Portanti, O, Hammami, S, Jurišić, L, Spedicato, M, Postic, L, Gazani, I, Osman, RB, Zientara, S, Bréard, E, Calistri, P, Richt, JA, Holmes, EC, Savini, G, Di Giallonardo, F & Lorusso, A 2022, "Epizootic Haemorrhagic Disease Virus serotype 8 in Tunisia, 2021," *Viruses*, 15(1):16, <https://doi.org/10.3390/v15010016>.
- Shai, B, Schmukler, E, Yaniv, R, Ziv, N, Horn, G, Bumbarov, V, Yadin, H, Smorodinsky, NI, Bacharach, E, Pinkas-Kramarski, R & Ehrlich, M 2013, "Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Induces and Benefits from Cell Stress, Autophagy, and Apoptosis," *Journal of Virology*, 87(24):13397–13408, <https://doi.org/10.1128/jvi.02116-13>.
- Sharma, P, De, S, Murphy & Ew, H 2016, "Expression of interleukin-1 beta and interleukin-6 in white-tailed deer infected with Epizootic Hemorrhagic Disease virus.," *PubMed*, 51(4):283–8, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26741245>.
- Sharma, P, Stallknecht, DE & Howerth, EW 2016, "Epizootic haemorrhagic disease virus induced apoptosis in bovine carotid artery endothelium is p53 independent.," *PubMed*, 52(3–4):363–368, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27723048>.
- Shope, RE, MacNamara, LG & Mangold, R 1960, "A VIRUS-INDUCED EPIZOOTIC HEMORRHAGIC DISEASE OF THE VIRGINIA WHITE-TAILED DEER (*ODOCOILEUS VIRGINIANUS*)," *Journal of Experimental Medicine*, 111(2):155–170, <https://doi.org/10.1084/jem.111.2.155>.



- Spedicato, M, Carmine, I, Teodori, L, Leone, A, Portanti, O, Marini, V, Piscella, M & Savini, G 2014, "Innocuity and immunogenicity of an EHDV-2 vaccine in pregnant cows," *EPIZONE*, <http://www.epizone-eu.net/web/file?uuid=b4e33dc3-5ec0-4c4b-b4d2-9f2e5a655b31&owner=a8a15dd4-495f-4bce-a6b7-0a4a52a1e738>.
- Spedicato, M, Profeta, F, Thabet, S, Teodori, L, Leone, A, Portanti, O, Piscella, M, Bonfini, B, Pulsoni, S, Rosso, F, Rossi, E, Ripà, P, De Rosa, A, Ciarrocchi, E, Irelli, R, Cocco, A, Sailleu, C, Ferri, N, Di Febo, T, Vitour, D, Bréard, E, Giansante, D, Sghaier, S, Hassine, TB, Zientara, S, Salini, R, Hammami, S, Savini, G & Lorusso, A 2023, "Experimental infection of cattle, sheep, and goats with the newly emerged epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8," *PubMed*, 59(4);, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38117055>.
- Stallknecht, DE, Allison, AB, Park, A, Phillips, JE, Goekjian, VH, Nettles, VF & Fischer, JR 2015, "APPARENT INCREASE OF REPORTED HEMORRHAGIC DISEASE IN THE MIDWESTERN AND NORTHEASTERN USA," *Journal of Wildlife Diseases*, 51(2):348–361, <https://doi.org/10.7589/2013-12-330>.
- Stevens, GE, McCluskey, BJ, King, AMQ, O'Hearn, ES & Mayr, GA 2015, "Review of the 2012 epizootic hemorrhagic disease outbreak in domestic ruminants in the United States," *PloS One*, 10(8):e0133359, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133359>.
- Sung, P-Y, Vaughan, R, Rahman, SK, Yi, G, Kerviel, A, Kao, CC & Roy, P 2019, "The interaction of bluetongue virus VP6 and genomic RNA is essential for genome packaging," *Journal of Virology*, 93(5);, <https://doi.org/10.1128/jvi.02023-18>.
- Sunwoo, SY, Noronha, L, Morozov, I, Trujillo, JD, Kim, IJ, Schirtzinger, EE, Faburay, B, Drolet, BS, Urbaniak, K, McVey, DS, Meekins, DA, Palmer, MV, Balaraman, V, Wilson, WC & Richt, JA 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):59, <https://doi.org/10.3390/vaccines8010059>.
- Temizel, EM, Yesilbag, K, Batten, C, Senturk, S, Maan, NS, Mertens, PP & 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, Hassine, TB, Slama, D, Osmane, RB, Omrane, RB, Mouelhi, W, Spedicato, M, Leone, A, Teodori, L, Curini, V, Othmani, MB, Berjaoui, S, Ripà, P, Orabi, M, Mohamed, B, Sayadi, A, Slama, SB, Marcacci, M, Savini, G, Lorusso, A & 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):1567, <https://doi.org/10.3390/v15071567>.
- Urata, M, Watanabe, R & Iwata, H 2015, "The effect of glycosylation on cytotoxicity of Ibaraki virus nonstructural protein NS3," *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(12):1611–1616, <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0121>.

- Versteirt, V, Balenghien, T, Tack, W & Wint, W 2017, "A first estimation of *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus*/*Culicoides scoticus* seasonality and abundance in Europe," *EFSA Supporting Publications*, 14(2):, <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.en-1182>.
- Viarouge, C, Bréard, 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):e0132540, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132540>.
- Vitour, D, Doceul, V, Ruscanu, S, Chauveau, E, Schwartz-Cornil, I & Zientara, S 2014, "Induction and control of the type I interferon pathway by Bluetongue virus," *Virus Research*, 18259–70, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.10.027>.
- Xin, J, Dong, J, Li, J, Ye, L, Zhang, C, Nie, F, Gu, Y, Ji, X, Song, Z, Luo, Q, Ai, J & Han, D 2023, "Current knowledge on epizootic haemorrhagic disease in China," *Vaccines*, 11(6):1123, <https://doi.org/10.3390/vaccines11061123>.
- Yang, H, Li, Z, Wang, J, ZhanHong, L, Yang, ZJ, Liao, D, Zhu, J & Li, H 2020, "Novel Serotype of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus, China," *Emerging Infectious Diseases*, 26(12):3081–3083, <https://doi.org/10.3201/eid2612.191301>.
- Zientara, S, Bréard, E, Vitour, D & Sailleau, C 2023, "Emergence of epizootic hemorrhagic disease in Europe," *Virologie*, 27(1):16–17, <https://doi.org/10.1684/vir.2023.987>.