

Determinazione rapida del virus Bluetongue in sangue e organi mediante capture enzyme linked immunosorbent assay

O. Portanti, M. Luciani & G. F. Ronchi

Riassunto

E' stato sviluppato un test ELISA-capture (capture-ELISA-BTV) per la rivelazione del virus Bluetongue (BTV). Il capture-ELISA-BTV è stato impiegato per identificare, nel surnatante di colture cellulari, alcuni dei sierotipi di BTV (sierotipi 1, 2, 4, 9 e 16) che attualmente causano epidemie nei paesi del bacino del Mediterraneo. La quantità minima di virus infettante necessaria per ottenere un risultato positivo, dopo amplificazione su colture cellulari, con capture-ELISA-BTV è stata di 100 TCID₅₀. Il capture-ELISA-BTV è stato confrontato con i metodi convenzionali di isolamento e identificazione virale, che prevedono l'amplificazione del virus su uova embrionate di pollo (embryonated chicken eggs, ECEs), successivi passaggi in tessuto colture e rivelazione del virus mediante immunofluorescenza. La sensibilità e la specificità del capture-ELISA-BTV, applicato a surnatanti di colture cellulari infettate con omogenati di organi e sangue di ovino e bovino positivi per BTV, senza il previo passaggio in ECEs, sono risultate del 100%. Il dosaggio è stato applicato anche a omogenati di tessuti embrionali di pollo infettati con diversi sierotipi di BTV. L'amplificazione in ECEs ha consentito di rivelare il virus con il capture-ELISA-BTV ottenendo, anche con questa alternativa di amplificazione, una sensibilità e specificità del 100%. Inoltre tra i differenti tessuti embrionali saggiati, il fegato è risultato essere l'organo embrionale più

idoneo per essere utilizzato in capture-ELISA-BTV. Nel sangue di ovini infettati sperimentalmente il capture-ELISA-BTV è risultato essere in grado di rivelare la presenza di virus nel sangue circolante. L'elevata sensibilità e la specificità del metodo nei confronti dei sierotipi di BTV indagati rende utile il suo impiego nella diagnosi della Bluetongue.

Parole chiave

Antigene capture - Bluetongue – Bluetongue virus – Colture cellulari – Embrioni di pollo - Enzyme-linked immunosorbent assay – Test diagnostici - Virus.

Introduzione

Il virus bluetongue (BTV) appartiene alla famiglia *Reoviridae*, genere *Orbivirus*, del quale si conoscono 24 sierotipi. Il BTV è l'agente eziologico della febbre catarrale dei ruminanti, malattia infettiva, non contagiosa, trasmessa da insetti vettori del genere *Culicoides*, a pecore e ad altri ruminanti domestici e selvatici (8, 12). Attualmente i sierotipi BTV presenti nei Paesi del Mediterraneo sono 1, 2, 4, 6, 9, 10, 13 e 16 (6, 22). La Bluetongue provoca serie conseguenze sanitarie ed economiche alla zootecnia dei territori interessati. Si rende pertanto necessario poter disporre di metodi diagnostici sensibili, specifici e rapidi, per poter effettuare i controlli sanitari necessari per prevenire la diffusione incontrollata della malattia.

I test diagnostici attualmente disponibili sono: l'isolamento in colture cellulari di mammifero o

di insetto, l'inoculazione di animali da laboratorio o più comunemente l'inoculazione di uova embrionate seguita da passaggi in colture cellulari di insetto e mammifero. Tecniche alternative più rapide come dot-blot, microscopia immunoelettronica, immunoenzimatiche e PCR possono essere utilizzate per la rivelazione del BTV in colture cellulari, insetti vettori, organi e tessuti, ma se applicate a campioni di sangue prelevati al di fuori della fase viremica dell'infezione risultano essere poco sensibili (14, 19, 20, 23).

Le tecniche immunoenzimatiche presentano il vantaggio di essere rapide, di facile esecuzione ed economiche e la loro sensibilità può essere aumentata mediante un'amplificazione del virus, presente nei campioni di sangue o organi, in uova embrionate o in colture cellulari (9, 10, 24).

Il presente studio ha come scopo lo sviluppo e la validazione di una metodica ELISA-capture (15, 16), per la rivelazione del virus in colture cellulari e in tessuti di ECEs dopo inoculazione con sangue ed organi di ovini e bovini infetti.

Materiali e metodi

Anticorpi monoclonali

Anticorpi monoclonali (MAbs) anti-BTV sono stati prodotti immunizzando topi Balb/c con BTV sierotipo 2 ceppo di riferimento fornito dal Onderstepoort Veterinary Institute (OVI) South-Africa. Una quantità di 100 µg di proteine virali in adiuvante di Freund completo (FCA) sono stati inoculati per via intraperitoneale. Dopo 14 giorni è stata effettuata una seconda inoculazione con 100 µg di proteine virali in adiuvante di Freund incompleto (FIA). Successivamente sono state effettuate due inoculazioni: con 50 µg di proteine virali in FIA. Al 55° giorno di immunizzazione è stato effettuato un booster con 100 µg di proteine virali. Gli splenociti sono stati sottoposti a fusione cellulare con cellule di mieloma di topo Sp2/O-

Ag-14. Gli ibridomi sono stati coltivati in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium contenente 20% di siero fetale bovino glutammina 2 mM, anfotericina-penicillina-streptomicina 100x, gentamicina 50 mg/ml nistatina 10000 UI/ml e HAT 50x. Gli ibridomi secernenti anticorpi anti-BTV sono stati clonati secondo la metodica delle diluizioni limite (2, 7, 13).

Caratterizzazione

Lo screening degli ibridomi secernenti MAb anti-BTV è stato effettuato in ELISA-indiretta (17). E' stata inoltre verificata, con il medesimo metodo, la reazione crociata con i virus della peste equina (African Horse Sickness, AHS) e della malattia emorragica epizootica del cervo (Epizootic Hemorrhagic Disease Virus of deer, EHDV) (1, 12, 26).

L'isotipo dei MAbs è stato determinato utilizzando ImmunoPure® Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (Pierce, Rockford).

I MAbs sono stati saggiati in Immuno-Western blotting (11, 25). La separazione elettroforetica delle proteine virali, del BTV 2 di riferimento, è stata realizzata a corrente costante 20 mA/gel su un apparato Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell e gel di poliacrilammide al 12% Tris-HCl (Bio-Rad laboratories, California). Il trasferimento su membrana di nitrocellulosa 0,45 µm, a corrente costante 35 mA per 55 min., è stato effettuato con il Mini Trans-blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad laboratories California). La membrana di nitrocellulosa è stata saturata, per 1 ora a 37°C, con Tris-buffered saline contenente 0,05% di Tween 20 (TBS-T) e 3% di latte scremato. I MAbs, purificati e coniugati con perossidasi (18), sono stati diluiti in TBS-T e incubati per una notte a 4°C. Dopo i lavaggi con TBS-T, le strip di nitrocellulosa sono state trattate con Opti-4 Chloro-1-Naphthol substrate kit (Bio-Rad laboratories, California) fino alla rivelazione degli immunocomplessi.

Anticorpi policlonali capture

Un siero iperimmune anti-BTV è stato prodotto immunizzando conigli razza New Zealand con BTV sierotipo 2 ceppo di riferimento. 200 µg di proteine virali in FCA sono state inoculate per via intradermica per 6 volte in un arco di tempo di 50 giorni. La frazione immunoglobulinica G (IgG) del siero è stata purificata in cromatografia di affinità con Proteina A utilizzando un sistema cromatografico (Äkta-purifier, Amersham Biosciences) e una colonna preimpaccata con Proteina A ricombinante (HiTrap rProtein A FF, 5 ml, Amersham Biosciences), tampone di attacco Na-fosfato 0.1M, pH 7.0, tampone di eluizione Glicina-HCl 0.1M, pH 3.0 e tampone di neutralizzazione Tris-HCl 1M, pH 9.0. Le IgG sono state utilizzate come anticorpo capture (anti-BTV) nel capture-ELISA-BTV. Lo stesso metodo di purificazione è stato applicato per i MAbs con isotipo IgG.

Bluetongue virus

La standardizzazione del capture-ELISA-BTV è stata eseguita utilizzando i seguenti sierotipi virali: BTV 1 ceppo di riferimento, BTV 2 ceppo di riferimento, BTV 2 ceppo attenuato, BTV 4 ceppo di riferimento, BTV 9 ceppo di riferimento, BTV 9 ceppo attenuato e BTV 16 ceppo di riferimento (gentilmente forniti da OVI), BTV 2 e BTV 9 ceppi di campo isolati da animali naturalmente infetti italiani. Nella validazione del metodo sono stati utilizzati i seguenti campioni di organi e sangue prelevati da animali infettati sperimentalmente con i sierotipi BTV2 e BTV9: 3 cervelli ovis, 7 milze ovine, 1 cervello bovino, 5 milze bovine e 14 campioni di sangue ovino prelevato durante la fase viremica. Sono stati inoltre utilizzati organi e sangue di animali non infetti: 4 milze ovine, 1 milza bovina e 6 campioni di sangue ovino.

Tipizzazione dei virus

Il sierogruppo e il sierotipo, nei campioni di organi di ovis e bovini infettati sperimentalmente, sono

stati determinati rispettivamente in immunofluorescenza e in sieroneutralizzazione virale (SN) (5, 21).

Preparazione dei campioni da organi e da sangue

I campioni di cervello e milza sono stati omogenati con polvere di quarzo sterile e PBS contenente nystatin 5000 UI/ml, streptomycina 10 mg/ml, gentamicina 250 µg/ml e penicillina 10000 UI/ml (PBS-AB). L'omogenato è stato sonicato 3x15 sec. con intervallo di 15 sec. in bagno di ghiaccio e infine centrifugati a 1250g per 20 min. a 4°C. Il surnatante è stato conservato a 4°C. Allo stesso modo sono stati preparati gli organi di embrioni di pollo. I campioni di sangue prelevati in etilendiamminotetra-acetico (EDTA), sono stati centrifugati a 230g per 20 min. a 4°C. Il pellet è stato risospeso in PBS antibiotato e sottoposto ad ulteriore centrifugazione, infine è stato risospeso in peptone lattosio e di nuovo sonicato.

Isolamento del virus in colture cellulari

Colture di cellule Vero sono state infettate con i sierotipi BTV (10^2 - 10^3 - 10^4 TCID₅₀) e con i campioni preparati da organi e sangue. Al manifestarsi dell'effetto citopatico (ECP) del 90-100% del monostrato e comunque non oltre 6 giorni di incubazione, il surnatante è stato raccolto e centrifugato a 1000g per 10 min. a 4°C. I surnatanti sono stati titolati dopo centrifugazione e analizzati in capture-ELISA-BTV. Il titolo virale è stato espresso come TCID₅₀/50µl. Il surnatante delle colture cellulari che non presentavano ECP è stato ugualmente raccolto e analizzato. I controlli negativi sono stati preparati da colture cellulari non infette.

Isolamento del virus in uova embrionale di pollo

Uova embrionate di pollo, al 10°-13° giorno di incubazione, sono state inoculate, in vena (3, 4), con 100 TCID₅₀ di BTV 2 ceppo di riferimento, BTV 2 ceppo di campo italiano, BTV 4 ceppo di

riferimento, BTV 9 ceppo di riferimento e BTV 16 ceppo di riferimento. Dopo 7 giorni dagli embrioni sono stati prelevati cervello, cuore e fegato. Tessuti di embrioni non infetti sono stati utilizzati come controllo negativo. Il surnatante è stato analizzato in capture-ELISA-BTV.

ELISA-capture virus Bluetongue (capture-ELISA-BTV)

Le micropiastre per ELISA a 96 pozzetti sono state attivate con anti-BTV 100 µl/pozzetto, alla concentrazione di 20 µg/ml in tampone carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9.6), incubate per una notte a temperatura ambiente (TA) (17-25 °C) e lavate con PBS contenente 0.05% di Tween 20. Cinquanta microlitri di ciascun campione sono stati aggiunti ai pozzetti e la micropiastro è stata incubata per 1 h, in agitazione, a 37 °C.

Dopo il lavaggio sono stati dispensati, in tutti i pozzetti della micropiastro, 50 µl di anticorpo monoclonale (6C5F4D7) coniugato con perossidasi (anti-VP7-BTV). La micropiastro è stata incubata per 30 min. a 37 °C; dopo un ulteriore lavaggio, sono stati dispensati 100 µl/pozzetto di substrato cromogeno (3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidine liquid substrate system for ELISA) e la piastra incubata a TA per 30 min..

La reazione colorimetrica è stata quindi interrotta con 50 µl di acido solforico 0.5 N e la densità ottica (OD) misurata a 450 nm con un lettore per micropiastre.

Il campione di controllo positivo (surnatante di tessuto colture infette o omogenato di fegato, cuore o cervello di ECE infetto) e il campione di controllo negativo (surnatante di tessuto colture non infette o omogenato di fegato, cuore o cervello di ECE non infetto) sono stati inclusi nel test e i campioni esaminati sono stati classificati come positivi se la densità ottica era uguale o maggiore a due volte la OD del controllo negativo (P:N ≥ 2).

Risultati

Anticorpi monoclonali

Si sono ottenuti 44 anticorpi monoclonali specifici per il BTV. Tra essi è stato selezionato il MAb 6C5F4D7. L'isotipo del MAb è risultato essere IgG_{2a} catena leggera K. L'anticorpo monoclonale selezionato, in immuno-Western blotting ha rivelato una banda proteica di circa 38 Kd riconducibile alla VP7 del BTV (Figura 1) ed è stato pertanto denominato anti-VP7-BTV. In ELISA non ha evidenziato alcuna reazione crociata nei confronti del virus dell'AHS e del EHDV.

Sensibilità e specificità del capture-ELISA-BTV

I surnatanti di colture cellulari, contenenti i diversi sierotipi BTV utilizzati per la standardizzazione del metodo, sono stati titolati su cellule Vero e, contemporaneamente, sono stati esaminati in capture-ELISA-BTV. Il metodo capture-ELISA-BTV ha messo in evidenza la presenza del virus a partire da un titolo di 100 TCID₅₀ per tutti i sierotipi usati. Tutti i sierotipi BTV sono stati

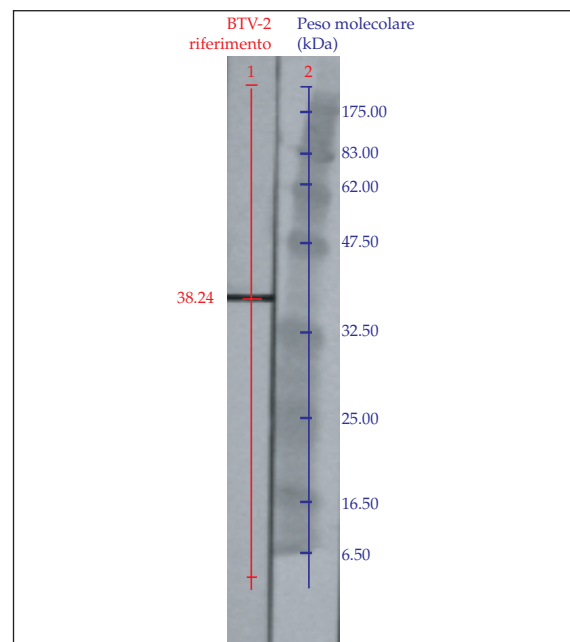


Figura 1
Immuno-Western blotting: anti-VP7-BTV vs. BTV-2 di riferimento.

Tabella I

Surnatanti di colture cellulari infettate con bluetongue virus analizzati con capture-ELISA-BTV

Diluizione del surnatante colturale	Rapporto P:N ¹ dei surnatanti colturali di cellule Vero infettata con BTV									
	Sierotipi BTV									
	BTV-1 riferimento	BTV-2 riferimento	BTV-2 italiano	BTV-2 attenuato	BTV-4 riferimento	BTV-9 riferimento	BTV-9 italiano	BTV-9 attenuato	BTV-16 riferimento	
Non diluito	5.8	5.9	5.6	5.9	5.9	5.5	5.8	5.6	5.9	
1:2	5.2	5.3	5.0	5.7	5.2	5.0	5.2	4.9	5.9	
1:4	4.5	4.8	4.3	5.3	4.6	4.9	5.0	4.4	5.9	
1:8	3.6	4.0	3.1	4.7	4.0	4.6	4.6	3.9	5.8	
1:16	2.4	2.8	2.1	3.6	3.3	4.1	4.1	3.1	5.3	
1:32	<2	<2	<2	2.6	2.5	3.3	3.3	2.2	4.8	
1:64	<2	<2	<2	<2	<2	2.4	2.4	<2	4.1	
1:128	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	3.4	
Titolo virale ²	3.4	3.1	3.6	3.9	3.7	4.7	4.3	4.4	5.2	

¹ Rapporto P:N: campione positivo ≥ 2 ; campione negativo <2 ² Log₁₀ TCID₅₀/50 μ l

rivelati nel surnatante non diluito delle colture cellulari infettate. I surnatanti diluiti dei vari sierotipi BTV sono risultati positivi mostrando un rapporto P:N ≥ 2 in capture-ELISA-BTV (Tabella I). I campioni infetti di organi e sangue sono risultati positivi in capture-ELISA-BTV. Quattro campioni di organi e due campioni di sangue infetti non hanno causato ECP nelle colture cellulari, tuttavia

i relativi surnatanti sono risultati positivi in capture-ELISA-BTV (Tabella II).

Confronto dei risultati del capture-ELISA-BTV in differenti tessuti di embrioni di pollo

Nei surnatanti di omogenati di cervello, cuore e fegato, di embrioni di pollo infettati con i vari sierotipi di BTV, è stato osservato, in capture-ELISA-BTV, un rapporto P:N > 2 . Negli omogenati

Tabella II

Confronto della sensibilità e specificità del capture-ELISA-BTV con l'isolamento del virus Bluetongue in colture cellulari.

Campione	capture-ELISA-BTV		Cultura cellulare		ECP ¹	SN ²
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		
Milza ovino	2		2		4+	BTV-9
Milza ovino	3		3		3+	BTV-2
Milza ovino	1			1	-	BTV-9
Milza ovino	1			1	-	BTV-2
Cervello ovino	2		2		4+	BTV-9
Cervello ovino	1			1	-	BTV-9
Milza bovino	3		3		3+	BTV-9
Milza bovino	1		1		4+	BTV-2
Milza bovino	1		1		3+	BTV-9
Cervello bovino	1			1	-	BTV-2
Milza ovino		4		4	-	-
Milza bovino		1		1	-	-
Sangue ovino	12		1		2+	BTV-2, BTV-9
Sangue ovino	2			2	-	BTV-2, BTV-9
Sangue ovino		6		6	-	-

¹ Effetto citopatico² Sieroneutralizzazione virale

di fegato è stata riscontrata la tendenza nel produrre rapporti P:N maggiori degli omogenati di cervello e cuore (Tabella III).

Discussione

Il capture-ELISA-BTV può essere utilizzato come alternativa ai metodi convenzionali di isolamento e identificazione virale, che prevedono l'amplificazione del virus in ECEs, successivi passaggi in tessuto colture e rivelazione del virus mediante immunofluorescenza. Il capture-ELISA-BTV costituisce un valido sistema rivelatore del BTV nello screening di sangue ed organi infetti di ovini e di bovini, effettuando un solo passaggio di amplificazione dei campione in esame in colture cellulari. La sensibilità e la specificità del capture-ELISA-BTV è stata del 100% utilizzando come sistema di amplificazione le colture cellulari. Non sono stati riscontrati falsi positivi o falsi negativi nei casi esaminati nel presente lavoro. Le colture cellulari infettate con BTV che non presentavano ECP, dopo 6 giorni di incubazione, sono risultate positive.

In questo studio, il grado di amplificazione in colture cellulari del BTV è stato sufficiente per poterlo rivelare in capture-ELISA-BTV nel 100% dei casi. Poichè il MAb utilizzato nel dosaggio è specifico per i sierotipi virali della bluetongue, il capture-ELISA-BTV non rivela orbivirus collegati, quali i virus della peste equina e della malattia emorragica epizootica del cervo.

La procedura è facile da eseguire, meno costosa e più rapida se confrontata con i metodi in uso nei laboratori di virologia. L'impiego del capture-ELISA-BTV richiede soltanto 7 giorni (amplificazione del BTV in colture cellulari 6 giorni, capture-ELISA-BTV 1 giorno).

Il metodo è adatto nella diagnosi della bluetongue al fine di monitorare la diffusione dell'infezione, dando un considerevole supporto ai piani di

sorveglianza e di eradicazione.

L'amplificazione del virus in uova embrionate di pollo è risultata essere un'alternativa alle colture cellulari per l'identificazione virale mediante capture-ELISA-BTV. Gli omogenati di fegato di embrioni di pollo hanno dato rapporti P:N più elevati rispetto a cuore e cervello embrionali. Questo risultato, unito alla maggiore facilità di omogenizzazione, ha determinato la scelta del fegato di embrione di pollo come organo di elezione

Tabella III
Confronto del capture-ELISA-BTV con l'isolamento in uova embrionale di pollo.

Tessuto ECE ¹	BTV ²	capture-ELISA-BTV ³	Infettività ⁴
Cervello	BTV-2 italiano	3.2	2.8
Cuore	BTV-2 italiano	4.2	3.7
Fegato	BTV-2 italiano	7.1	5.2
Cervello	BTV-2 riferimento	2.3	2.3
Cuore	BTV-2 riferimento	4.1	3.4
Fegato	BTV-2 riferimento	4.4	3.9
Cervello	BTV-4 riferimento	3.8	3.0
Cuore	BTV-4 riferimento	4.0	3.2
Fegato	BTV-4 riferimento	4.6	4.0
Cervello	BTV-9 riferimento	3.0	3.1
Cuore	BTV-9 riferimento	5.0	4.7
Fegato	BTV-9 riferimento	6.1	5.8
Cervello	BTV-16 riferimento	3.1	2.4
Cuore	BTV-16 riferimento	3.8	3.3
Fegato	BTV-16 riferimento	4.9	5.0

¹ Uovo embrionato di pollo

² Sierotipo BTV infettivo in uova embrionate di pollo

³ Rapporto P:N: campione positivo ≥ 2 ; campione negativo < 2

⁴ Log_{10} TCID₅₀/50 μl .

da usare nell'ELISA-capture.

L'applicazione del capture-ELISA-BTV agli altri sierotipi BTV, non esaminati in questo studio, potrebbe richiedere una amplificazione in uova embrionate, piuttosto che in cellule, soprattutto per quei ceppi selvatici di BTV che non si adattano a colture cellulari. Si ritiene che tale attività sarà svolta in un ulteriore prosieguo della sperimentazione. Altre procedure di rivelazione di antigeni o acidi nucleici come immunoblotting, PCR o sonde di acidi nucleici richiedono costi elevati per l'esecuzione e sono, a differenza del capture-ELISA-BTV, meno adatte per lo screening di un elevato numero di campioni.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano R. Lelli, G. Savini, G. Filipponi, M. Multari, T. Di Febo, G. Armillotta e D. Antonucci per il loro sostegno e la loro assistenza tecnica fornita durante la realizzazione del presente lavoro.

Bibliografia

1. Appleton J. A. & Letchworth G.T., 1983. Monoclonal antibody analysis of serotype-restricted and unrestricted bluetongue viral antigen determinants. *Virology*, **124**, 286-299.
2. Campbell A.M., 1987. Monoclonal antibody technology. In *Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology 13*, Edited by Burdon RH and van Knippenberg P. H. Published by Elsevier Science BV Po Box 211 1000 AE Amsterdam The Netherlands.
3. Foster N. M. & Luedke A. J. 1968. The direct assay for bluetongue virus by intravascular inoculation of embryonating chicken eggs. *Am J Vet Res*, **29**, 749-753.
4. Foster N.M., Luedke A.J. & Metcalfe H.E. 1972. Bluetongue in sheep and cattle: efficacy of embryonating chicken eggs in viral isolation. *Am J Vet Res*, **33**: 77-81.
5. Gard G.P. & Kirkland P.D. 1993. Bluetongue virology and serology. In: Corner, L.A., Bagust, T., J., (eds). *Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases*. CSIRO for the standing Committee on Agriculture and Resource Management, East Melbourne, Australia.
6. Gibbs E. P. J. & Greneir E.C. 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, **17**, 207-220.
7. Goding J.W. 1993. *Monoclonal antibodies: principles and practice*. Production and application of monoclonal antibodies in cell. Biology, biochemistry and immunology. Third Edition. Academic Press Limited London.
8. Gorman B.M. 1990. The bluetongue virus. *Curr Top Microbiol Imm*, **162**, 1-19.
9. Hawkes R.A., Kirkland P.D., Sanders D.A., Zhang F., Li Z., Davis R.J. & Zhang N. 2000. Laboratory and field studies of antigen capture ELISA for bluetongue virus. *J Virol Methods*, **85**, 137-149.
10. Hossein M., Hawkes R.A., Kirkland P.D. & Dixon R. 1998. Rapid screening of embryonated chicken eggs for bluetongue virus infection with an antigen capture ELISA. *J Virol Methods*, **75**, 39-46.
11. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T. *Nature (London)*, **227**, 680-685.
12. Lelli R., Portanti O., Langella V., Luciani M., Di Emidio B. & Conte A.M. 2003. Produzione di un kit ELISA competitiva per la diagnosi sierologia della bluetongue. *Vet Ital*, **47**, 5-13.
13. Malavasi F. & A. Bargellesi-Sevesi 1992. Anticorpi monoclonali tecniche di base Ph. D. 02. In: *I manuali delle scuole, Scuola superiore di oncologia e scienze biomediche*. Dipartimento di Genetica, Biologia e Chimica Medica Università degli Studi di Torino, Istituto di Chimica Biologica Università degli Studi di Genova.
14. McColl K.A. & Gould A.R. 1991. Detection and

- characterisation of bluetongue virus using the polymerase chain reaction. *Virus Res*, **21**, 19-34.
15. Mechan J.O. 1993. Detection of bluetongue virus from blood of infected sheep by use of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay after amplification of the virus in cell culture. *Am J Vet Res*, **54**, 370-372.
 16. Mechan J.O., Dean V.C., Wigington J.G. & Nunamaker R.A. 1990. Detection of bluetongue virus in *Culicoides varipennis* by antigen capture ELISA assay. *J Med Entomol*, **27**, 602-606.
 17. Morgan-Capner P.H., Pullen, J.R., Pattison, D.E., Bidwell, A., Bartlett B. & Voller A. 1979. A comparison of three tests for rubella antibody screening. *J Clin Pathol*, **32** (6), 542-545.
 18. Nakane P.K. & Kawaoi A. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, Dec, **22** (12), 1084-91.
 19. Nunamaker R.A., Mecham J.O., Holbrook F.R. & Lockwood J.A. 1997b. Applications of dot-blot, ELISA, and immunoelectron microscopy to field detection of bluetongue virus in *Culicoides varipennis sonorensis*: an ecological perspective. *J Med Entomol*, **3**, 24-28.
 20. Nunamaker R.A., Mecham J.O., Wigington J.G. & Ellis J.A. 1997a. Bluetongue virus in laboratory-reared *Culicoides varipennis sonorensis*: applications of dot-blot, ELISA, and immunoelectron microscopy. *J Med Entomol*, **34**, 18-23.
 21. OIE, 2004, Manual of standards for Diagnostic tests and Vaccines. 5 ed, chapter 2.1.9 Bluetongue: 195-210
 22. Pini A. 1976. A study on the pathogenesis of Bluetongue: replication of the virus in the organs of infected sheep *Onderstepoort J Vet Res*, **43**, 159-164.
 23. Shad G., Wilson W.C., Mecham J.O. & Evermann J.F. 1997. Bluetongue virus detection: a safer reverse transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep. *J Vet Diagn Invest*, **9**, 118-124.
 24. Stanislawek W. L., Lunt R.A., Blacksell S.D., Newberry K.M., Hooper P.T. & White J.R. 1996. Detection by ELISA of bluetongue antigen directly in the blood of experimentally infected sheep. *Vet Microbiol*, **52**, 1-12.
 25. Towbin H., Staehelin T. & Gordon S. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350-4354.
 26. Zhou E.M. & Afshar A. 1999. Characterisation of monoclonal antibody to Epizootic Hemorrhagic Disease Virus of deer (EHDV) and bluetongue virus by immunisation of mice with EHDV recombinant VP7 antigen. *Res Vet Sci*, **66**, 247-252.