

# Effetti del siero immune su colture cellulari di macrofagi infettati con *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony: analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione

Anna Rita D'Angelo, Flavio Sacchini, Tiziana Di Febo, Vincenzo Langella, Andrea Di Provvido, Gabriella Di Francesco, Rossella Lelli & Attilio Pini

## Riassunto

I macrofagi sono cellule del sistema immunitario che svolgono un ruolo fondamentale nel meccanismo di difesa dell'ospite contro gli agenti patogeni. Attualmente è ancora poco chiara la dinamica del loro intervento e della risposta umorale nel favorire l'attività fagocitaria nei confronti di *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony (*Mmm-SC*), agente eziologico della pleuropolmonite contagiosa bovina (PPCB). Questo studio è stato condotto al fine di valutare le modificazioni morfologiche della superficie macrofagica in seguito all'infezione *in vitro* con *Mmm-SC* in presenza di siero immune bovino. L'analisi morfologica dei macrofagi è stata condotta su colture, 6 ore dopo l'infezione, utilizzando l'analisi tridimensionale della microscopia elettronica a scansione. I macrofagi non infettati, in presenza di siero negativo o immune, e i macrofagi infettati con *Mmm-SC*, in assenza di siero, hanno mostrato solo lievi modificazioni della loro superficie. Al contrario, in colture di macrofagi infettati e in presenza di siero immune sono state osservate marcate modificazioni della superficie cellulare, come ampi veli e filopodi (indicatori di attivazione cellulare), e piccoli aggregati di micoplasmi in stretto contatto con le membrane macrofagiche. I risultati suggeriscono che la risposta umorale specifica per *Mmm-SC* può contribuire a innescare l'attività fagocitaria dei macrofagi.

## Parole chiave

IgG, IgM, Immunoblotting, Macrofagi, Microscopia elettronica a scansione, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony, Pleuropolmonite contagiosa bovina, PPCB.

## Introduzione

L'agente eziologico della pleuropolmonite contagiosa bovina (PPCB) è *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony (*Mmm-SC*). Il micoplasma si localizza nel polmone dei bovini, all'interno dei microascessi focali necrotici, nella flogosi piogranulomatosa del tessuto fibrotico, e nell'infiltrato macrofagico peribronchiolare e perivascolare (5, 6, 8).

Generalmente, al manifestarsi dell'infezione da micoplasma, i macrofagi, principale componente cellulare coinvolta nella difesa delle vie respiratorie, tendono ad accumularsi nei siti di localizzazione del micoplasma (5). L'esito dell'interazione micoplasma-macrofago può condizionare l'evoluzione della malattia (10). I macrofagi, derivati dai monociti del sangue, svolgono funzioni effettrici, come la fagocitosi mediata da recettori, e sono anche importanti cellule accessorie del sistema immunitario coinvolte nella presentazione dell'antigene e nella produzione di citochine (1).

Attualmente, gli studi sulla patogenesi dell'infezione da *Mmm-SC* ancora non hanno permesso di chiarire il ruolo dei macrofagi e la relativa attività fagocitaria contro il micoplasma. Inoltre, sono stati solo parzialmente studiati la funzione della risposta umorale e il ruolo degli anticorpi, come opsonine, in grado di promuovere l'attività dei macrofagi. L'importanza delle IgG nel promuovere la fagocitosi e l'eliminazione del micoplasma da parte dei macrofagi alveolari e dei granulociti neutrofili bovini è stata dimostrata in studi su *Mycoplasma bovis* (9). In alcune ricerche su *Mmm-SC* non è stata osservata alcuna correlazione tra livelli sierici di IgM e IgG e la progressione della malattia (2, 11). Questo studio *in vitro* è stato progettato allo scopo di osservare l'interazione tra *Mmm-SC* e macrofagi, in presenza o assenza di siero immune specifico, e di avvalorare l'ipotesi che gli anticorpi nei confronti di *Mmm-SC* possano funzionare come opsonine in grado di indurre l'attivazione macrofagica, evidenziata dai cambiamenti morfologici.

La ricerca si è basata sulla capacità di *Mmm-SC* e dei macrofagi di aderire alle superfici in vetro e sull'utilizzo della microscopia elettronica a scansione che permette una migliore comprensione dei cambiamenti morfologici che si verificano sulla membrana cellulare dei macrofagi. Il microscopio elettronico a scansione (SEM) è dotato di una gamma relativamente elevata di ingrandimenti che permette di evidenziare meglio l'area di interesse precedentemente osservata a risoluzioni più basse (13).

## Materiali e metodi

### Ceppi di *Mycoplasma* e condizioni di crescita

Un ceppo di campo di *Mmm-SC*, isolato nella regione del Caprivi (Namibia) nel 2003, è stato coltivato in terreno contagious caprine pleuropneumonia CCPP (15), incubato per 48 h, a 37°C, in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> ed è stato utilizzato a titolo di 10<sup>8</sup> ufc/ml. La coltura è stata centrifugata a 4.000 g per 15 min e il pellet lavato e risospeso in RPMI-1640 (Sigma, Monaco, Germania) con siero fetale bovino

(Sigma) al 10% (R-10). La sopravvivenza di *Mmm-SC* in R-10 è stata testata con successo a intervalli di titolazione in agar CCPP (15), come riportato in letteratura (3).

### Sieri

Il test di fissazione del complemento è stato eseguito in accordo con il *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* del World Organisation for Animal Health (*Office International des Épizooties* – OIE) (14). Il siero immune anti *Mmm-SC* ha presentato un titolo di 1:1280 (12). Il siero negativo, con titolo inferiore 1:10, è stato ottenuto da un bovino sano proveniente da un allevamento indenne da PPCB. Allo scopo di valutare i possibili effetti opsonizzanti delle immunoglobuline, tutti i sieri sono stati inattivati a 56°C per 30 minuti prima del loro impiego.

Al fine di identificare gli antigeni immunogenici dominanti del *Mmm-SC* e riconosciuti dagli isotipi anticorpali IgM e IgG, è stato eseguito il test di immunoblotting in accordo con la procedura riportata nel manuale dell'OIE (14). Per ridurre la colorazione di fondo, il siero di controllo negativo è stato diluito 1:3, per le analisi delle IgG e IgM il siero immune è stato diluito rispettivamente 1:80 e 1:10. Come anticorpi secondari sono state utilizzate anti IgG bovine coniugate con perossidasi di rafano (HRP) (SIGMA), diluite 1:4000, e anti IgM bovine coniugate con perossidasi di rafano (HRP) (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA), diluite 1:200.

### Separazione dei monociti

Monociti bovini sono stati isolati da sangue venoso, contenente EDTA, prelevato da vitello "naïve" appartenente ad un allevamento indenne da PPCB. Gli eritrociti sono stati lisati aggiungendo, a 4 ml di sangue, 16 ml di tampone di lisi e incubando la sospensione cellulare, a temperatura ambiente, per 30 min (7). Le cellule sono state centrifugate a 400 g per 15 min a 18°C e lavate due volte con tampone fosfato salino (PBS). Il pellet è stato risospeso in terreno R-10, il conteggio e la vitalità cellulare sono stati valutati mediante colorazione con trypan blue. L'acquisizione e l'analisi citofluorimetrica sono state condotte

con citofluorimetro a flusso Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Brea, California, USA) e Software EXPO™ 32. La sospensione cellulare è stata analizzata con side-angle scatter. È stata calcolata la percentuale dei monociti presenti e la concentrazione finale portata a  $3 \times 10^6$  monociti/ml. Un quantitativo pari a 1 ml di sospensione cellulare è stato messo in coltura in chamber slide (Nalge Nunc International, Roskilde, Danimarca) con 0,5 ml di terreno R-10 e incubato a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 2 h per favorire l'adesione dei monociti alla superficie del vetro. In seguito sono stati eliminati i surnatanti, le colture sono state lavate due volte con terreno fresco e incubate overnight a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Le colture di monociti, con l'acquisizione delle caratteristiche morfologiche dei macrofagi, come osservato al microscopio ottico, sono state lavate con PBS. Successivamente, 0,5 ml di coltura di micoplasma (Tabella I: test 1) e due quantitativi ciascuno di 0,5 ml della stessa coltura, con l'aggiunta rispettiva di un ugual volume di siero immune e negativo (Tabella I: test 2 e 3), sono stati distribuiti all'interno di ciascuna delle chamber slide contenenti monostrati di macrofagi e incubati per 6 h a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>.

Tabella I  
Test effettuati per l'analisi al SEM

Tests	Cellule	<i>Mycoplasma</i>	Siero
Controllo 1	Macrofagi		
Controllo 2		<i>Mmm-SC</i>	
Controllo 3	Macrofagi		Negativo
Controllo 4	Macrofagi		Positivo
Test 1	Macrofagi	<i>Mmm-SC</i>	
Test 2	Macrofagi	<i>Mmm-SC</i>	Negativo
Test 3	Macrofagi	<i>Mmm-SC</i>	Positivo

Mmm-SC *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony

Infine, le chamber slide sono state lavate due volte in PBS allo scopo di rimuovere le cellule e i micoplasmi non aderenti al vetro. Come controlli sono stati utilizzati un monostrato di macrofagi, uno striscio di coltura di micoplasmi e un monostrato di macrofagi in presenza di siero immune e uno in presenza di siero negativo (Tabella I: Controlli 1-4).

## Microscopia elettronica a scansione

Le colture nelle chamber slide e lo striscio di *Mmm-SC* sono state fissate con soluzione di Karnovsky modificato (Electron Microscopy Science, Hatfield, Pennsylvania, USA) in tampone cacodilato 0,1M, pH 7,2, a 4°C per 1 h e successivamente lavate due volte in tampone cacodilato 0,1M, pH 7,2, a 4°C. Le cellule fissate sono state disidratate in soluzioni di acetone al 25%, 50%, 75%, 95% e due volte al 100%, a temperatura ambiente, per 10 min e immediatamente asciugate all'aria (3). Dal vetrino delle chamber slide sono state tagliate sezioni (1 × 1 cm), posizionate su porta campioni di alluminio lucidato (stub) e ricoperte, uniformemente e sotto vuoto, da uno strato di oro dello spessore di circa 20 nm. I campioni così trattati sono stati esaminati con il microscopio elettronico a scansione Zeiss DSM 940 A. Le fotografie sono state acquisite come immagini elettroniche e archiviate mediante software AxioVision.

## Risultati

### Caratterizzazione dei sieri

Gli esami di immunoblotting, eseguiti impiegando come antigene cellule integre di *Mmm-SC*, hanno rivelato che le IgG contenute nel siero immune identificano un pannello di proteine definite da bande di 110, 98, 95, 85, 80, 72, 60-62, 48, 39 kDa. Nel siero negativo non è stata identificata alcuna banda proteica (Fig. 1). L'analisi, ripetuta per studiare il profilo antigenico identificato dalle IgM, ha dimostrato che il siero positivo riconosce gli stessi antigeni proteici delle IgG ad eccezione della frazione di 95 kDa. I risultati hanno inoltre dimostrato che le IgM contenute nel siero negativo sono capaci di identificare proteine di 80, 60-62 e 48 kDa (Fig. 1).

### Microscopia elettronica a scansione

L'analisi al SEM ha previsto dapprima l'osservazione dei test di controllo da 1 a 4 e, in seguito, quella dei test da 1 a 3. Nei test di controllo, la maggior parte dei monociti, osservati al microscopio elettronico a scansione, ha assunto il tipico aspetto dei macrofagi, adesi ai vetrini di coltura, con

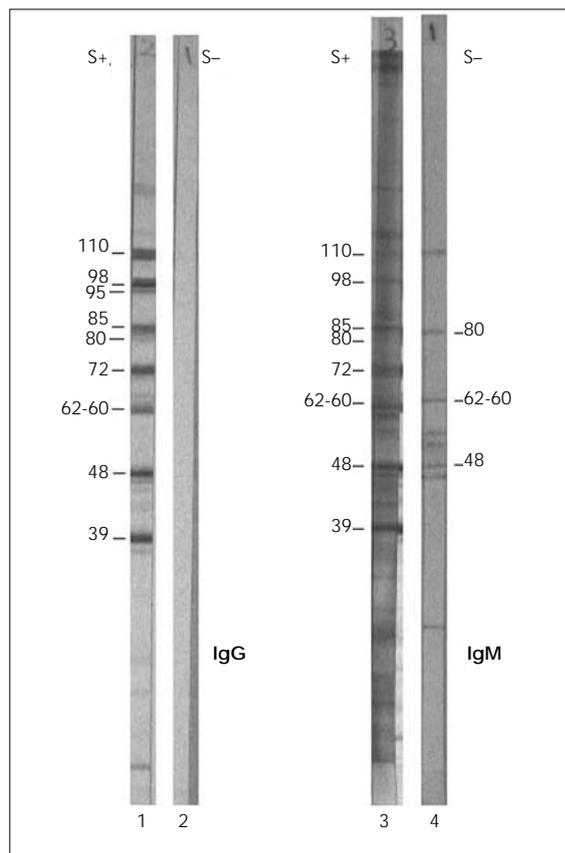


Figura 1  
Gli immunoblots rivelano gli antigeni del *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identificati dalle IgG (segmenti 1 e 2) e dalle IgM (segmenti 3 e 4) del siero immune (S+) e del siero negativo (S-)  
I pesi molecolari delle frazioni proteiche immunogeniche identificate dalle IgG e dalle IgM sono indicati su ciascun segmento

cambiamenti morfologici tipici dei macrofagi naturalmente attivati. Le cellule hanno mostrato forma generalmente rotondeggiante (Fig. 2) e lievi cambiamenti morfologici, come piccole estroflessioni di porzioni di citoplasma e increspamento della membrana cellulare con produzione di microproiezioni necessarie per l'adesione alla superficie del vetro (Fig. 3). Lo striscio della coltura di *Mmm-SC* ha mostrato microrganismi pleiomorfi, perlopiù rotondeggianti, su strato di materiale amorfo (Fig. 4). Dopo 6 h di incubazione, in presenza di siero bovino immune o negativo, la maggior parte dei macrofagi, pur mantenendo forma rotondeggiante, ha mostrato una più marcata estroflessione del citoplasma, larghi processi simili a flange e sviluppo di pseudopodi. (Figg. 5 e 6).

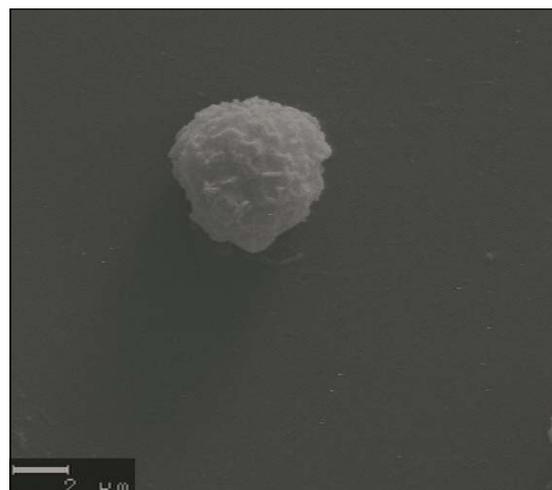


Figura 2  
Test di controllo 1: macrofago di forma rotondeggiante aderente al vetro delle chamber slide  
(Microscopio elettronico a scansione 5 000×)

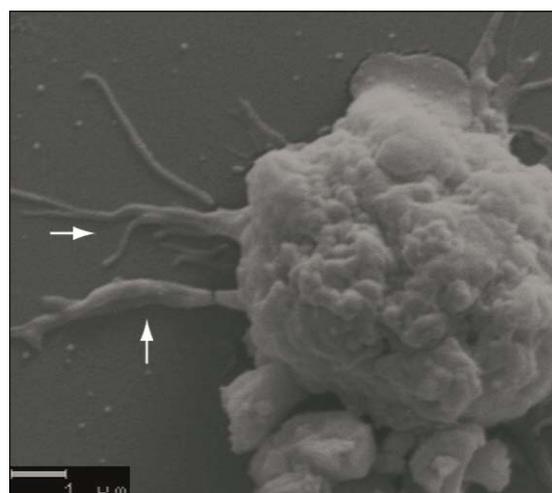


Figura 3  
Test di controllo 1: macrofago di forma rotondeggiante aderente al vetro delle chamber slide  
Si osservano estroflessioni del citoplasma e sviluppo di microproiezioni (frecce)  
(Microscopio elettronico a scansione 10 000×)

L'analisi dei test è stata eseguita dopo 6 h di incubazione della coltura cellulare con *Mmm-SC*. Nel test 1 i macrofagi hanno mostrato forma rotondeggiante, limitate modificazioni della superficie cellulare e presenza di numerose microproiezioni della membrana cellulare; si sono osservati micoplasmi riuniti in aggregati separati dalle cellule (Fig. 7). Nel test 2 le colture di macrofagi infettate con *Mmm-SC*, in presenza di siero negativo, hanno

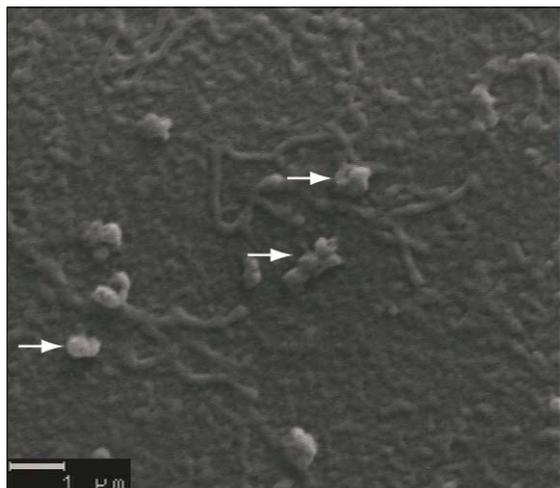


Figura 4  
Test di controllo 2: striscio di colture di  
*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small  
colony  
Si osserva la variabilità nella forma dei microrganismi  
(freccie) su fondo di materiale amorfo  
(Microscopio elettronico a scansione 10 000×)

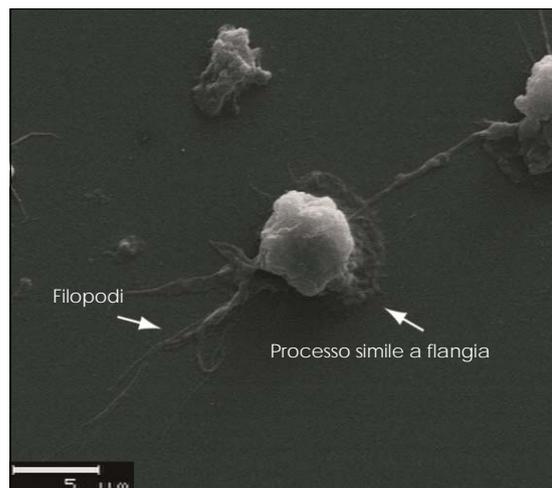


Figura 6  
Test di controllo 4: coltura di macrofagi  
successiva all'aggiunta di siero immune  
Si osservano una marcata estroflessione del  
citoplasma, ampi processi simili a flange e filopodi,  
mantenimento della forma cellulare rotondeggiante  
(Microscopio elettronico a scansione 3 000×)

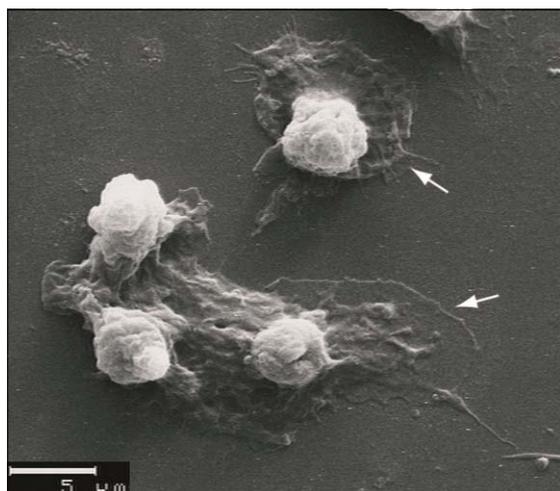


Figura 5  
Test di controllo 3: coltura di macrofagi  
successiva all'aggiunta di siero negativo  
Si osservano marcata estroflessione del citoplasma,  
ampi processi simili a flange (freccie), mantenimento  
della forma cellulare rotondeggiante  
(Microscopio elettronico a scansione 3 000×)

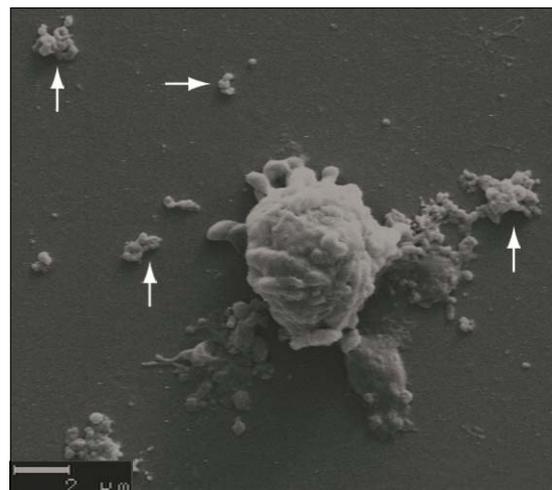


Figura 7  
Test 1: coltura di macrofagi infettati con  
*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small  
colony  
Si osservano la forma rotondeggiante della cellula,  
limitate modificazioni della superficie e aggregati di  
micoplasmata (freccie) distanti dalla cellula  
(Microscopio elettronico a scansione 5 000×)

mostrato modificazioni strutturali simili con presenza di micoplasmata isolati nelle strette vicinanze delle cellule (Fig. 8). Nel test 3 le colture infette da micoplasmata, dopo aggiunta di siero bovino immune, hanno mostrato importanti cambiamenti morfologici. Sebbene le cellule abbiano conservato la loro individualità strutturale, è stata osservata una vasta rete di interconnessione di filopodi e la

perdita della forma rotondeggiante (Fig. 9). Le cellule hanno mostrato inoltre ampi veli citoplasmatici avvolgenti gli aggregati di micoplasmata (Fig. 10) e micoplasmata in stretto contatto con la loro membrana cellulare (Fig. 11).

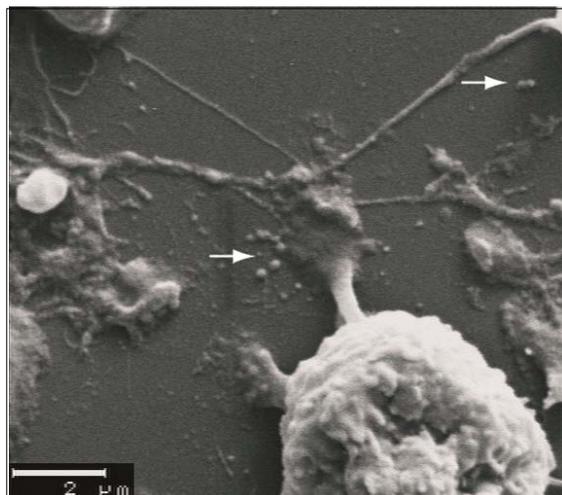


Figura 8  
Test 2: coltura di macrofagi infettati con *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony successiva all'aggiunta di siero negativo. Si osservano la forma rotondeggiante dei macrofagi e i micoplasmi isolati e distanti dalla cellula (Microscopio elettronico a scansione 8 000×)

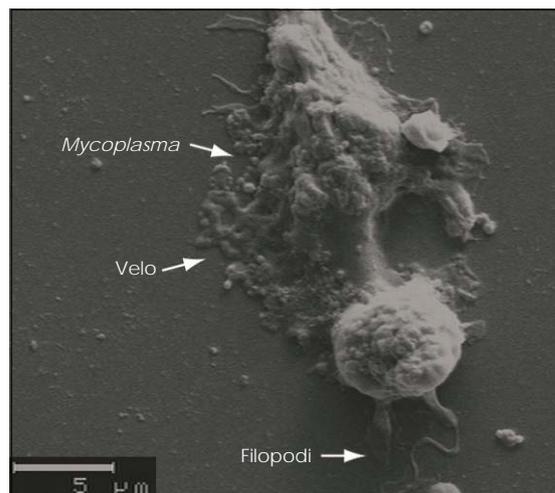


Figura 10  
Test 3: coltura di macrofagi infettati con *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony successiva all'aggiunta di siero immune. Si osservano la presenza di un ampio velo inglobante gli aggregati di micoplasmi e sottili filopodi (Microscopio elettronico a scansione 3 000×)

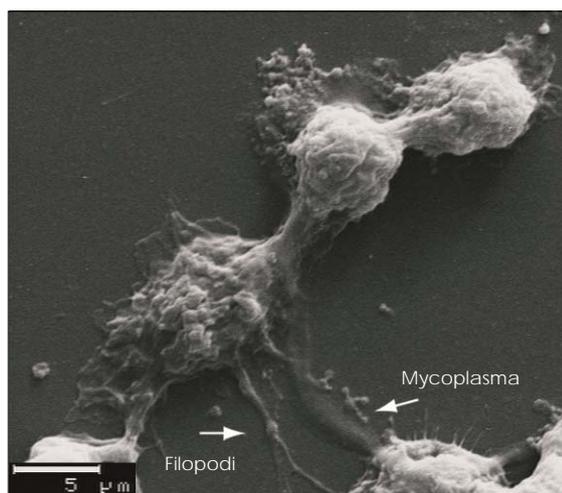


Figura 9  
Test 3: coltura di macrofagi infettati con *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony successiva all'aggiunta di siero immune. Si osservano la perdita della forma rotondeggiante della cellula e una vasta rete di interconnessione di filopodi tra le cellule (Microscopio elettronico a scansione 3 000×)

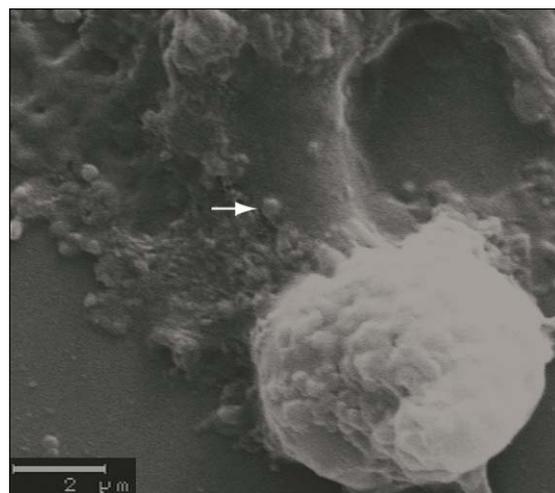


Figura 11  
Test 3: coltura di macrofagi infettati con *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony successiva all'aggiunta di siero immune. Si osservano micoplasmi isolati (freccia) in stretto contatto con la membrana macrofagica (Microscopio elettronico a scansione 8 000×)

## Conclusioni

La PPCB è una malattia che si trasmette per contatto. Generalmente l'agente patogeno rimane localizzato nel polmone causando bronchiolite e polmonite. I meccanismi di difesa dell'ospite, in seguito all'invasione di *Mmm-SC* nel tratto respiratorio, sono solo in

parte conosciuti. L'analisi microscopica delle lesioni polmonari ha rivelato l'infiltrazione di granulociti neutrofili e macrofagi negli alveoli durante gli stadi precoci dell'infiammazione, seguita dal reclutamento di monociti e plasmacellule (5, 6, 8). Pertanto, i macrofagi alveolari e i granulociti neutrofili rappresentano le cellule primarie nel meccanismo di difesa dell'ospite. L'iniziale interazione micoplasma-

fagocita riveste un ruolo importante nel determinare l'evoluzione dell'infezione e la gravità della malattia (9).

I macrofagi sono importanti cellule accessorie del sistema immunitario, coinvolti nella presentazione dell'antigene e nella produzione di citochine. Agiscono da cellule secernenti e regolatrici, iniziando e modulando i processi infiammatori. La loro attività fagocitaria può essere aumentata dagli anticorpi opsonizzanti prodotti in seguito all'esposizione agli antigeni (1, 10).

Gli studi condotti sulle interazioni tra *Mycoplasma dispar* e i macrofagi alveolari hanno indicato che la capacità di questi ultimi di fagocitare il micoplasma è strettamente correlata alla produzione di anticorpi opsonizzanti diretti, principalmente, verso gli antigeni capsulari (4).

I risultati dello studio *in vitro* effettuato hanno mostrato come l'attivazione e i cambiamenti morfologici, osservati al SEM, siano stati indotti dalla presenza del siero immune anti *Mmm-SC* e che l'attivazione dei macrofagi induca sia lo sviluppo di filopodi e microproiezioni della membrana cellulare sia l'ancoraggio dei micoplasmi alla loro superficie.

Questo modello sperimentale suggerisce che la risposta umorale, indotta nei bovini infettati con *Mmm-SC*, possa favorire l'attivazione dei macrofagi.

I risultati dell'immunoblotting hanno dimostrato che le IgM e le IgG del siero immune

riconoscono principalmente le stesse frazioni proteiche. Il passaggio da una risposta precoce, rappresentata dalla produzione di IgM, ad una più specifica, caratterizzata dalla produzione di IgG, può rappresentare una fase importante del sistema immunitario nel controllo della diffusione del *Mmm-SC* nel tessuto. Le IgG possono agire come opsonine nell'individuare i micoplasmi e favorire la fagocitosi attraverso i recettori del frammento cristallizzabile (Fc)  $\gamma$  dei macrofagi.

Non è chiaro quale sia il ruolo delle IgM nella risposta umorale in corso di PPCB ma l'analisi all'immunoblotting ha rivelato come il siero di bovino "naïve" contenesse IgM capaci di rilevare alcuni antigeni di *Mmm-SC*. Probabilmente le frazioni proteiche 80, 60-62 e 48 kDa, identificate solo da IgM, riconoscono epitopi simili ad altri microrganismi contro i quali l'animale è stato precedentemente sensibilizzato. Le IgM, infatti, sono caratterizzate da alta avidità ma bassa affinità che si esprime in una minore specificità per l'epitopo considerato, con la conseguente possibilità di cross-reattività antigenica (1).

Sono necessari, pertanto, ulteriori studi per definire con maggiore chiarezza, nel corso dell'infezione di PPCB, il ruolo della risposta delle cellule B ed i meccanismi di interazione tra *Mmm-SC* e macrofagi.

## Bibliografia

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. & Pillai S. 2007. Cells and tissues of the adaptive immune system. *In* Cellular and molecular immunology, 6th Ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, 56 pp.
2. Abdo E.M., Nicolet J., Miserez R., Gonçalves R., Regalla J., Griot C., Bensaïde A., Krampe M. & Frey J. 1998. Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet Microbiol*, **59** (2-3), 109-122.
3. Al-Kaïssi A. & Alley M.R. 1983. Electron microscopic studies of the interaction between ovine alveolar macrophages and *Mycoplasma ovipneumoniae* *in vitro*. *Vet Microbiol*, **8**, 571-584.
4. Almeida R.A., Wannemuehler M.J. & Rosenbusch R.F. 1992. Interaction of *Mycoplasma dispar* with bovine alveolar macrophages. *Infect Immun*, **60** (7), 2914-2919.
5. Bashiruddin J.B., Santini F.G., De Santis P., Visaggio M.C., Di Francesco G., D'Angelo A. & Nicholas R.A.J. 1999. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* in tissue from outbreak of contagious bovine pleuropneumonia by culture, immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Vet Rec*, **145**, 271-274.

6. Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. 2004. Contagious bovine pleuropneumonia. *In* Infectious diseases of livestock, 2nd Ed. Oxford University Press, Cape Town, Oxford and New York, Vol. 3, 2045-2059.
7. Faldyna M., Levá L., Knötigová P. & Toman M. 2001. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol*, **82**, 23-37.
8. Food and Agriculture Organization (FAO) 2002. Preparation of contagious bovine pleuropneumonia contingency plans. *In* FAO Animal Health Manual. FAO, Roma, 14.
9. Howard C.J. & Taylor G. 1983. Interaction of mycoplasmas and phagocytes. *Yale J Biol Med*, **56**, 643-648.
10. Marshall A.J., Miles R.J. & Richards L. 1995. The phagocytosis of mycoplasma. *J Med Microbiol*, **43**, 239-250.
11. Niang M., Diallo M., Cissé O., Kone M., Doucoure M., Roth J.A., Balcer-Rodrigues V. & Dedieu L. 2006. Pulmonary and serum antibody responses elicited in zebu cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by contact exposure. *Vet Res*, **37**, 733-744.
12. Pini A., De Santis P., Langella V., Ferri N., Scacchia M., Di Francesco G., Tittarelli M., Visaggio M. & Lelli R. 1999. Experimental infection of cattle with a strain of *Mycoplasma mycoides mycoides* small colony (*Mmm* SC). *In* COST Action 826 International Symposium: Mycoplasmas of ruminants, 2-4 June, Toulouse. European Commission, Brussels, 93.
13. Stadtländer H. 2007. Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy of mollicutes: challenges and opportunities. *In* Modern research and educational topics in microscopy. Series 2 (A. Méndez-Vilas & J. Diaz, eds). Formetex, Badajoz, 122-131.
14. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2008. Contagious bovine pleuropneumonia. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th Ed. OIE, Paris, 712-724.
15. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2008. Contagious bovine pleuropneumonia. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th Ed. OIE, Paris, 1000-1003.