3. FEBBRE CATARRALE DEGLI OVINI (BLUETONGUE)

La febbre catarrale degli ovini, più comunemente conosciuta come bluetongue (BT), è una malattia infettiva dei ruminanti trasmessa da insetti. L'agente eziologico è un virus appartenente alla famiglia *Reoviridae*, genere *Orbivirus*, del quale si conoscono 24 sierotipi, 21 dei quali isolati nell'Africa australe. La loro patogenicità è variabile e, benché tutte le specie di ruminanti siano recettive, la malattia si manifesta in forma più grave negli ovini.

Sintomatologia

Nelle pecore, il periodo di incubazione varia da 4 a 14 giorni, con una media di 7 giorni. La gravità delle manifestazioni cliniche dipende dal sierotipo virale e dalla razza. In alcune razze africane autoctone, l'infezione può essere inapparente mentre in quelle importate, in particolare la merino, la sintomatologia è grave. È da tenere presente che la fotosensibilizzazione gioca un ruolo importante nel determinare la gravità dei sintomi: infatti, se le pecore sono tenute al riparo dalle radiazioni solari, le alterazioni congestizie sono meno evidenti. La letalità varia tra 2-30%.

L'ipertermia, che dura mediamente 7 giorni, è seguita da malessere, iperemia ed edema della regione orale, oculare e occasionalmente anche della regione auricolare. L'edema delle labbra (Figura 15) non è sempre accompagnato da iperemia.

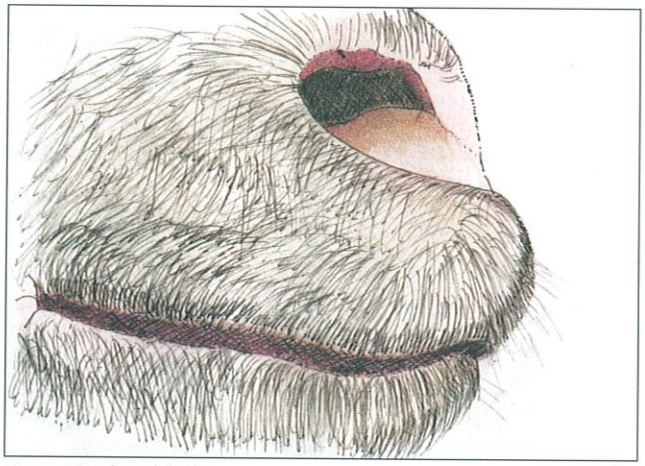


Figura 15: Edema labiale.

In alcuni casi, la lingua edematosa e cianotica protrude dalla bocca (Figura 16), in altri l'edema linguale non è molto pronunciato ma può essere messo in evidenza osservando la punta che appare arrotondata.

Emorragie papillari possono essere visibili su tutta la superficie linguale ma in particolare su quella ventrale (Figura 17). Occasionalmente, l'edema e le emorragie sono profonde, evidenziabili solo con il taglio dell'organo.

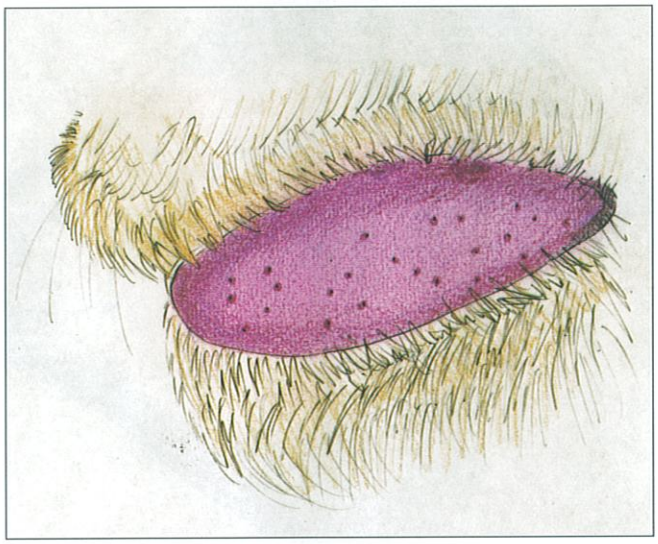


Figura 16: Cianosi ed edema della lingua.

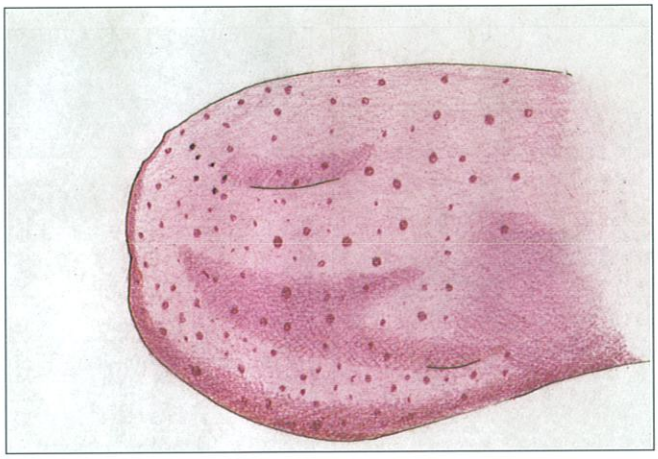


Figura 17: Emorragie sulla superficie ventrale della lingua.

L'edema tende a interessare anche le regioni mandibolare e sottomandibolare (Figura 18) e può essere causa di difficoltà respiratoria.

L'iperemia e l'edema delle palpebre (Figura 19), le emorragie a livello del musello (Figura 20) e la cianosi della mucosa orale sono caratteristiche delle infezioni con ceppi virali ad alta virulenza.

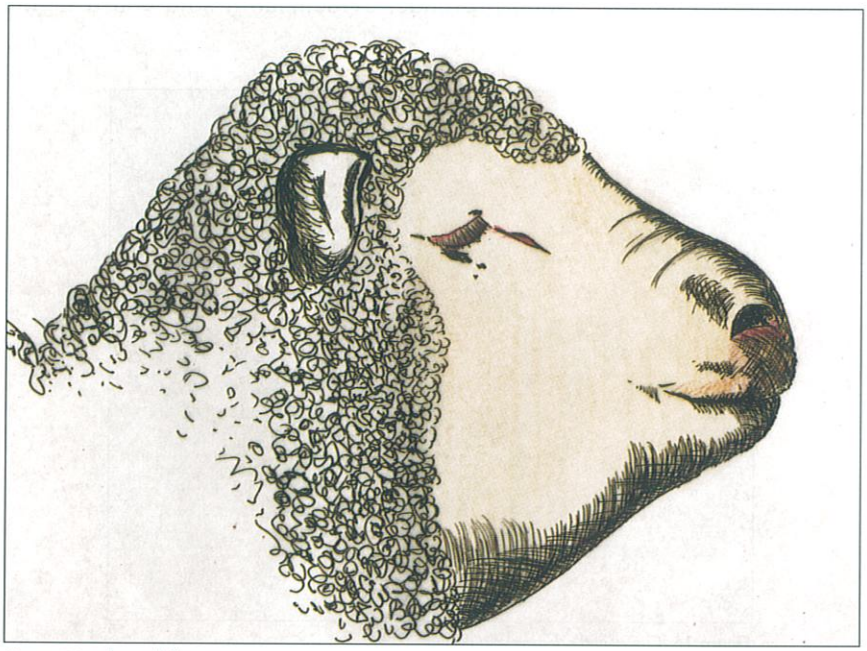


Figura 18: Edema della testa.



Figura 19: Iperemia ed edema palpebrale.



Figura 20: Emorragie a livello del musello

Sul margine linguale e sulla mucosa gengivale in corrispondenza degli incisivi e dei molari sono visibili erosioni con accumulo di materiale necrotico (Figure 21 e 22); la saliva è schiumosa. Queste lesioni tendono a guarire rapidamente, in circa 5 giorni dalla remissione della sintomatologia.

Lo scolo nasale, inizialmente sieromucoso, diventa mucopurulento; intorno alle narici si formano croste che, se rimosse, evidenziano una superficie erosa (Figura 23).

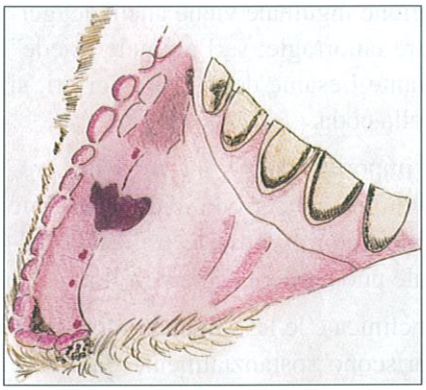


Figura 21: Emorragie ed erosioni della mucosa orale.

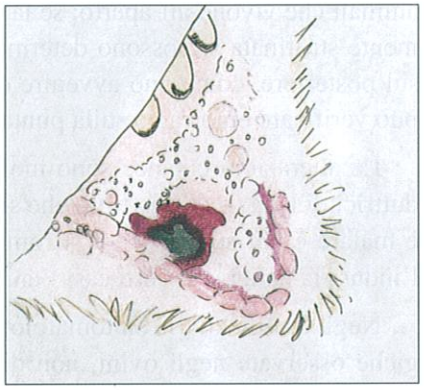


Figura 22: Erosioni e necrosi della mucosa orale.



Figura 23: Scolo nasale e croste a livello del musello.

A livello del cercine coronario si osservano striature emorragiche o, più raramente, emorragie massive (Figure 24 e 25).

Le lesioni podali sono più frequenti agli arti posteriori che a quelli anteriori; per il dolore l'animale ha difficoltà nella deambulazione e cerca di camminare sulle ginocchia. La coronite, se grave, esita nella rottura dello zoccolo. Le emorragie rimangono visibili per 2 o 3 settimane.

L'iperemia cutanea (Figura 26) è maggiormente evidenziabile negli animali che vivono all'aperto; se la regione inguinale viene anche leggermente strofinata si possono determinare emorragie; se l'animale "siede" sul posteriore, come può avvenire durante l'esame degli arti anteriori, si può verificare emorragia sulla punta della coda.

Le alterazioni cutanee sono molto importanti per le razze ovine produttrici di lana; infatti la fibra che si sviluppa nel periodo in cui l'animale è malato è più sottile, tende a rompersi e non può essere utilizzata nell'industria laniera. In certi casi l'animale può perdere l'intero vello.

Negli Stati Uniti, la sintomatologia clinica e le lesioni anatomopatologiche osservate negli ovini, non differiscono sostanzialmente da quelle descritte e osservate nell'Africa australe.

Nelle zone endemiche, la BT raramente si manifesta nei bovini in forma clinica, nei capi in cui la sintomatologia è presente essa può essere molto simile a quanto si osserva nelle pecore. I ricercatori statunitensi ritengono che la BT sia una malattia mediata da immunoglobuline della classe IgE, riproducibile sperimentalmente con la sensibilizzazione del-

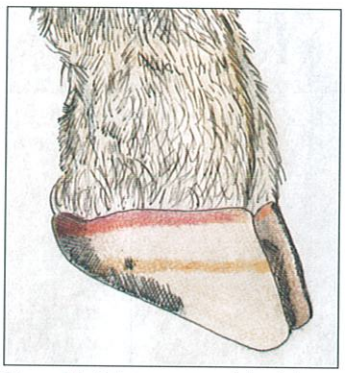


Figura 24: Striature emorragiche del cercine coronario.



Figura 25: Striature emorragiche del cercine coronario e dello zoccolo.

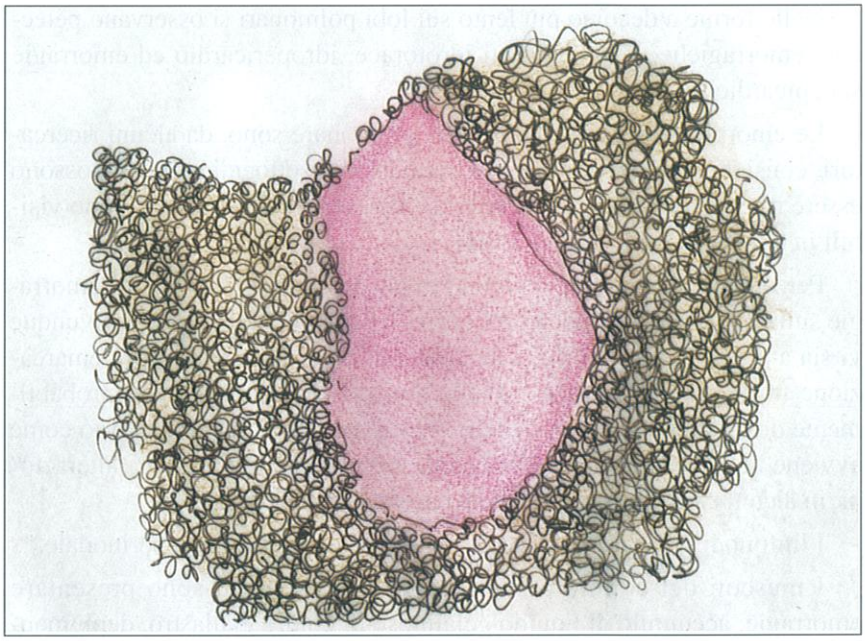


Figura 26: Iperemia cutanea.

l'animale con immunostimolanti e successiva inoculazione di virus. Nelle aree endemiche degli USA l'infezione colpisce sino al 90% della popolazione, tuttavia solo un animale su 1000 manifesta sintomi clinici. Questi ultimi possono presentarsi sotto forma di dermatite crostosa dell'area toracica e cervicale, iperestesia generalizzata e zoppia conseguente alla coronite. Le lesioni a carico della bocca, se presenti, consistono inizialmente in piccole formazioni vescicolari che evolvono in erosioni localizzate, di preferenza, sul palato duro. L'animale è anoressico e la morte estremamente rara. Le infezioni congenite sono responsabili di malformazioni fetali e aborti.

Anatomia patologica

Il quadro anatomopatologico della BT nella pecora è sovrapponibile a quello della peste equina nel cavallo.

L'edema descritto nella regione orale e mandibolare si può estendere sino allo sterno. I polmoni sono congesti, negli alveoli e nell'intero albero bronchiale è presente liquido schiumoso.

Nelle forme a decorso più lento sui lobi polmonari si osservano petecchie emorragiche. Sono presenti idrotorace, idropericardio ed emorragie subepicardiche.

Le emorragie alla base dell'arteria polmonare sono, da alcuni ricercatori, considerate patognomoniche: sono lesioni sottoendoteliali e possono essere meglio evidenziate se l'arteria è osservata in controluce, sono visibili in almeno il 95% dei casi di BT.

Per quanto riguarda la cavità addominale, sono evidenziabili emorragie sulla mucosa dell'omento, all'apice delle papille del rumine e ovunque vi sia attività muscolare. Sulla mucosa dell'omaso c'è una netta demarcazione fra le aree interessate e quelle normali (Figura 27); ciò è probabilmente dovuto a un coinvolgimento selettivo del sistema circolatorio come avviene nella peste equina. L'intestino solitamente non presenta alterazioni, in alcuni casi si possono evidenziare fenomeni congestizi.

I linfonodi possono essere ingrossati e presentare edema perinodale.

I muscoli del collo, dorso e quarto posteriore possono presentare emorragie, accumulo di liquido gelatinoso di colore giallastro, depigmentazione, necrosi a cui consegue calcificazione.

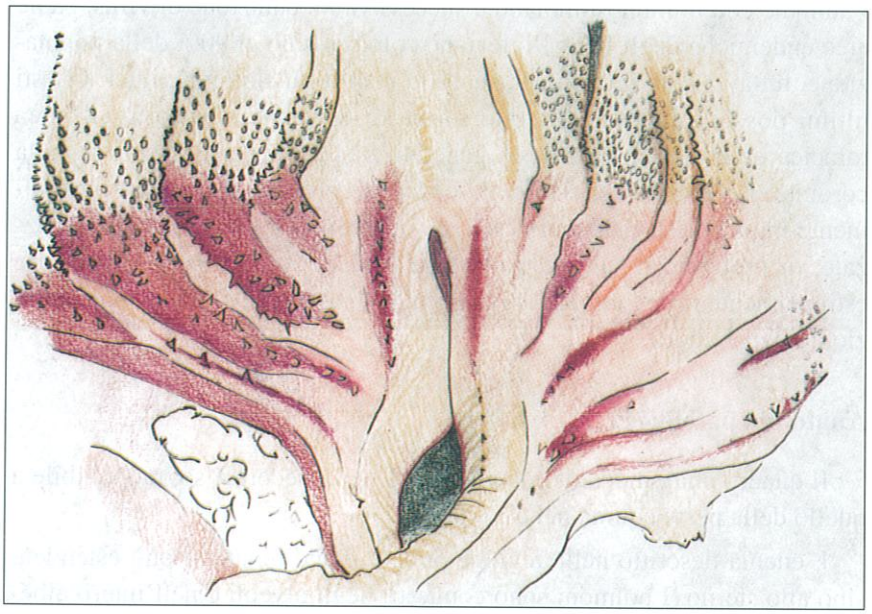


Figura 27: Emorragie della mucosa dell'omaso, l'area affetta è ben demarcata.

L'effetto di queste lesioni diventa clinicamente visibile 2 o 3 settimane dopo la fase acuta, quando l'animale manifesta cachessia, torcicollo (Figura 28) e difficoltà deambulatorie, alterazioni osservabili anche un anno dopo l'infezione. Nel bovino non sono presenti alterazioni necrotiche a carico dei muscoli.

Nella pecora le lesioni congenite differiscono a seconda del periodo di gestazione in cui l'infezione ha avuto luogo. Negli stadi iniziali si ha idroencefalo, negli stadi intermedi formazione di cisti cerebrali, mentre nell'ultimo periodo, si osserva encefalite a focolai. Nel bovino, in caso di infezione precoce si può avere riassorbimento embrionale e aborto, mentre negli ultimi tre mesi di gestazione, solitamente, non si osservano alterazioni di rilievo.

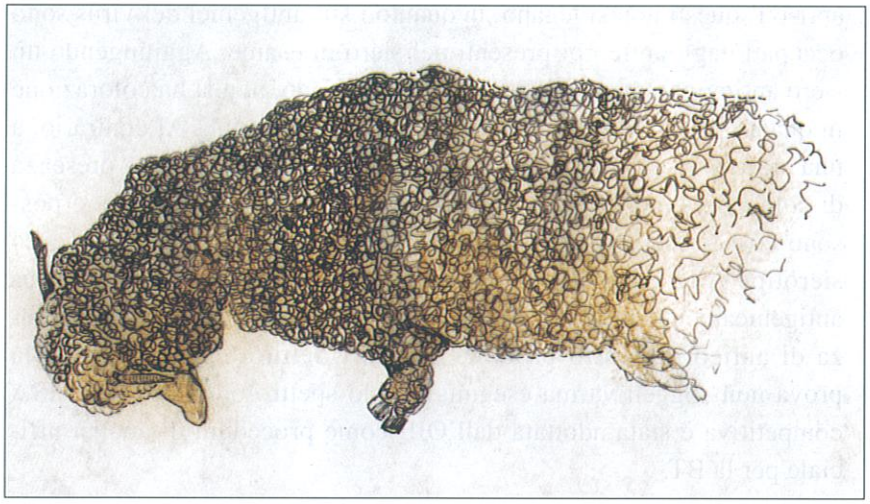


Figura 28: Postumi: torcicollo.

Diagnosi di laboratorio

La diagnosi di laboratorio può essere diretta o indiretta: la prima evidenzia l'antigene, la seconda gli anticorpi. Questi ultimi sono di due tipi: anticorpi di gruppo e anticorpi tipo specifici.

Le prove sierologiche sono:

– la fissazione del complemento. La prova non è mai stata molto utilizzata poiché è meno sensibile dell'immunodiffusione in gel di agar e la

sua standardizzazione difficoltosa, inoltre è possibile avere reazioni crociate con anticorpi da virus antigenicamente correlati;

- l'immunodiffusione in agar. È stata la prova più ampiamente usata. I suoi limiti sono: difficoltà nella produzione di antigeni purificati, esecuzione laboriosa e bassa sensibilità nei confronti di altre prove, come per esempio l'ELISA. L'antigene può reagire con anticorpi verso virus antigenicamente correlati;
- l'ELISA indiretta. Le procedure di purificazione dell'antigene sono complesse, le quantità di prodotto ottenute piccole;
- l'ELISA competitiva. Si basa sul principio che se nel siero in esame sono presenti anticorpi specifici verso il virus BT, questi si legano all'antigene noto. Quando vengono aggiunti gli anticorpi monoclonali anti-BT, questi non si legano, in quanto i siti antigenici del virus sono occupati dagli anticorpi presenti nel siero in esame. Aggiungendo un siero antimonoclonale e il substrato cromogeno, non si ha colorazione in quanto gli anticorpi monoclonali non si sono legati. Al contrario, a una assenza di anticorpi nel siero in esame, corrisponde una presenza di colorazione nella reazione. I vantaggi della prova descritta si possono così riassumere: messa in evidenza degli anticorpi di tutti i 24 sierotipi virali, assenza di reazioni crociate con anticorpi di virus antigenicamente correlati e di reazioni aspecifiche dovute alla presenza di anticorpi contro proteine cellulari, lettura dei risultati della prova non soggettiva ma eseguita con lo spettrofotometro. L'ELISA competitiva è stata adottata dall'OIE come procedura di analisi ufficiale per la BT.

Le prove sierotipo specifiche sono: la sieroneutralizzazione e l'inibizione dell'emoagglutinazione. Quest'ultima, descritta nel 1980, non è mai entrata nell'uso corrente, poiché richiede per ciascun sierotipo un antigene altamente purificato, che così preparato non risulta stabile.

Per l'isolamento del virus, si utilizzano sangue, linfonodi e milza.

Il sangue, prelevato in presenza di anticoagulante durante il periodo febbrile, deve essere conservato a una temperatura tra 4-10°C, evitando il congelamento, dal momento che la lisi della componente cellulare libererebbe il virus a essa associato, con conseguente neutralizzazione da parte

degli anticorpi che potrebbero essere già presenti nel plasma. Le cellule ematiche, separate e lavate per centrifugazione, vengono lisate mediante sonicazione o aggiunta di acqua distillata.

Con i campioni di milza o linfonodi, prelevati da animali sacrificati o morti, si preparano sospensioni al 10% in soluzioni a pH 7,2.

I campioni così preparati, possono essere utilizzati per inoculare pecore, uova embrionate e colture cellulari. Le pecore vengono infettate, per via endovenosa con 1 ml di una delle sospensioni predisposte. Tra il 4° e 7° giorno dall'inoculazione si ha la reazione febbrile; la comparsa e l'intensità degli altri sintomi sono in relazione all'esposizione degli animali ai raggi solari. Le uova embrionate all'ottavo giorno di incubazione sono inoculate per via intravenosa e quindi incubate a 34°C. L'embrione che muore per azione del virus assume una colorazione rosso ciliegia.

Le colture cellulari più utilizzate per l'isolamento del virus sono le linee cellulari Vero e BHK-21, nelle quali si evidenzia l'effetto citopatogeno.

Per una rapida identificazione di gruppo si utilizzano l'immunofluorescenza o l'immunoperossidasi indiretta. In una fase ulteriore si procederà alla tipizzazione del ceppo virale isolato.

I tempi di analisi variano dalle 4 ore con l'ELISA competitiva, ai 5-7 giorni per l'isolamento del virus in colture cellulari con conferma mediante immunofluorescenza; 10-14 giorni se si utilizzano uova embrionate e 2-3 settimane se viene effettuata l'infezione sperimentale in pecore.

Nei laboratori dove la tecnica delle sonde nucleiche è disponibile, la prova può essere applicata sia al campione di sangue prelevato dall'animale infetto, sia al virus isolato in uno dei substrati appena indicati. In questo caso la conferma diagnostica è ottenibile in 24 ore.

Epidemiologia

La diffusione della malattia nel mondo è compresa in un'area geografica delimitata approssimativamente tra il 35° parallelo sud e il 40° nord. In realtà non esiste una linea netta di demarcazione, infatti mentre nelle regioni occidentali del Nord America la sua diffusione rispetta il limite citato, in quelle orientali raggiunge il 48° parallelo.

La BT è diffusa in tutto il continente africano con l'esclusione dei

paesi a nord del Sahara. Negli anni '50 la malattia ha interessato Spagna e Portogallo dove non si è endemizzata, questi paesi sono stati dichiarati indenni negli anni successivi. Focolai di BT si sono verificati più recentemente anche in Turchia, Cipro, Israele, Arabia Saudita e India.

La BT è anche presente in America centrale e meridionale, Malesia, Indonesia, nel Nord e Nord-Est dell'Australia (Figura 29). Si ipotizza che, per timore di ripercussioni di natura economico-commerciale, non tutti i paesi denuncino la sua presenza.

La prima descrizione scientifica della BT risale al 1881, ma la malattia era già conosciuta nell'Africa australe alla fine del 1700, quando pecore di razza merino furono introdotte per la prima volta nella regione.

Nel 1944 Du Toit, in Sud Africa, dimostrò che il virus viene trasmesso da *Culicoides imicola.* Questo vettore, anche se non l'unico, assolve il ruolo più importante per quanto riguarda la diffusione della malattia nell'Africa australe. *C. variipennis* ha un ruolo determinante nel Nord America, *C. insignis* e *C. fulvus* in Australia. Si può in ogni caso affermare che tutte le specie di *Culicoides* appartenenti al sottogruppo *Avaritia* devono essere considerate potenziali vettori del virus.

La prevalenza della malattia è influenzata dai fattori che regolano la presenza dei vettori e pertanto il suo andamento è strettamente stagionale. I primi casi di malattia si osservano in estate inoltrata, la prevalenza maggiore invece alla fine della stagione estiva; la malattia scompare con il sopraggiungere dei primi freddi quando la temperatura scende al di sotto dei 12°C.

In Africa, la BT è un'infezione dei ruminanti selvatici, nei quali non si evidenzia sintomatologia clinica. In Nord America, al contrario, tra i selvatici, come il cervo americano (*Odocoileus virginianus*), l'antilocapra (*Antilocapra americana*) e la pecora a grandi corna del deserto (*Ovis canadiensis*), si evidenziano gravi sintomi di malattia. Il bovino agisce da amplificatore virale, generalmente in assenza di manifestazioni cliniche. L'esistenza del ciclo virale bovino-*Culicoides* diviene manifesto solitamente quando le pecore entrano nel ciclo epidemico.

In Sud Africa, nel periodo invernale, il virus persiste nei portatori, con il sopraggiungere della stagione estiva la popolazione di insetti vet-

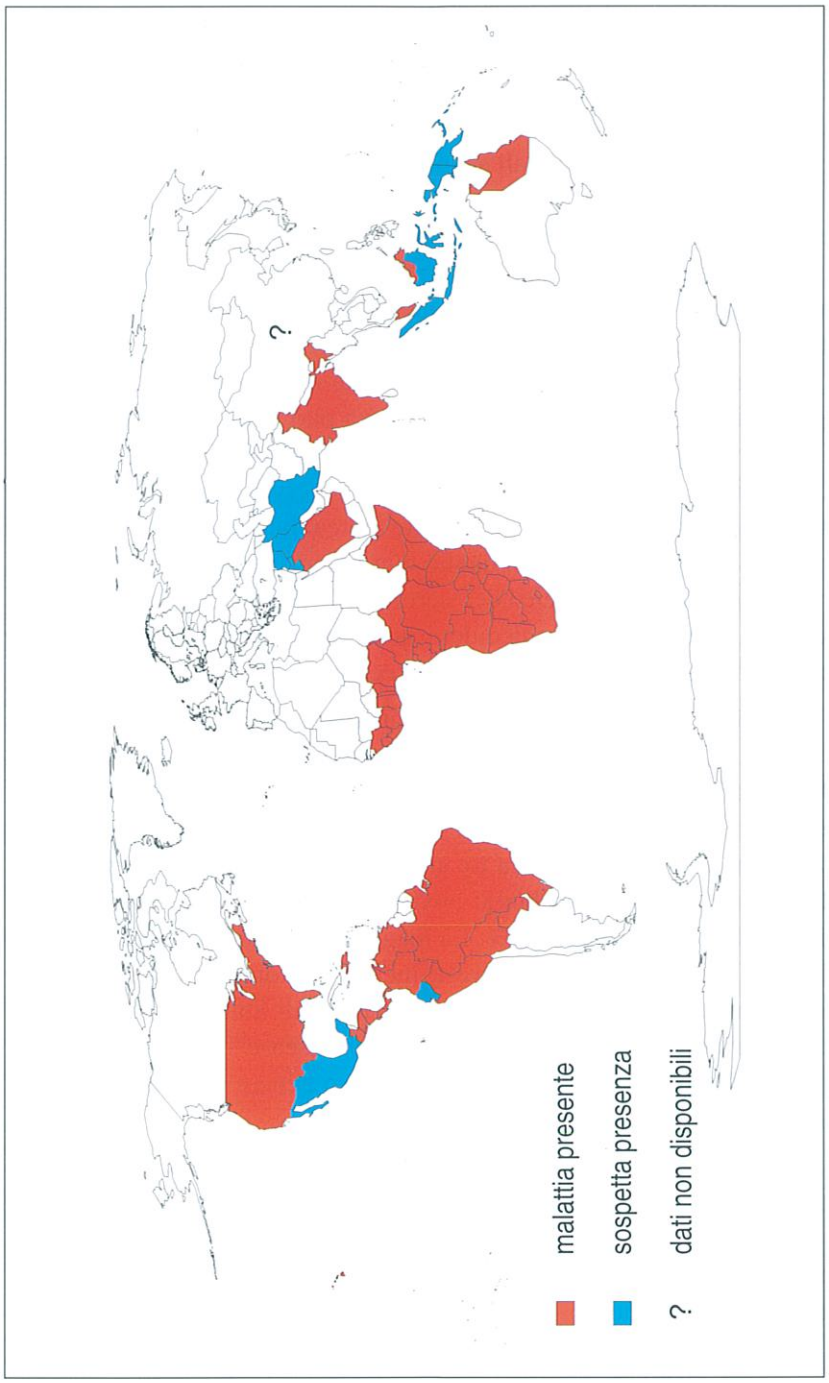


Figura 29: Distribuzione geografica della febbre catarrale degli ovini.

tori si moltiplica e si ha un'amplificazione virale prima nei ruminanti selvatici e in seguito nei bovini. Alla fine dell'estate australe, nei mesi di febbraio-marzo, quando sia i vettori che il virus sono ai loro massimi livelli di concentrazione, la malattia esplode improvvisamente nelle pecore che fungono da animali sentinella. Questo è stato comprovato da un piano di sorveglianza istituito sulle popolazioni sia di *Culicoides* spp. che di vertebrati recettivi. Si è evidenziato che *C. imicola* preferisce nutrirsi sui ruminanti selvatici e sui bovini piuttosto che sulle pecore; in una stagione, si possono isolare da questi vettori anche 15 diversi sierotipi del virus. Alcuni di essi possono essere predominanti per una, due o più stagioni e costituire il 60-65% del totale degli isolamenti effettuati. Negli anni successivi la loro predominanza può ridursi a tal punto, che dimostrarne la presenza diventa difficile con i metodi di campionamento utilizzabili sul campo. Sulla base di queste osservazioni, i sierotipi sono stati così distinti: quelli aventi un alto potenziale endemico, come ad esempio i sierotipi 2, 4, 5 e 6, quello con potenziale intermedio, sierotipo 12 e quelli a basso potenziale, sierotipi 7, 15, 18 e 22. Si tiene conto di queste osservazioni per decidere quali sierotipi vadano inclusi nel vaccino polivalente da utilizzare nelle pecore.

Negli Stati Uniti, sono stati identificati sino ad ora 4 sierotipi di virus: 10, 11, 13 e 17. Il tipo 10 fu il primo a essere isolato negli anni '50 in California; il tipo 11, isolato in Texas, è quello predominante; il tipo 17 sembra presente solo negli USA. Dai dati di un'indagine sierologica, condotta in un periodo di circa tre anni, la positività tra gli animali controllati risultava così distribuita: bovini 30%, ovini 36%, caprini 21%, antilopi 50%, altri selvatici 28%. La maggior parte dei casi di BT si verifica negli stati del Sud e dell'Ovest, mentre il Nord-Est del paese sembrerebbe indenne. È da ricordare inoltre, che negli Stati Uniti è diffusa su tutto il territorio la "Epizootic haemorrhagic disease" del cervo, malattia sostenuta da un virus appartenente allo stesso genere e strettamente correlato a quello della BT.

La regionalizzazione della BT negli Stati Uniti è probabilmente dovuta al fatto che *C. variipennis* varietà *sonorenzis,* vettore della BT negli Stati del Sud-Est e dell'Ovest, non è presente negli Stati del Nord-Est. In questi ultimi, le varietà di *C. variipennis* presenti non sono efficienti trasmettitori dell'infezione.

Il ruolo del seme nella trasmissione della malattia è stato argomento

dibattuto per lungo tempo, sembra che possa trasmettere l'infezione solo se prelevato da un animale in fase viremica. Sia nel bovino che nell'ovino non sono stati osservati fenomeni di immunotolleranza.

Diagnosi differenziale

La diagnosi differenziale deve prendere in considerazione:
- l'afta epizootica, causa di zoppia e lesioni buccali;
- l'ectima contagioso che si manifesta con lesioni proliferative a livello buccale;
- la pedaina;
- la stomatite micotica.

Da alcuni autori vengono anche citate, per quanto riguarda il bovino, l'infezione da parainfluenza 3, la rinotracheite e la malattia delle mucose.

Profilassi

Nei paesi dove la BT è endemica, la lotta al vettore non trova pratica applicazione. La malattia è più difficile da controllare della peste equina, sia perché l'infezione può avere un decorso inapparente in molte più specie animali, sia perché la stabulazione, che può essere utilizzata nel caso di un focolaio di peste equina, non è di pratica applicazione con la specie ovina. L'unica reale alternativa a disposizione degli allevatori è la vaccinazione.

Il primo vaccino prodotto con tre sierotipi, attenuati con passaggi seriali su uova embrionate, fu utilizzato in Sud Africa nel 1947.

L'attuale individuazione di 25 sierotipi crea difficoltà per l'immunizzazione degli animali. Il vaccino attualmente utilizzato nell'Africa australe contiene 15 sierotipi, raggruppati a seconda della loro patogenicità residua per la pecora e somministrati in tre dosi pentavalenti a tre settimane di intervallo l'una dall'altra. I tipi virali maggiormente attenuati sono somministrati con la prima dose, mentre quelli meno attenuati con la terza. I sierotipi sono anche selezionati e incorporati nel vaccino sulla base della loro predominanza nel vettore.

Sono stati provati vaccini inattivati, ma finora i risultati ottenuti sono stati insoddisfacenti.

Al contrario, le biotecnologie sembrano dare risultati incoraggianti: le proteine virali VP2-VP5 e VP3-VP7 sono capaci di unirsi per assumere una configurazione simile a quella del virus naturale. L'antigene, preparato con queste tecnologie, quando somministrato con un appropriato adiuvante, induce nell'animale una reazione anticorpale e un livello di protezione significativi, anche se non ancora paragonabili a quelli ottenuti con il vaccino attenuato. Sfruttando il fatto che tra i differenti sierotipi esistono in alcuni casi strette correlazioni, la procedura sopracitata potrebbe permettere di assemblare particelle virali con un più ampio spettro antigenico, in maniera tale da ridurre il numero dei sierotipi virali da incorporare nel vaccino.

Le relazioni commerciali tra paesi indenni e paesi in cui la BT è endemica devono essere rigorosamente regolamentate da norme relative all'importazione nel paese indenne non solo di animali recettivi, ma anche di materiale seminale ed embrionale.

Per gli animali vivi, la quarantena nel paese esportatore e di destinazione deve aver luogo in locali a prova di insetto. I vettori aerei prima di essere sottoposti alle normali procedure di pulizia e disinfezione devono essere trattati con insetticidi.

In caso di focolaio in un paese precedentemente indenne si deve procedere all'abbattimento degli animali nel focolaio, al blocco della movimentazione animale e stabilire una zona di protezione con un raggio di almeno 50 km, tenendo conto delle barriere naturali.

Bibliografia

Acree J.A. 1991. Failure of embryos from bluetongue infected cattle to transmit virus to suceptible recipients or their offspring. Theriogenology, **36**: 689-697.

Afshar A., F.C. Thomas, P.F. Wright, J.L. Shapiro, J. Anderson and R.W. Fulton 1987. Blocking dot. Elisa, using a monoclonal antibody for detection of antibodies to bluetongue virus in bovine and ovine sera. Journal of Virological Methods, **18**: 271-280.

Afshar A. 1994. Bluetongue: Laboratory diagnosis. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, **17**: 221-242.

Alexander G.I., T.D. St George and G.P. Gard 1994. Bluetongue research in Australia - 1993. Australian Veterinary Journal, **71(6)**: 182-183.

Alexander K.A., N.J. MacLachlan *et al.* 1994. Evidence of natural bluetongue virus infection among African carnivors. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **51**: 568-576.

Alexander R.A. 1959. Bluetongue as an international problem. Bulletin de L'Office International des Epizooties, **51**: 432-439.

Anderson G.A., J.L. Stott, L.J. Gershwin and B.I. Osburn 1985. Subclinical and clinical bluetongue disease in cattle: Clinical, pathological and pathogenic considerations. *In:* Barber T.L. and Jochim M.M. (eds). Bluetongue and Related Orbiviruses. New York: Alan R. Liss.

Aradaib I.E., G.Y. Akita and B.I. Osburn 1994. Detection of epizootic hemorrhagic disease virus serotypes 1 and 2 in cell culture and clinical samples using polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest., **6(2)**: 143-147.

Aradaib I.E., J.W. McBride, W.C. Wilson and B.I. Osburn 1995. Development of polymerase chain reaction for specific identification of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 1. Archives of Virology, **140(12)**: 2273-2281.

Barber T.L. and M.M. Jochim 1985. Bluetongue and Related Orbiviruses. Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 178. New York: Alan R. Liss.

Barratt Boyes S.M. and N.J. MacLachlan 1994. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. Veterinary Microbiology, **40(3-4)**: 361-371.

Barratt Boyes S.M. and N.J. MacLachlan 1995. Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., **206(9)**: 1322-1329.

Bowen R.A., T.H. Howard, R.P. Elsden and G.E. Seidel 1985. Bluetongue virus and embryo transfer in cattle. *In:* Barber T.L. and Jochim M.M., (eds). Bluetongue and Related Orbiviruses. New York: Alan R. Liss.

Bowen R.A., T.H. Howard and B.W. Pickett 1985. Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected bulls. *In:* Barber T.L. and Jochim M.M., (eds). Bluetongue and Related Orbiviruses. New York: Alan R. Liss.

Campbell C.H. 1985. Immunogenicity of bluetongue virus inactivated by gamma irradiation. Vaccine, **3**: 401-405.

Campbell C.H. and M.J. Grubman 1985. Current knowledge on the biochemistry and immunology of bluetongue. *In:* Pandey R., (ed.). Progress in Veterinary Microbiology and Immunology, **1**: 58-79.

Castrucci G. 1994. The Reoviridae. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, **17(3-4)**: 151-331.

Chander S., G. Prasad and N.C. Jain 1991. Dot immunobinding for the detection of bluetongue virus antibodies in sheep experimentally inoculated with bluetongue virus type 1. Veterinary Microbiology, **28**: 289-294.

Charton H., O. Prunaux et A. Guignard 1991. La fievre catarrhale du mouton (bluetongue) à la Reunion. Resultats d'une enquete serologique. Revue Medicine Veterinaire, **142**: 415-418.

Cherrington J.M., H.W. Ghalib, M.M. Sawyer and B.I. Osburn 1985. Detection of viral antigens in bluetongue virus-infected ovine tissues using the peroxidase-antiperoxidase technique. American Journal of Veterinary Research, **46**: 2356-2359.

Cloete M., D.H. Du Plessis, A.A. Van Dijk, H. Huismans, G.J. Viljoen, D.H. Du Plessis and A.A. Van Dijk 1994. Vaccinia virus expression of the VP7 protein of South African bluetongue virus serotype 4 and its use as an antigen in a capture Elisa. Archives of Virology, **135(3-4)**: 405-418.

Dangler C.A., C.A. De Mattos, C.C. De Mattos and B.I. Osburn 1990. Identifying bluetongue virus ribonucleic acid sequences by the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, **28**: 281-292.

De Mattos C.C., C.A. De Mattos, B.I. Osburn, C.A. Dangler, R.Y. Chuang and R.H. Doi 1989. Recombinant DNA probe for serotype-specific identification of bluetongue virus 17. American Journal of Veterinary Research, **50**: 536-541.

Doyle K.A., B.A. Robinson, D.W. Wilson 1995. Quarantine requirements for the importation of black rhinoceros from Zimbabwe into Australia. Aust. Vet. J., **72(10)**: 364-368.

Du Plessis D.H. 1992. Serological differentiation of five bluetongue viruses serotypes in indirect Elisa. Onderstepoort Journal of Veterinary Medicine, **59**: 119-122.

El Hussein A., C.H. Calisher, F.R. Holbrook, R.J. Schoepp and B.J. Beaty 1989. Detection of bluetongue virus antigens in *Culicoides variipennis* by enzyme immuno-assay. Journal of Clinical Microbiology, **27**: 1320-1323.

Els H.J. and D.W. Verwoerd 1969. Morphology of bluetongue virus. Virology, **38**: 213-219.

Emau P., S.N. Giri, G.A. Anderson, J.L. Stott and B.I. Osburn 1984. Function of prostaglandins, thromboxane A2, and histamine in hypersensitivity reaction to experimental bluetongue disease in calves. Americnn Journal of Veterinary Research, **45**: 1852-1857.

Erasmus B.J. 1975. Bluetongue in sheep and goats. Australian Veterinary Journal, **51**:165-170.

Erasmus B.J. 1975. The epizootiology of bluetongue: The African situation. Australian Veterinary Journal, **51**: 196-198.

Erasmus B.J. 1980. The epidemiology and control of bluetongue in South Africa. Bulletin de l'Office International des Epizooties, **92**: 461-467.

Erasmus B.J. 1990. Bluetongue. *In:* Dinter Z. and Morein B., (eds). Virus Infections of Ruminants. Vol. 3. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

Gard G.P. 1987. Studies of bluetongue virulence and pathogenesis in sheep. Department of Industries and Development, Darwin, Technical Bulletin, No 103.

Gibbs E.P. and E.C. Greiner 1994. The epidemiology of bluetongue. Comparative lmmunology, Microbiology and Infectious Diseases, **17**: 207-220.

Gillespie J.H., D.H. Schlafer, R.H. Foote, S. Quick, E. Dougherty, I. Schiff and S. Allen 1990. Comparison of persistence of seven bovine viruses on bovine embryos following in vitro exposure. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift, **97**: 65-68.

Goldsmit L. and E. Barzilai 1968. An improved method for the isolation and identification of bluetongue virus by intravenous inoculation of embrionated chicken eggs. Journal of Comparative Pathology **78**: 477-487.

Gould A.R. 1987. The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype 1 RNA 3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and the USA and with other Orbivirus isolates. Virus Research, **7**: 169-183.

Gould A.R. 1988. The use of recombinant DNA probes to group and type Orbiviruses. A comparison of Australian and South African isolates. Archives of Virology, **99**: 205-220.

Hare W.C.D., A.J. Luedke, F.C. Thomas, R.A. Bowen, E.L. Singh, M.D. Eaglesome, C.C.B. Randall and A. Bielanski 1988. Nontransmission of the bluetongue virus by embryos from bluetongue virus-infected sheep. American Journal of Veterinary Research, **49**: 468-472.

Hernandez A.J., M.D. Salman, T.E. Walton, T.J. Raich, M.C. Pujol, J. Mason and E.C. Greiner 1994. Epidemiological and entomological aspects of bluetongue in cattle. Veterinaria Mexico, **25(3)**: 227.

Hoff G.L. and D.M. Hoff 1976. Bluetongue and epizootic haemorrhagic disease: A review of these diseases in non domestic artiodactyls. Journal of Zoo Animal Medicine, **7**: 26-30.

Holbrook F.R. 1985. Research on the control of bluetongue in livestock by vector suppression. *In:* Barber T.L. and Jochim M.M., (eds). Bluetongue and Related Orbiviruses. New York: Alan Liss, Inc.

Homan E.J., L. Claudette, L.H. Thompson, C.H. Barreto, M.T. Oviedo, E.P.J. Gibbs and E.C. Greiner 1990. Epidemiologic study of bluetongue viruses in Central America and the Caribbean: 1986-1988. American Journal Veterinary Research, **51**: 1089-1094.

Hubschle O.J.B., R.J. Lorenz and K.D. Matheka 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bluetongue virus antibodies. American Journal of Veterinary Research, **42**: 61-65.

Huismans H. and B.J. Erasmus 1981. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, **48**: 51-58.

Huismans H. and A.A. Van Dijk A.A. 1990. Bluetongue virus structural components. Current Topics in Microbiology and Immunology, **162**: 21-41.

Jeggo M.H. and R.C. Wardley 1985. Bluetongue vaccine: Cells and/or antibodies.Vaccine, **3**: 57-58.

Kitano Y., S. Yamashita and K. Makinoda 1994. A congenital abnormality of calves, suggestive of a new type of arthropod borne virus infection. J. Comp. Pathol., **111(4)**: 427-437.

Luedke A.J., J.G. Bowne, M.M Jochim and C. Doylec 1964. Clinical and pathologic features of bluetongue in sheep. American Journal of Veterinary Research, **25**: 963-970.

Luedke A.J., M.M. Jochim, J.G. Bowne and R.H. Jones 1970. Observations on latent bluetongue virus infection in cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association, **156**: 1871-1879.

Luedke A.J., M.M. Jochim and R.H. Jones 1977. Bluetongue in cattle: Effects of calves previously infected in utero. American Journal of Veterinary Research, **38**: 1697-1700.

Luedke A.J., M.M. Jochim and R.H. Jones 1977. Bluetongue in cattle: Repeated exposure of two immunologically tolerant calves to bluetongue virus by vector bites. American Journal of Veterinary Research, **38**: 1701-1703.

MacColl K.A. and A.R. Gould 1994. Bluetongue virus infection in sheep: haematological changes and detection by polymerase chain reaction. Aust. Vet. J., **71(4)**: 97-101.

MacLachlan N.J., G. Jagels, P.V. Rossito, P.F. Moore and H.W. Heidner 1990. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. Veterinary Pathology, **27**: 223-229.

MacLachlan N.J. 1994. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, **17**: 197-206.

Mecham J.O., V.C. Dean, J.G. Wigington and R.A. Nunamaker 1990. Detection of bluetongue virus in *Culicoides variipennis* (Diptera: *Ceratopogonidae*) by an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. Journal of Medical Entomology, **27**: 602-606.

Mellor P.S. and D.M. Jennings 1988. British vectors of bluetongue virus. *In:* Roy P. and Osburn B.I. (eds). Orbivirus and Birnavirus, pp. 12-21.

Mellor P.S. 1990. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *In:* Roy P. and Gorman B.M. (eds). Bluetongue Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 162. Berlin: Springer-Verlag.

Mellor P.S. 1994. Bluetongue. State Veterinary Journal., **4(1)**: 7-10.

Mellor P.S. 1996. *Culicoides*: vectors, climate change and disease risk. Review of Medical and Veterinary Entomology, **84**: 325-330.

Mellor P.S. and J. Boorman 1995. The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. Ann Trop Med Parasitol., **89(1)**: 1-15.

Mertens P.P.C., S. Pedley, J. Cowley, J.N. Burroughs, A.H. Corteyn, M.H. Jeggo, D.M. Jennings and B.M. Gorman 1989. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid protein VP2 and VP5 in determination of virus serotype. Virology, **170**: 561-565.

Metcalf H.E. and M.D. McElvaine 1995. Risk of introducing exotic disease through importation of animals and animal products. Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties, **14(4)**: 951-956.

Mo C.L., L.H. Thompson, E.J. Homan, M.T. Oviedo, E.C. Greiner, J. Gonzalez and M.R. Saenz 1994. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. Interamerican Bluetongue Team. Am. J. Vet. Res., **55(2)**: 211-215.

Osburn B.I., 1994. The impact of bluetongue virus on reproduction. Comparative Immunology and Microbiologyof Infectious Diseases, **17**: 189-196.

Osburn B.I. 1994. Bluetongue virus. Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice, **10(3)**: 547-560.

Osburn B.I., I. Arabaib and C. Schore 1995. Comparison of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease complex. Bovine Practitioner, **29**: 106-109.

Ozawa Y. 1985. Bluetongue and related Orbiviruses: Overview of the world situation. *In:* Barber T.L. and Jochim M.M., (eds). Bluetongue and Related Orbiviruses. New York: Alan R. Liss.

Parsonson I.M. 1990. Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. *In:* Roy P. and Gorman B.M. (eds). Bluetongue Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 162. Berlin: Springer-Verlag.

Parsonson I.M., A.J. Luedke., T.L. Barber and T.E. Walton 1994. Bluetongue virus infection in pregnant ewes. Am. J. Vet. Res., **55(5)**: 666-669.

Parsonson I.M. and K.A. McColl 1995. Retrospective diagnosis of bluetongue virus in stored frozen tissue samples using PCR. Veterinary Microbiology, **46**: 143-149.

Parsonson I.M., L.H. Thompson and T.E. Walton 1994. Experimentally induced infection with bluetongue virus serotype 11 in cows. Am. J. Vet. Res., **55(11)**: 1529-1534.

Pedley S., M.E. Mohamed and P.P.C. Mertens 1988. Analysis of genome segments from six different isolates of bluetongue virus using RNA-RNA hybridisation: A generalised coding assignment for bluetongue viruses. Virus Research, **10**: 381-390.

Pini A. 1976. A study on the pathogenesis of bluetongue: Replication of the virus in the organs of infected sheep. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, **43**: 159-164.

Pini A., W. Coackley and H. Ohder 1966. Concentration of bluetongue virus in experimentally infected sheep and virus identification by immunofluorescence technique. Archiv fur Gesamte Virusforschung, **18**: 385-390.

Poli G., J. Stott, Y.S. Liu and J.S. Manning 1982. Bluetongue virus: Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, immunodiffusion, and serum neutralization for detection of viral antibodies. Journal of Clinical Microbiology, **15**: 159-162.

Pritchard L.I., A.R. Gould, W.C. Wilson, L. Thompson, P.P. Mertens and A.M. Wade Evans 1995. Complete nucleotide sequence of RNA segment 3 of bluetongue virus serotype 2 (Ona-A). Phylogenetic analyses reveal the probable origin and relationship with other orbiviruses. Virus-Res., **35(3)**: 247-261.

Roberts D.H., M.H. Lucas and R.A. Bell 1993. Animal and animal product importation and the assessment of risk from bluetongue and other ruminant Orbiviruses. British Veterinary Journal, **149**: 87-99.

Roeder P.L. and W.P. Taylor 1991. Failure to establish congenital bluetongue virus infection by infecting cows in early pregnancy.The Veterinary Record, **128**: 301-304.

Roy P. 1989. Bluetongue virus genetics and genome structure. Virus Research, **13**: 179-206.

Roy P. 1995. Synthesis of particulate structures as bluetongue virus vaccine and their use as multiple immunogen delivery systems. Bulletin de l'Institut Pasteur, France, **93(1)**: 3-20.

Roy P., D.H.L. Bishop, H. LeBlois and B.J. Erasmus 1994. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence of homologous and partial heterologous protection. Vaccine, **12(9)**: 805-811.

Roy P., T. Urakawa, A.A. Van Dijk and B.J. Erasmus 1990. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. Journal of Virology, **64**: 1498-2003.

Sellers R.F. 1975. Bluetongue in Cyprus. Australian Veterinary Journal, **51**: 198-203.

Sellers R.F. 1981. Bluetongue and related diseases. *In:* Gibbs E.P.J., (ed.). Virus Diseases of Food Animals: A World Geography of Epidemiology and Control. London, Academic Press.

Sharifah S.H., M.A. Ali, G.P. Gard and I.G. Polkinghorne 1995. Isolation of multiple serotypes of bluetongue virus from sentinel livestock in Malaysia. Tropical Animal Health and Production. **27(1)**: 37-42.

Tabachnick W.J. 1996. Culicoides variipennis and bluetongue-virus epidemiology in the United States. Annual Review of Entomology, **41**: 23-43.

Taylor W.P. 1987. Monitoring systems for bluetongue in mammalian hosts. *In:* Taylor W.P., (ed). Bluetongue in the Mediterranan region. Luxembourg, Commission of the European Communities, pp. 79-83.

Taylor W.P. and P.S. Mellor 1994. Distribution of bluetongue virus in Turkey, 1978-81. Epidemiol. Infect., **112(3)**: 623-633.

Venter G.J. and R. Meiswinkel 1994. The virtual absence of *Culicoides imicola* (Diptera*: Ceratopogonidae*) in a light-trap survey of the colder, high-lying area of the eastern Orange Free State, South Africa, and implications for the transmission of arboviruses. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, **61(4)**: 327-340.

Verwoerd D.W. and B.J. Erasmus 1994. Bluetongue. *In:* J.A.W. Coetzer, G.R. Thompson and R.C. Tustin, (eds.), Infectious disease of Livestock, vol.1, Oxford University Press, Southern Africa.

Wade Evans A.M., P.P.C. Mertens and C.J. Bostock 1990. Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. Journal of Virological Methods, **30**: 15-24.

Wade Evans and P.P.C. Mertens 1990. Expression of the outer capsid proteins of bluetongue virus using vaccinia virus recombinant. 8th International Congress of Virology, Berlin, 44 W16-005.

Ward M.P. 1994. The epidemiology of bluetongue virus in Australia a review. Aust. Vet. J., **71(1)**: 3-7.

Ward M.P., I.A. Gardner and M. Flanagan 1995. Evaluation of an agar gel immuno-diffusion test to detect infection of cattle with bluetongue viruses in Queensland, Australia. Vet. Microbiol., **45(1)**: 27-34.

White J.R. 1994. Validation of a quantitative Elisa for comparison of monoclonal antibody affinities for isolates of bluetongue virus. J. Immunol. Methods, **177(1-2)**: 79-88.

Wilbur L.A., J.F. Evermann, R.L. Levings, I.R. Stoll, D.E. Starling, C.A. Spillers, G.A. Gustafson and A.J. McKeirnan 1994. Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. Journal of the American Veterinary Medical Association, **204(11)**: 1762-1765.

Wirth W.W. and A.L. Dyce 1985. The current taxonomic status of the *Culicoides* vectors of bluetongue viruses. *In:* Barber T.L., Jochim M.M. and Osburn B.I., (eds). Bluetongue and Related Orbiviruses. New York: Alan R. Liss.