

## Immunità cellulo-mediata in bovini infettati sperimentalmente con il virus della bluetongue sierotipo 2

C.E. Di Francesco, A. Leone, V. Lombardi, M. Luciani & C. Paladini

### Riassunto

Scopo del lavoro è studiare l'immunità cellulo-mediata in animali infettati con il sierotipo 2 del virus della bluetongue utilizzando il test di stimolazione linfocitaria mediante riduzione del sale 3-(4,5, dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) e la quantificazione sierica del  $\gamma$ -interferon mediante un kit ELISA. Come risultato dell'infezione, sebbene gli animali sviluppino una risposta umorale producendo anticorpi neutralizzanti, il test MTT non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra gli animali infettati ed il controllo. Nel corso della sperimentazione livelli costanti di  $\gamma$ -interferon sono stati rilevati nel siero degli animali infetti. I risultati del lavoro sono discussi.

### Parole chiave

Bluetongue - Bovino - Gamma interfero-Immunità cellulo-mediata - Test MTT.

### Introduzione

La bluetongue (BT) o febbre catarrale degli ovini è una malattia infettiva, non contagiosa, trasmessa da insetti vettori del genere *Culicoides* che colpisce i ruminanti domestici e selvatici e si manifesta clinicamente soprattutto negli ovini. L'agente eziologico è un virus appartenente alla famiglia *Reoviridae*, genere *Orbivirus* di cui attualmente si conoscono 24 sierotipi (5, 14).

Essendo una malattia trasmessa da vettori, la durata ed il titolo della viremia nell'ospite vertebrato sono essenziali nella trasmissione dell'infezione (15). Peculiarità del virus della bluetongue (BTV) è quella di localizzarsi tra le invaginazioni della membrana eritrocitaria e stabilire quindi una stretta correlazione con i globuli rossi delle specie sensibili (1, 3, 4, 21).

Questo, se da un lato lo rende meno attaccabile dal sistema immunitario, dall'altro rende la sua permanenza in circolo fortemente dipendente dal tempo di emivita dei globuli rossi. Nel bovino i globuli rossi hanno una emivita che può durare fino a 120 giorni (22) e pertanto in questa specie il virus ha la possibilità di rimanere a lungo in circolo.

Recenti studi, condotti su più di 500 bovini infettati naturalmente e sperimentalmente, indicano che, fino al 63° giorno dall'infezione, la probabilità di rilevare viremia è superiore al 99% (2, 31). Nei caprini e negli ovini infettati sperimentalmente con il BTV la viremia è stata rilevata rispettivamente fino al 47° e al 54° giorno successivo all'infezione (19).

Come la maggior parte delle infezioni virali an-

che quella con BTV è capace di stimolare una risposta immunitaria in grado di proteggere completamente l'animale da una successiva infezione con il sierotipo omologo; sicuramente l'immunità umorale gioca un ruolo importante in questo aspetto.

Infatti, animali con anticorpi neutralizzanti, quando infettati con il sierotipo omologo, non manifestano sintomatologia e non presentano titoli virali o, se li presentano, sono notevolmente ridotti e comunque poco importanti dal punto di vista epidemiologico (28, 33, 34).

Poco si conosce invece del ruolo rivestito dalla risposta immunitaria cellulo-mediata (ICM) nelle infezioni da BTV. Reazioni immunologiche di tipo cellulo-mediato, in seguito alla somministrazione di virus vivo, sono state evidenziate nei topi (17) e supposte nelle pecore e nei bovini dove la protezione è stata dimostrata in assenza di anticorpi sieroneutralizzanti (9, 13, 16, 18, 32). La risposta di tipo cellulare è stata inoltre ipotizzata per spiegare l'assenza di quadri clinici nei bovini infetti da BTV (6, 7, 9, 13).

Scopo del presente lavoro è quello di valutare l'ICM in bovini infettati sperimentalmente con il BTV sierotipo 2 (BTV-2).

## Materiali e metodi

### *Virus*

Per l'infezione sperimentale degli animali è stato impiegato un ceppo di campo di BTV-2 isolato dalla milza di una pecora morta per bluetongue nel corso dell'epidemia del 2000 in Sardegna. L'antigene virale utilizzato per il test di stimolazione linfocitaria è stato ottenuto dal ceppo sudafriicano attenuato di BTV-2 fornito da Onderstepoort Veterinary Institute (OVI), South Africa, laboratorio di referenza per la BT dell'OIE (*Office International des Epizooties: World Organisation for Animal Health*).

### *Animali*

Sono state utilizzate cinque bovine di età compresa tra 6 e 9 anni, sierologicamente negative nei confronti del BTV, stabulate in un locale a prova di *Culicoides*.

Quattro animali sono stati infettati, per via sottocutanea, con 2 ml di sospensione virale di BTV-2 contenente  $2 \times 10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub> (23), un quinto animale è stato utilizzato come controllo negativo. Da ogni animale sono stati prelevati 40 ml di sangue intero in eparina e 10 ml di sangue senza anticoagulante (siero).

Il sangue eparinato è stato raccolto prima dell'infezione e successivamente una volta alla settimana per 11 settimane.

Il sangue senza eparina è stato raccolto al momento dell'infezione, dopo 3, 6 e 9 ore e due volte alla settimana per undici settimane.

I campioni di sangue intero sono stati processati immediatamente dopo il prelievo mentre i campioni di siero sono stati aliquotati e stoccati alla temperatura di -20°C fino al momento dell'utilizzo.

### *Test di stimolazione antigenica in "vitro"*

#### *Separazione linfocitaria*

Il sangue intero di ciascun animale è stato diluito 1:4 in lysing buffer pH 7,2 (TRIS 0,017 M e Ammonio Cloruro 0,144 M) e quindi centrifugato a 200 g per 10 minuti a 4°C.

Il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato sospeso in 45 ml di RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (RPMI-1640 Medium Modified) e sottoposto a due lavaggi con centrifugazione a 200 g per 10 minuti a 4°C.

Il pellet finale è stato risospeso in 5 ml di RPMI completo (20% di siero fetale bovino, glutammina 2 mM, anfotericina B, penicillina e streptomina 100x [25 µg/ml di anfotericina B, 10.000 UI/ml di penicillina, 10 mg/ml di streptomina] e gentamicina [50 mg/ml di Gentamicin Sulphate So-

lution]).

Le cellule, quindi, sono state distribuite in micropiastre a 96 pozzetti nella quantità di 250 000 cellule per pozzetto ed incubate per 2 ore a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>.

#### Preparazione dell'antigene

Monostrati di cellule Vero sono stati infettati con una sospensione virale di BTV-2 con titolo  $\geq 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml e lasciata adsorbire per 1 ora a 37°C. In seguito è stato aggiunto terreno modified Eagle's medium (MEM) addizionato del 10% di siero fetale bovino.

Una volta raggiunto il 90% di effetto citopatico (ECP), il surnatante è stato raccolto e centrifugato a 500 g per 30 minuti a 4°C.

Il pellet, sospeso in una soluzione di phosphate buffered saline (PBS) pH 7,2 e sarcosyl 30% (N-lauroylsarcosine sodium salt solution), è stato sottoposto a tre cicli di sonicazione con un'ampiezza di 300 W. La sospensione è stata quindi centrifugata a 10 000 g per 10 minuti a 4°C, il surnatante è stato stratificato su un gradiente di saccarosio al 40% e centrifugato a 100 000 g per 2 ore a 4°C. Il pellet è stato sospeso in PBS (pH 7,2), sottoposto a sonicazione a 300 W e conservato a -70°C. La concentrazione proteica dell'antigene è stata misurata con il metodo della determinazione dell'acido bicinconinico.

#### Test MTT

La stimolazione linfocitaria è stata misurata mediante la tecnica di riduzione del sale tetrazolio [3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] o MTT come descritto da Mosmann (23) e modificato da Denizot e Lang (8). In ogni micropiastre i linfociti di ciascun campione sono stati stimolati con l'antigene virale in esame alla concentrazione proteica di 2,2 µg/ml e con il mitogeno aspecifico Concanavalina A (ConA) alla concentrazione di 10 µg/ml (8, 23) utilizzan-

do per ognuno 5 replicati. Come controllo negativo sono stati utilizzati 5 replicati di linfociti non stimolati.

Dopo 24 ore di incubazione a 37° C al 5% di CO<sub>2</sub>, le cellule sono state messe a contatto con 3 mg/ml di sale MTT e le piastre nuovamente incubate per 3 ore alle stesse condizioni.

Dopo centrifugazione a 67 g per 5 minuti, il sale MTT è stato solubilizzato aggiungendo isopropanolo assoluto e ponendo le piastre in agitazione per 5 minuti.

La reazione è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm.

I risultati sono stati espressi come differenza tra la media delle densità ottiche (OD) dei replicati dei linfociti stimolati e la media delle densità ottiche dei replicati dei controlli negativi.

#### Analisi statistica

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati i valori di densità ottica tal quali.

Il confronto tra le medie delle densità ottiche tra i linfociti stimolati con la ConA ed i linfociti non stimolati e tra i linfociti stimolati con l'antigene virale e i linfociti non stimolati per ciascun animale nell'arco della sperimentazione, è stato effettuato attraverso l'impiego del test non parametrico di Wilcoxon per campioni dipendenti.

Per il confronto delle medie delle densità ottiche tra i linfociti stimolati con l'antigene virale in ciascun animale infetto e nell'animale controllo nell'arco della sperimentazione è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney per campioni indipendenti.

Lo stesso test è stato applicato anche per il confronto tra le medie delle densità ottiche dei linfociti stimolati con la ConA in ciascun animale infetto e nell'animale controllo (30).

#### Dosaggio quantitativo del $\gamma$ -interferon

Il dosaggio del  $\gamma$ -interferon è stato effettuato con

il Kit BioX Gamma Interferon ELISA secondo le indicazioni della ditta.

### *Ricerca degli anticorpi*

I campioni di siero sono stati saggiati per la presenza di anticorpi nei confronti di BTV-2 mediante la tecnica della neutralizzazione virale (VN) (12, 29). I controlli positivi e negativi per la VN sono stati forniti dall'OVI.

Cinquanta  $\mu$ l di ciascun siero diluito in base 2, da 1:10 a 1:1280, sono stati miscelati con un uguale volume di BTV-2 (100 TCID<sub>50</sub>). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>, 100  $\mu$ l di terreno MEM addizionato di antibiotici (penicillina 100 UI/ml, streptomycina 100  $\mu$ g/ml, gentamicina 5  $\mu$ g/ml e nistatina 50 UI/ml), siero fetale bovino (3%) e contenente 10<sup>4</sup> cellule Vero sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e quindi le piastre incubate in termostato nelle stesse condizioni. La lettura è stata effettuata al microscopio invertito dopo 4-6 giorni.

I sieri in grado di neutralizzare più del 50% dell'effetto citopatico del virus alla diluizione uguale o superiore a 1:10 sono stati considerati positivi. Il titolo del siero è stato calcolato come la più alta diluizione in grado di inibire almeno il 50% dell'effetto citopatico virale.

### *Isolamento virale*

Su ciascun campione di sangue intero è stato effettuato anche l'isolamento virale su uova embrionate di pollo e cellule Vero secondo quanto descritto dal manuale OIE (Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals) (10, 11, 25, 29, 36). I campioni di sangue sono stati lavati tre volte in PBS contenente antibiotici (penicillina 100 UI/ml, streptomycina 100  $\mu$ g/ml, gentamicina 5  $\mu$ g/ml e nistatina 50 UI/ml) mediante centrifugazione a 230 g per 15 minuti. Il pellet ottenuto quindi è stato sospeso in tampone peptone lattosio (BLP) e sottoposto a sonicazione con un'am-

piezza di 300W. La sospensione è stata successivamente centrifugata a 1250 g per 15 min e 0,1 ml del surnatante inoculato per via endovenosa in uova embrionate di pollo di 9-12 giorni. Le uova sono state incubate in termostato a 34°C e controllate ogni giorno mediante lampada sperauova. La morte delle uova avvenuta nelle prime 24 ore è stata considerata non specifica. Gli embrioni morti tra il 2° e 7° giorno sono stati raccolti e conservati a 4°C, mentre quelli ancora vivi al 7° giorno sono stati sacrificati. Il cervello, il cuore, il fegato e la milza degli embrioni sono stati omogeneizzati in polvere di quarzo sterile e centrifugati a 1250 g per 20 minuti a 4°C. Il surnatante è stato inoculato in flasks contenenti monostrati confluenti di cellule Vero in terreno MEM addizionato di antibiotici e incubate a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. Le flasks sono state controllate giornalmente per 7 giorni. Il 7° giorno, in assenza di ECP, il monostrato cellulare è stato grattato e centrifugato a 203 g per 15 minuti. Il surnatante è stato quindi inoculato in una nuova flask contenente monostrati confluenti di cellule Vero come precedentemente descritto. La presenza e l'identificazione del BTV nei monostrati con ECP e in quelli del secondo passaggio è stata evidenziata con immunofluorescenza (IF) utilizzando un anticorpo monoclonale (IgG<sub>2a</sub> anti-K) specifico per la proteina strutturale VP7 e un anti-mouse IgG coniugato con isotiocianato di fluoresceina (FITC). Il virus è stato successivamente tipizzato mediante virus-tipizzazione (VT) utilizzando antisieri BTV sierotipo-specifici secondo quanto descritto dal manuale OIE (25).

## **Risultati**

### *Valutazione della stimolazione linfocitaria mediante test MTT*

Nelle Figure 1-5 sono riportati i risultati delle prove di stimolazione linfocitaria sia con l'antigene

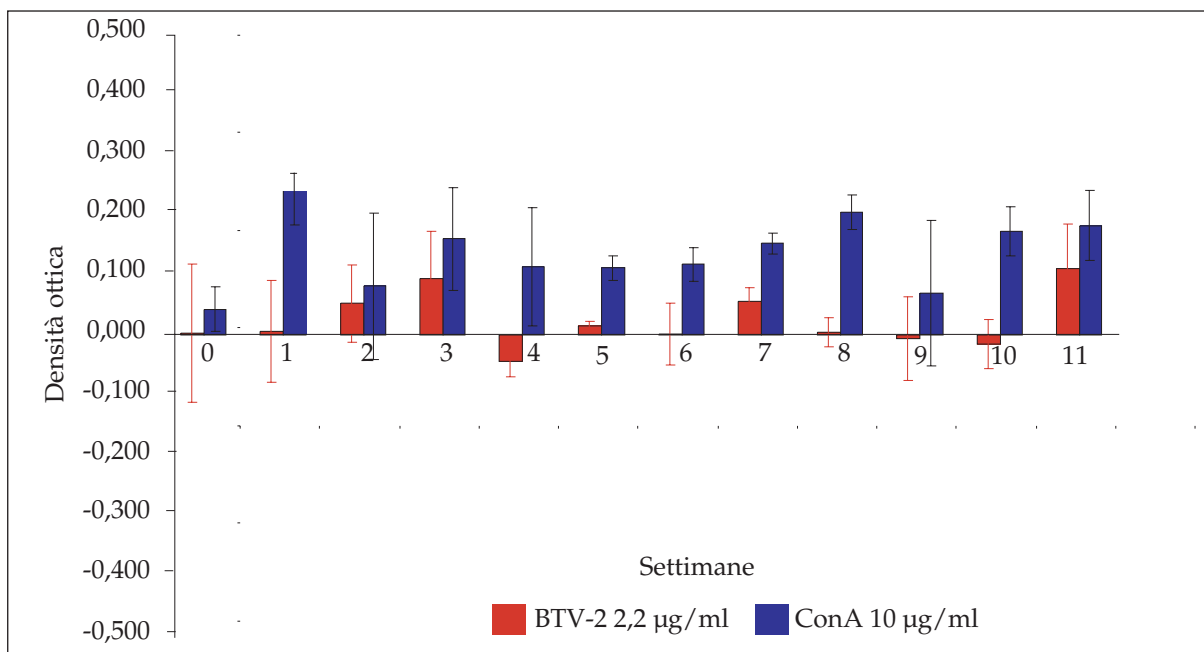


Figura 1  
Valori medi di densità ottica riscontrati nel test MTT e relative deviazioni standard in linfociti stimolati con l'antigene virale e la ConA. I risultati sono espressi come la differenza tra le medie dei valori di densità ottica dei linfociti stimolati e dei linfociti non stimolati: Animale 1.

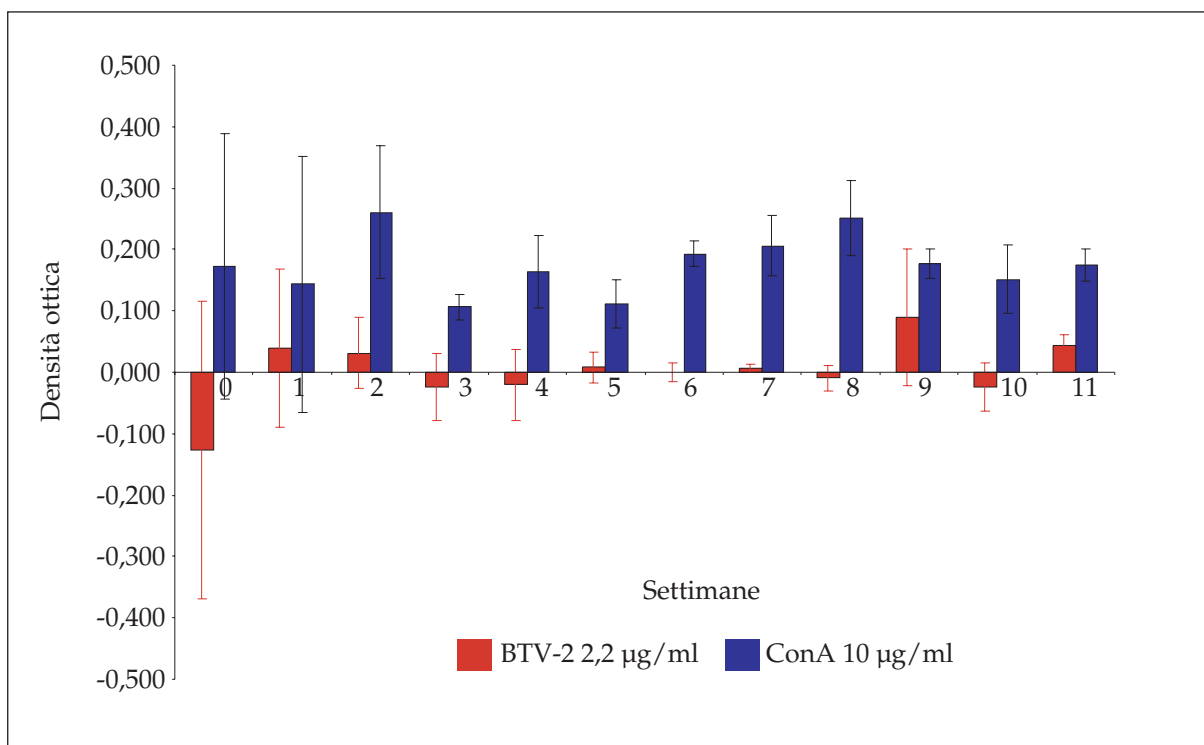


Figura 2  
Valori medi di densità ottica riscontrati nel test MTT e relative deviazioni standard in linfociti stimolati con l'antigene virale e la ConA. I risultati sono espressi come la differenza tra le medie dei valori di densità ottica dei linfociti stimolati e dei linfociti non stimolati: Animale 2.

virale sia con la ConA.

In Tabella I sono riportati i risultati del test di Wilcoxon tra i linfociti stimolati con la ConA e i linfociti non stimolati in ciascun animale nell'arco della sperimentazione. Per tutti gli animali la differenza risulta statisticamente significativa.

In Tabella II sono riportati i risultati del test di Wilcoxon tra i linfociti stimolati con l'antigene virale e i linfociti non stimolati in ciascun animale nell'arco della sperimentazione. Per tutti gli animali la differenza non risulta statisticamente significativa.

Il confronto tra la media delle densità ottiche dei linfociti stimolati con ConA in ciascun animale infetto ed il controllo è riportato in Tabella III. In nessuno degli animali la differenza risulta statisticamente significativa secondo il test di Mann-Whitney.

Il confronto tra la media delle densità ottiche dei linfociti stimolati con l'antigene virale in ciascun animale infetto ed il controllo è riportato in Ta-

bella IV. In nessuno degli animali la differenza risulta statisticamente significativa secondo il test di Mann-Whitney.

#### *Livelli di $\gamma$ -interferon circolante*

I risultati del dosaggio quantitativo del  $\gamma$ -interferon sono rappresentati nella Figura 6.

Gli animali infettati hanno mostrato una produzione di  $\gamma$ -interferon costante di circa 2,5 UA/ml dal giorno 0 fino al 15° giorno dopo l'infezione. In seguito, il livello della citochina è drasticamente diminuito fino a valori inferiori a 0,5 UA/ml.

Nell'animale usato come controllo è stato osservato lo stesso andamento anche se i livelli di  $\gamma$ -interferon, compresi tra 0,8 e 5,2 UA/ml, sono stati più elevati.

#### *Ricerca degli anticorpi*

I risultati della VN sono riportati nella Figura 7. Gli anticorpi neutralizzanti sono stati evidenziati a partire dalla terza settimana dopo l'infezione in tutti gli animali infetti fino alla fine della sperimentazione. Il picco anticorpale è stato raggiunto nel cor-

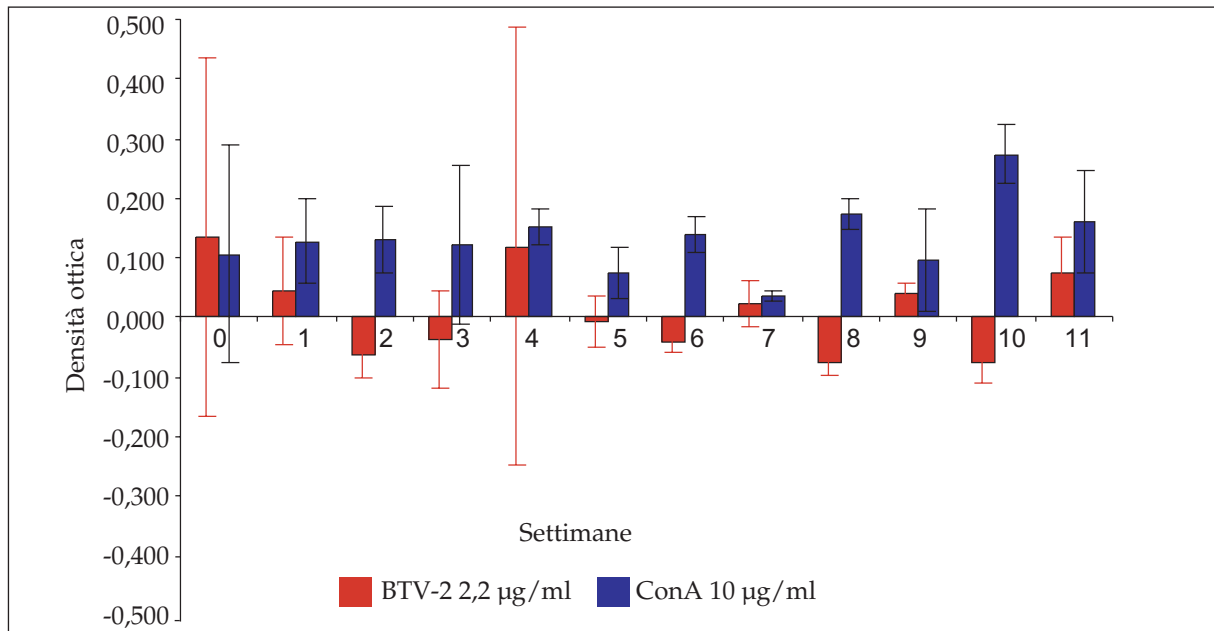


Figura 3

Valori medi di densità ottica riscontrati nel test MTT e relative deviazioni standard in linfociti stimolati con l'antigene virale e la ConA. I risultati sono espressi come la differenza tra le medie dei valori di densità ottica dei linfociti stimolati e dei linfociti non stimolati. Animale 3.

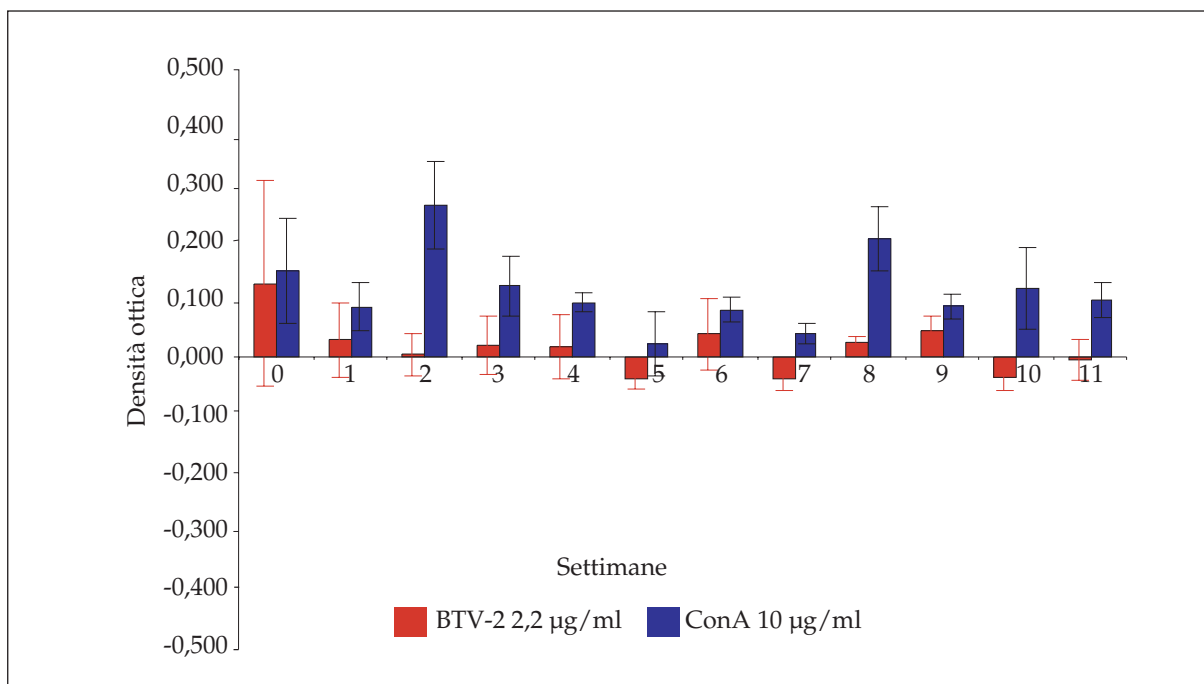


Figura 4  
Valori medi di densità ottica riscontrati nel test MTT e relative deviazioni standard in linfociti stimolati con l'antigene virale e la ConA. I risultati sono espressi come la differenza tra le medie dei valori di densità ottica dei linfociti stimolati e dei linfociti non stimolati: Animale 4.

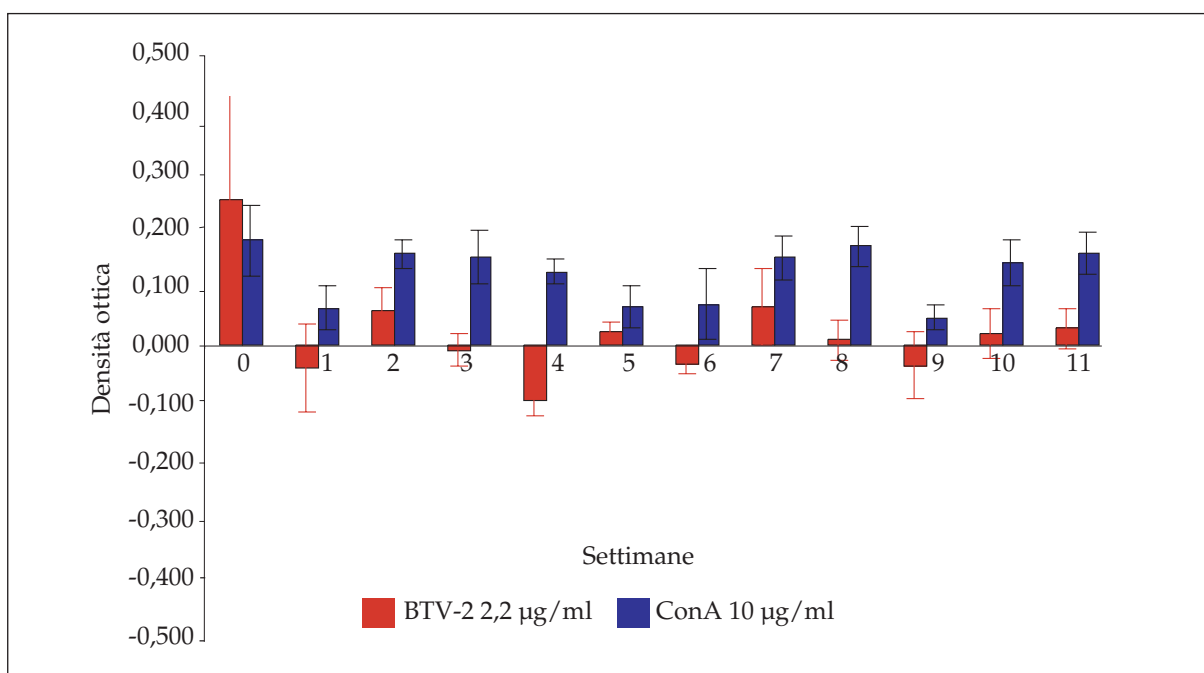


Figura 5  
Valori medi di densità ottica riscontrati nel test MTT e relative deviazioni standard in linfociti stimolati con l'antigene virale e la ConA. I risultati sono espressi come la differenza tra le medie dei valori di densità ottica dei linfociti stimolati e dei linfociti non stimolati: Animale Controllo.



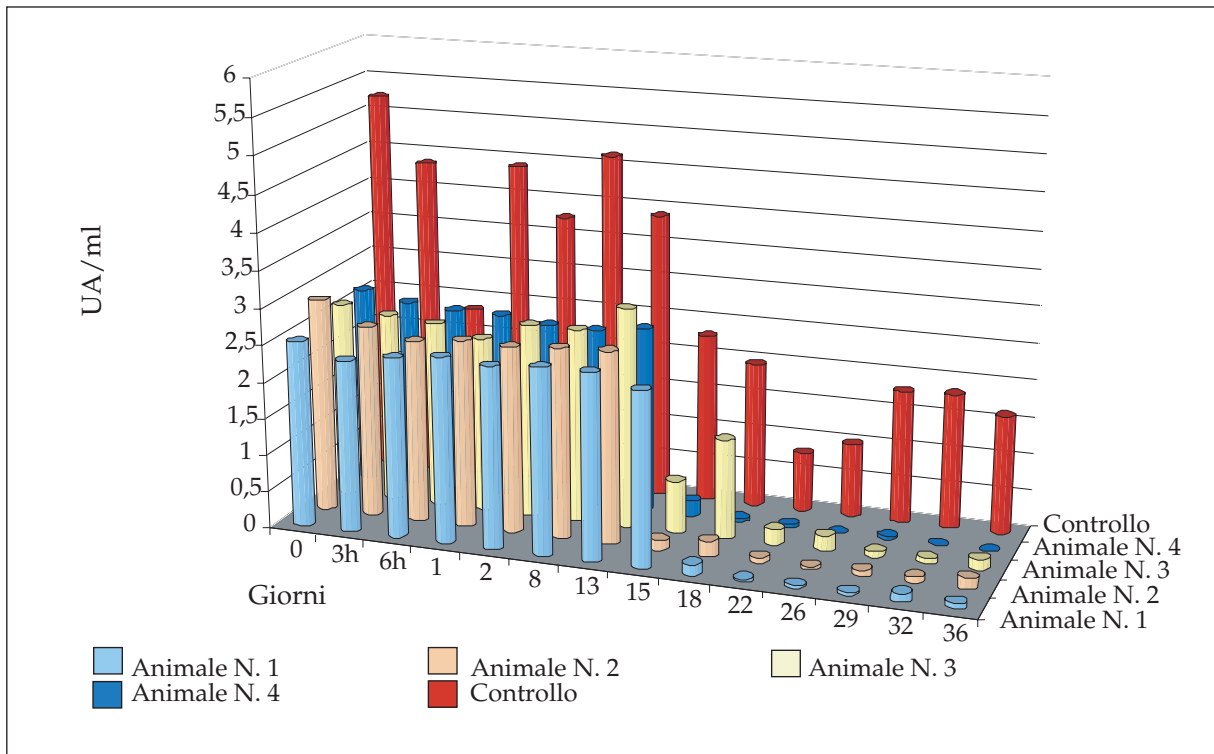


Figura 6  
Livelli di  $\gamma$ -interferon nei campioni di siero negli animali in sperimentazione.

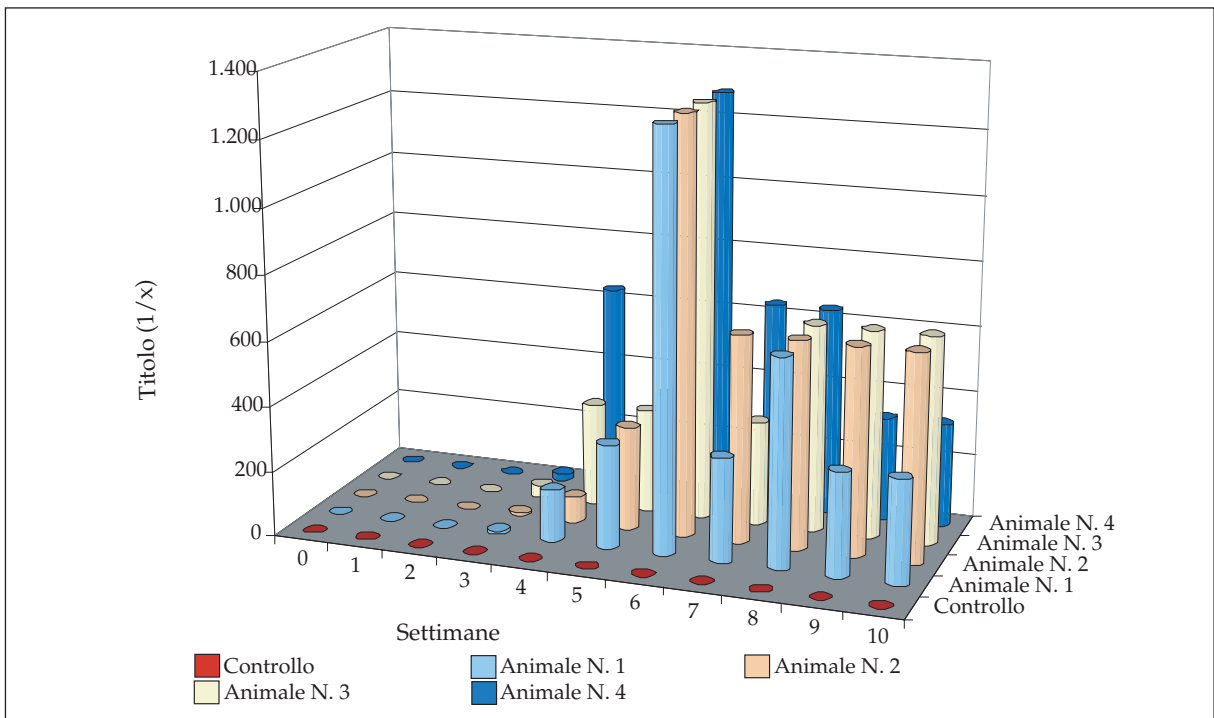


Figura 7  
Risultati del test di sieroneutralizzazione fino alla decima settimana post infezione negli animali in sperimentazione.



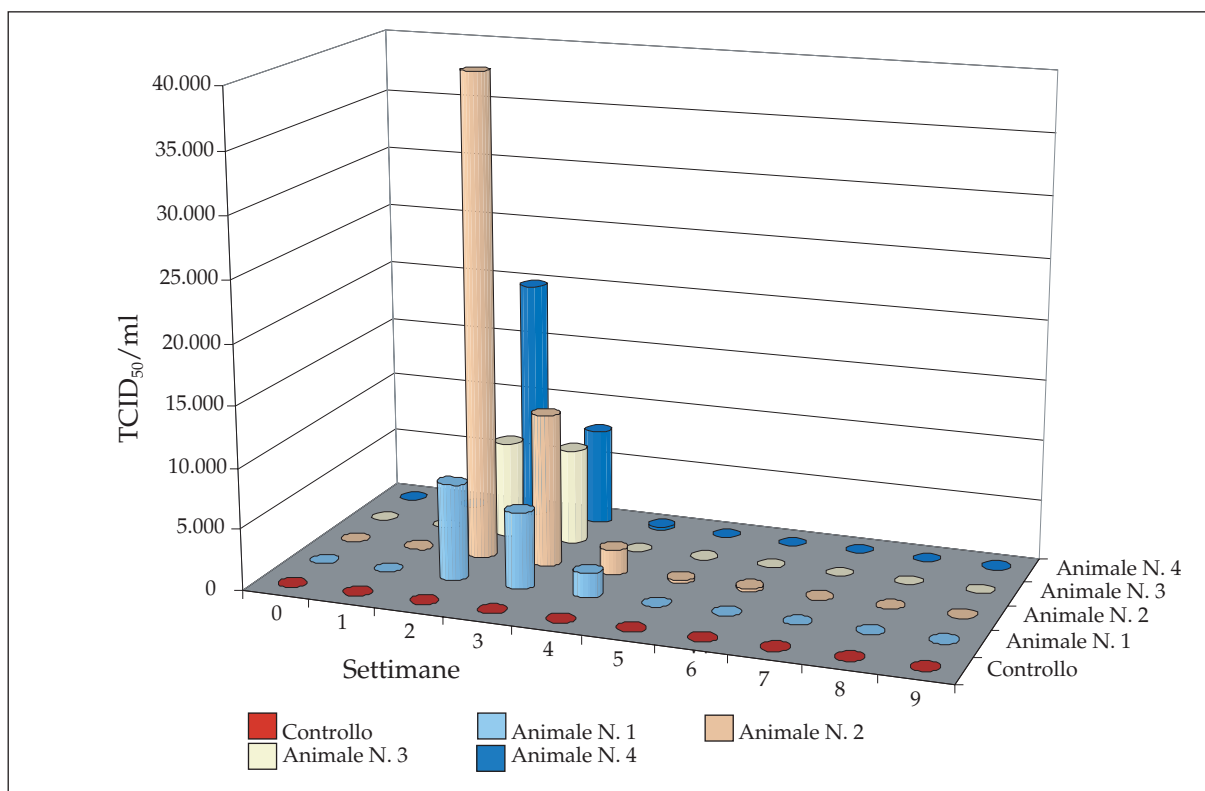


Figura 8  
Isolamento virale: valori di TCID<sub>50</sub>/ml negli animali in sperimentazione.

so della sesta settimana dopo l'infezione con un titolo per tutti gli animali di 1:1280. L'animale usato come controllo non ha mostrato anticorpi nei confronti del BTV-2 durante tutta la sperimentazione.

### Isolamento virale

I risultati della viremia sono rappresentati nella Figura 8. Gli animali infetti hanno sviluppato la massima viremia ( $10^{4,6}$  TCID<sub>50</sub>/ml) nella seconda settimana dopo l'infezione. Successivamente il titolo virale è diminuito per poi scomparire dalla quinta settimana.

L'animale di controllo non ha sviluppato viremia durante l'intero periodo della sperimentazione.

## Discussione e conclusioni

Nello studio effettuato l'ICM nei confronti di BTV-2 è stata valutata in quattro bovini infettati sperimen-

talmente, sia mediante la prova di stimolazione linfocitaria sia mediante il dosaggio di  $\gamma$ -interferon nel siero. In seguito all'infezione gli animali hanno prodotto anticorpi sieroneutralizzanti dimostrando la capacità di sviluppare una risposta immunitaria di tipo umorale; al contrario, la prova di stimolazione linfocitaria non ha evidenziato differenze nella risposta proliferativa dei linfociti nei confronti dell'antigene virale negli animali infettati rispetto a quello di controllo.

Questo risultato può essere dovuto alla particolare metodica impiegata. Il test MTT è un metodo colorimetrico che misura la proliferazione cellulare, ed è stato sviluppato come alternativa alle tecniche che richiedono l'utilizzo di radioisotopi (8). Il metodo presenta il vantaggio di essere semplice, rapido e di non richiedere apparecchiature sofisticate o reagenti costosi (23). Alcu-

ni studi hanno dimostrato, tuttavia, come il test MTT sia meno sensibile rispetto alle tecniche radioattive nella valutazione della stimolazione linfocitaria, probabilmente a causa della minore quantità nei linfociti dell'enzima mitocondriale necessario per il metabolismo del sale tetrazolio (8, 35). Inoltre la variabilità osservata nel corso della sperimentazione tra i replicati effettuati per ogni campione indica una scarsa accuratezza nella misurazione della reazione colorimetrica.

Nonostante le limitazioni tecniche del test, la significativa proliferazione delle cellule osservata e indotta da un mitogeno aspecifico come la ConA, indica come sia proprio l'antigene virale a determinare una bassa risposta proliferativa. Questo risultato potrebbe dipendere dalla dose e dal tipo di formulazione dell'antigene impiegato o dal tempo di esposizione insufficiente a stimolare nelle cellule un'attività metabolica misurabile. Tuttavia, diversi studi pubblicati hanno dimostrato come nel bovino infetto il BTV abbia un'attività soppressiva nei confronti della risposta linfocitaria all'infezione (20, 24). È probabile che tale azione nei bovini sia responsabile della prolungata viremia che si osserva in questi animali anche in presenza di anticorpi sieroneutralizzanti (9, 13).

La riduzione della risposta cellulo-mediata indotta dal BTV potrebbe giustificare anche i risultati ottenuti nella valutazione del dosaggio di  $\gamma$ -interferon in questo studio. A differenza di quanto riportato in letteratura (20, 27), negli animali infetti, la produzione di  $\gamma$ -interferon sierico è rimasta costante anche in seguito all'infezione e non è stato possibile evidenziare alcun aumento della citochina presente nel siero nelle ore e nei giorni successivi. Dal 15° giorno dopo l'infezione si osserva una drastica riduzione del livello di  $\gamma$ -interferon sierico che perdura fino al 36° giorno. I dati disponibili, tuttavia, non permettono di evidenziare un'associazione tra questo particolare andamento del-

Tabella I

Confronto tra i valori di densità ottica rilevati in linfociti stimolati con la ConA e linfociti non stimolati nei singoli animali nell'arco della sperimentazione.

Valori del test di Wilcoxon e significatività.

Animale	Test di Wilcoxon	p
N.1	-3,59	<0,05
N.2	-3,59	<0,05
N.3	-3,59	<0,05
N.4	-3,59	<0,05
Controllo	-3,59	<0,05

Tabella II

Confronto tra i valori di densità ottica rilevati in linfociti stimolati con l'antigene virale e linfociti non stimolati nei singoli animali nell'arco della sperimentazione.

Valori del test di Wilcoxon e significatività.

Animale	Test di Wilcoxon	p
N.1	-1,766	>0,05
N.2	-0,392	>0,05
N.3	-0,549	>0,05
N.4	-0,471	>0,05
Controllo	-0,746	>0,05

Tabella III

Confronto dei valori di densità ottica dei linfociti stimolati con la ConA tra gli animali infetti e l'animale controllo nell'arco della sperimentazione.

Valori del test di Mann-Whitney e significatività.

Animale	Test di Mann-Whitney	p
N.1 e Controllo	69	>0,05
N.2 e Controllo	50	>0,05
N.3 e Controllo	49	>0,05
N.4 e Controllo	65,5	>0,05

Tabella IV

Confronto dei valori di densità ottica dei linfociti stimolati con l'antigene virale tra gli animali infetti e l'animale controllo nell'arco della sperimentazione.

Valori del test di Mann-Whitney e significatività.

Animale	Test di Mann-Whitney	p
N.1 e Controllo	62	>0,05
N.2 e Controllo	64	>0,05
N.3 e Controllo	58	>0,05
N.4 e Controllo	59,5	>0,05

la produzione di  $\gamma$ -interferon e l'infezione virale. In conclusione, i risultati ottenuti nella sperimentazione riportata sono da considerare preliminari e sono necessari ulteriori approfondimenti, anche con un numero maggiore di animali infetti e animali controllo, per meglio definire il ruolo

lo dell'ICM nella patogenesi e nella protezione dei bovini nei confronti dell'infezione da BTV.

## Ringraziamenti

Si ringraziano P. Calistri, A. Conte, F. Dall'Acqua, A. De Dominicis, G. Filipponi, A. Giovannini, V. Langella, R. Lelli, R. Meiswinkel, F. Monaco, D. Nannini e G. Savini per il loro sostegno e la loro assistenza tecnica fornita durante la realizzazione di questo studio.

## Bibliografia

1. Bonneau K.R., Mullens B.A. & MacLachlan N.J. 2001. Occurrence of genetic drift and founder effect during quasispecies evolution of the VP2 and NS3/NS3A genes of bluetongue virus upon passage between sheep, cattle and *Culicoides sonorensis*. *J Virol*, **75** (17), 8298-8305.
2. Bonneau K.R., DeMaula C.D., Mullens B.A. & MacLachlan N.J. 2002. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet Microbiol*, **88** (2), 115-125.
3. Brewer A.W. & MacLachlan N.J. 1992. Ultrastructural characterization of the interaction of bluetongue virus with bovine erythrocytes in vitro. *Vet Pathol*, **29**, 356-359.
4. Brewer A.W. & MacLachlan N.J. 1994. The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. *Arch Virol*, **136**, 287-298.
5. Calistri P., Goffredo M., Caporale V. & Meiswinkel R. 2003. The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **50** (3), 132-138.
6. DeMaula D.C., Leutenegger M.C., Jutila A.M., Bonneau K.R. & MacLachlan J.N. 2002. The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology*, **296**, 330-337.
7. DeMaula D.C., Leutenegger M.C., Jutila A.M. & MacLachlan J.N. 2002. bluetongue virus-induced activation of primary bovine lung microvascular endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*, **86**, 147-157.
8. Denizot F. & Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, **89**, 271-277.
9. Ellis J.A., Luedke A.J., Davis W.C., Wechsler S.J., Mecham J.O., Pratt D.L. & Elliot J.D. 1990. T-lymphocyte subset alterations following bluetongue virus infection in sheep and cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, **24**, 49-67.
10. Foster N.M. & Luedke A.J. 1968. Direct assay for bluetongue virus by intravascular inoculation of embryonating chicken eggs. *Am J Vet Res*, **29**, 749-753.
11. Foster N.M., Luedke A.J. & Metcalf H.E. 1972. bluetongue in sheep and cattle: efficacy of embryonating chicken eggs in viral isolations. *Am J Vet Res*, **33**, 77-81.
12. Gard G.P. & Kirkland P.D. 1993. bluetongue, virology and serology. In Australian standard diagnostic techniques for animal diseases (L.A. Corner & T.J. Bagust, eds). CSIRO Information Services, 1-17.
13. Ghalib H.W., Schore C.E. & Osburn B.I. 1985. Immune response of sheep to bluetongue virus: in vitro induced lymphocyte blastogenesis. *Vet Immunol Immunopathol*, **10** (2-3), 177-188.
14. Gibbs E.P.J. & Greiner E.C. 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **17**, 207-220.
15. Hoar B.R., Carpenter T.E., Singer R.S. & Gardner I.A. 2004. Probability of introduction of exotic strains of bluetongue virus into the US and into California through importation of infected cattle. *Prev Vet Med*, **66** (1-4), 79-91.
16. Janardhana V., Andrew M.E., Lobato Z.I.P. & Coupar B.E. 1999. The ovine cytotoxic T-lymphocyte responses to bluetongue virus. *Res Vet Sci*, **67** (3), 213-221.
17. Jeggo M.H. & Wardley R.C. 1982. Generation of cross-reactive cytotoxic T-lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus

- types. *Immunology*, **45** (4), 629-635.
18. Jeggo M.H., Gumm I.D. & Taylor W.P. 1983. Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types. *Res Vet Sci*, **34** (2), 205-211.
  19. Koumbati M., Mangana O., Nomikou K., Mellor P.S. & Papadopoulos O. 1999. Duration of bluetongue viraemia and serological response in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Vet Microbiol*, **64** (4), 277-285.
  20. MacLachlan N.J., Schore C.E. & Osburn B.I. 1984. Antiviral responses on bluetongue virus inoculated bovine fetuses and their dams. *Am J Vet Res*, **45**, 1469-1473.
  21. MacLachlan N.J., Nunamaker R.A., Katz J.B., Sawyer M.M., Akita G.Y., Osburn B.I. & Tabachnick W.J. 1994. Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch Virol*, **136** (1-2), 1-8.
  22. Mellor P.S. 2001. bluetongue virus. In *Encyclopaedia of arthropod-transmitted infections of man and domesticated animals*. CABI Publishing, Wallingford, 78-83.
  23. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*, **65** (1-2), 55-63.
  24. Odeon A.C., Schore C.E. & Osburn B.I. 1997. The role of cell-mediated immunity in the pathogenesis of bluetongue virus serotype 11 in the experimental infection of vaccine/sensitized calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **20** (3), 219-232.
  25. Office International des Épizooties (OIE) 2004. bluetongue, Chapter 2.1.9. In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. 5th Ed. OIE, Paris, Vol. 1, 195-210.
  26. Reed L.J. & Muench H.A. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, **27**, 493-497.
  27. Russell H., O'Toole D.T., Bardsley K., Davis W.C. & Ellis J.A. 1996. Comparative effects of bluetongue virus infection of ovine and bovine endothelial cells. *Vet Pathol*, **33** (3), 319-331.
  28. Savini G., Monaco F., Citarella R., Calzetta G., Panichi G., Ruiu A. & Caporale V. 2003. Live modified monovalent vaccine against bluetongue virus (BTV) serotype 2: immunity studies on cows. bluetongue. In *Proc. Third International Symposium, Taormina, 26-29 October 2003, Part II*. *Vet Ital*, **40** (4), 664-667.
  29. Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M.A., Baldi L., De Santis P., Meiswinkel R. & Caporale V. 2005. bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* Complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec*, **157**, 133-139.
  30. Siegel S. & Castellan N.J. Jr. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*, 2nd Ed. McGraw-Hill, International Edition, Statistics Series, Singapore, 399 pp.
  31. Singer R.S., MacLachlan N.J. & Carpenter T.E. 2001. Maximal predicted duration of viremia in bluetongue virus infected cattle. *J Vet Diagn Invest*, **13** (1), 43-49.
  32. Stott J.L., Barber T.L., Osburn B.I. & Sawyer R. 1979. Immunologic response of sheep to an experimental inactivated bluetongue virus vaccine. *J Am Vet Med Assoc*, **175**, 611.
  33. Stott J.L. & Osburn B.I. 1990. Immune response to bluetongue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, **162**, 163-179.
  34. Verwoerd D.W. & Erasmus B.J. 1994. bluetongue. In *Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa* (J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson & R.C. Tustin, eds). Oxford University Press, Cape Town, 443-459.
  35. Wagner U., Burkhardt E. & Failing K. 1999. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. *Vet Immunol Immunopathol*, **70** (3-4), 151-159.
  36. Wechsler S.J. & McHolland L.E. 1988. Susceptibilities of 14 cell lines to bluetongue virus infection. *J Clin Microbiol*, **26** (11), 2324-2327.