

Studio sulla sicurezza ed efficacia di un vaccino ricombinante nei confronti del virus della bluetongue sierotipo 2

Giovanni Savini⁽¹⁾, Paola Nicolussi⁽²⁾, Giovanantonio Pilo⁽²⁾, Paolo Colorito⁽²⁾, Sandra Fresi⁽²⁾, Liana Teodori⁽¹⁾, Alessandra Leone⁽¹⁾, Barbara Bonfini⁽¹⁾ & Cristiana Patta⁽²⁾

Riassunto

Sette bovini, 10 pecore e 10 capre sono stati vaccinati per via sottocutanea con 5 ml di un vaccino ricombinante costituito da virioni sintetici contenenti le 4 principali proteine (VP2, VP3, VP5 e VP7) del sierotipo 2 del virus della bluetongue (BTV-2); uno stesso numero di animali e specie è stato vaccinato con 2,5 ml (dose normale) mentre in 2 bovini, 2 pecore e 2 capre è stato inoculato placebo addizionato all'adiuvante usato nel vaccino. Agli animali vaccinati con la dose normale è stato eseguito un intervento di richiamo 14 giorni dopo la prima vaccinazione ed in 8 pecore anche un terzo intervento a distanza di 4 mesi dal secondo. Un mese dopo il terzo intervento vaccinale, le 8 pecore e 4 mai venute a contatto con il virus, sono state infettate con 1 ml contenente $10^{5.8}$ TCID₅₀ di BTV-2 ceppo selvaggio. Tutti gli animali, 14 giorni dopo il primo intervento vaccinale, hanno evidenziato risposta anticorpale alla c-ELISA. Al contrario, in nessun animale si sono rilevati anticorpi neutralizzanti BTV-2. Temperature febbrili (>40°C) sono state osservate in 6 animali vaccinati e in 2 di controllo tra l'8° ed il 13° giorno dopo l'infezione (pi) con ceppo selvaggio. A partire dal 7° giorno pi, il virus è stato isolato da tutti gli animali. Non si sono evidenziate differenze significative nei parametri emo-chimici considerati così come

non è stata riscontrata alcuna interazione significativa nei gruppi in esperimento.

Parole chiave

Bluetongue, Bovini, Capre, Italia, Pecore, Vaccino.

Introduzione

Per il comparto zootecnico il virus della bluetongue (BTV) è causa di notevoli perdite economiche non solo per la gravità del quadro clinico che il virus è in grado di provocare nelle pecore (8), ma, soprattutto, per il blocco delle movimentazioni del bestiame dalle zone sospette o dichiarate infette che immediatamente viene messo in atto in presenza di infezione. Quando, alla fine del secolo scorso, un'epidemia di bluetongue colpì l'Italia e altri paesi europei (1), l'Unione europea decise di ricorrere alla vaccinazione per aumentare la popolazione immune e contenere la diffusione della malattia. A tal fine fu impiegato il vaccino vivo-modificato prodotto in Sud Africa dall'Onderstepoort Biological Products, l'unico all'epoca disponibile in commercio e da oltre quaranta anni utilizzato in Sud Africa. Sorsero subito perplessità sull'uso del ceppo vaccinale vivo, seppur modificato, sia per la possibilità di causare effetti indesiderati nell'animale vaccinato, sia per la sua potenzialità di replicare nell'organismo

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
g.savini@izs.it

(2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna 'G. Pegreffi', Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italia

raggiungendo titoli tali da infettare il vettore e, quindi, diffondere nell'ambiente. Emerse quindi l'esigenza di poter utilizzare un prodotto immunizzante diverso in grado di ovviare a tali problemi.

Un vaccino ricombinante per la bluetongue era stato sviluppato e prodotto dalla dr.ssa Polly Roy conseguendo risultati promettenti in un primo trial sperimentale effettuato in Sud Africa appena dopo la sua produzione (9, 10). Requisito fondamentale richiesto ad un vaccino è quello di evocare una risposta immune duratura in grado di proteggere l'animale in caso di contatto con ceppi patogeni dello stesso virus. L'obiettivo di questo studio è stato, pertanto, quello di testare il vaccino ricombinante prima menzionato in bovini, pecore e capre in un contesto italiano per valutarne la sicurezza e per verificarne l'efficacia della risposta immunitaria anche attraverso una prova di challenge. In questo modo è stato possibile determinare la reale capacità del vaccino di prevenire l'insorgenza clinica della malattia e di ridurre l'intensità e la durata della viremia a seguito di infezione con ceppi virulenti.

Materiali e metodi

Prova di sicurezza

Preparazione del vaccino

Per la vaccinazione degli animali è stato utilizzato il vaccino ricombinante prodotto dalla dr.ssa Polly Roy. Il vaccino era costituito da virioni sintetici contenenti le 4 principali proteine (VP2, VP3, VP5 e VP7) del sierotipo 2 del virus della bluetongue (2, 3). Le proteine, sintetizzate usando linee cellulare di Baculovirus, derivavano: la VP2 dal ceppo AcBTV2-2Sar con un titolo virale pari a 5×10^7 unità formanti placche (pfu)/ml, la VP5 da AcBTV2-5 con titolo virale di $1,8 \times 10^8$ pfu/ml, le VP3 e VP7 da AcVC3/7Dual, con un titolo di 5×10^7 pfu/ml.

Test *in vivo*

Il vaccino è stato preparato, manipolato ed inoculato negli animali da persone del gruppo di ricerca facente capo alla dr.ssa Polly Roy. Tutte le prove sugli animali sono state eseguite

conformemente alla normativa in materia di benessere animale. Per la sperimentazione sono stati utilizzati complessivamente 60 animali sieronegativi per il BTV:

- 16 bovini da carne meticci
- 22 ovini di razza sarda
- 22 capre meticce.

Ventisette di questi (7 bovini, 10 pecore e 10 capre) sono stati vaccinati per via sottocutanea con 5 ml di vaccino ricombinante pari a due volte la dose normale di inoculo; 27 (7 bovini, 10 pecore e 10 capre) con 2,5 ml e i restanti 6 (2 bovini 2 pecore e 2 capre) con placebo addizionato all'adiuvante usato nel vaccino. Il punto di inoculo per i bovini è stato la giogaia, per le pecore e per le capre la zona sottoascellare. Le prove sono state effettuate a Sassari nell'allevamento dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna in ambiente privo di *Culicoides* spp., previa autorizzazione del Ministero della Salute. A tutti gli animali, per 2 settimane, è stata misurata la temperatura rettale ed è stata effettuata una visita clinica per evidenziare l'eventuale presenza di sintomatologia o reazioni particolari.

Agli animali vaccinati con la dose normale è stato eseguito un intervento di richiamo 14 giorni dopo la prima vaccinazione e in 8 pecore anche un terzo intervento a distanza di 4 mesi dal secondo.

Prova di efficacia

Esami sierologici

Da ogni animale è stato prelevato un campione di siero prima della vaccinazione e 14, 33, 58 e 110 giorni dopo l'inoculo. I campioni di siero prelevati sono stati esaminati per la presenza di anticorpi nei confronti del BTV mediante Enzyme linked immunosorbent assay di tipo competitivo (c-ELISA) e prova di sieroneutralizzazione (SN).

c-ELISA

La prova c-ELISA ha utilizzato un kit messo a punto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise (IZS A&M) (6). L'antigene purificato è stato diluito in tampone carbonato-bicarbonato pH 9,6 e dispensato nei pozzetti di una micropiastra dove è stato lasciato adsorbire per una notte a 4°C. Dopo il

lavaggio sono stati aggiunti i sieri e l'anticorpo monoclonale marcato con perossidasi. L'avvenuto legame antigene-anticorpo è stato svelato con l'aggiunta del substrato. Sono stati considerati positivi i campioni che mostravano un valore in densità ottica minore del 35% di quella riscontrata nei pozzetti del controllo del monoclonale.

Prova di sieroneutralizzazione

La SN (12) ha consentito di definire il sierotipo e l'andamento del titolo anticorpale: in una piastra a 96 pozzetti, partendo da una diluizione iniziale di 1:10, i sieri sono stati diluiti per raddoppio e messi a contatto con 100 TCID₅₀ di virus BTV-2 preventivamente titolato. Dopo un'ora di incubazione alla temperatura di 37°C ad un'atmosfera al 5% di CO₂, per consentire l'eventuale neutralizzazione virale, ad ogni pozzetto sono state aggiunte 3×10⁵/ml di cellule Vero (*African green monkey kidney*) sospese in *minimum essential medium* (MEM) (Eurobio, Francia) contenente antibiotici: penicillina 100 UI/ml (Sigma, Germania), streptomina 100 µg/ml (Sigma), gentamicina 5 µg/ml (Sigma) e nistatina 50 UI/ml (Sigma), e 10% di siero fetale bovino (FCS) (Sigma). La lettura è stata effettuata dopo 3 giorni valutando la presenza di effetto citopatico nei pozzetti e definendo il titolo anticorpale come la più alta diluizione di siero in grado di inibire oltre il 50% l'effetto citopatico del virus. In ogni lotto di piastre sono stati inclusi il siero positivo e negativo di riferimento ed i controlli delle cellule e del virus. I sieri di controllo positivo e negativo per la SN sono stati gentilmente forniti dal *Onderstepoort Veterinary Institute* (OVI), Onderstepoort Sud Africa, laboratorio di referenza dell'*Office International des Épizooties* (OIE) per la bluetongue.

Prova di challenge

Preparazione del ceppo usato per il challenge

Il materiale utilizzato per il challenge è stato un ceppo di BTV selvaggio isolato da una milza di una pecora infetta e morta durante l'epidemia di BT del 2000 in Sardegna (12). Per l'isolamento è stata utilizzata la metodica descritta da Savini *et al.* (11): la milza è stata frammentata usando polvere di quarzo sterile,

posta in sospensione con un buffer di lattosio peptone contenente antibiotici (penicillina 100 UI/ml, streptomina 100 µg/ml e nistatina 100 µg/ml 50 UI/ml), sonicata e centrifugata. Dopo la centrifugazione, 100 µl della sospensione sono stati inoculati in uova embrionate di pollo per via endovenosa e successivamente è stato eseguito un passaggio su un monostrato confluyente di cellule Vero. Al massimo effetto citopatico, il materiale è stato raccolto, diviso in aliquote e conservato a -80°C. Il ceppo è stato poi titolato e tipizzato con il test di virus-neutralizzazione.

Titolazione virale

Il titolo virale è stato determinato con la formula di Reed e Muench. Per ogni campione positivo sono state effettuate 8 diluizioni in base dieci. Sei repliche per ciascuna diluizione sono state trasferite in una piastra da micrometodo a 96 pozzetti; come sistema rivelatore sono state aggiunte a ciascun pozzetto cellule Vero alla concentrazione di circa 10⁴ cellule/ml in MEM con antibiotici e 10% FCS. Il test è stato letto dopo 6 giorni d'incubazione delle piastre a 37°C con 5% di CO₂. Il titolo calcolato con la formula di Reed e Muench è definito come la più alta diluizione del virus che produce effetto citopatico (CPE) nel 50% delle cellule Vero inoculate (TCID₅₀).

Tipizzazione sierologica

Partendo da 1:10, quattro diluizioni virali in base 10 sono state poste a contatto con ciascuno dei 24 antisieri siero-specifici diluiti 1:20, così come descritto nel *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* dell'OIE (14). Per questa prova si sono usati antisieri specifici di cavia, gentilmente forniti dall'OVI. Il sierotipo virale è stato individuato in base all'antisiero specifico in grado di neutralizzare la crescita virale su monostrato cellulare evidenziabile attraverso il 50% di inibizione dell'effetto citopatico.

Inoculazione degli animali

Un mese dopo il terzo intervento vaccinale (5 mesi dopo il primo), le 8 pecore vaccinate e 4 mai venute a contatto con il virus, sono state infettate con 1 ml contenente 10^{5.8} TCID₅₀ di BTV-2. Dopo l'infezione sono stati eseguiti: visita clinica quotidiana, rilievi termometrici,

prelievi di sangue con e senza anticoagulante per la determinazione della viremia e per eseguire esami biochimico-fisico ed emocromocitometrico. Da ogni animale è stato prelevato un campione di sangue con e senza anticoagulante prima e 7 giorni dopo l'infezione (pi). Dal settimo giorno pi, la cadenza dei prelievi è stata due volte a settimana per l'intera durata della prova.

Esame biochimico fisico ed emocromocitometrico

Dal siero si sono determinate le seguenti variabili: fosfatasi alcalina, amilasi, acido urico, bilirubina totale, calcio, creatina, gamma glutamil transferasi, glucosio, glutammico-ossalacetico transferasi, glutammico-piruvico transferasi, lattico deidrogenasi, fosforo, proteine totali, trigliceridi, urea. Su sangue addizionato con EDTA è stata eseguito l'esame emocromocitometrico con le seguenti determinazioni: globuli bianchi, globuli rossi, emoglobina, emoglobina totale, volume corpuscolare medio globuli rossi, contenuto di emoglobina medio, concentrazione media di emoglobina, piastrine, volume piastrinico, linfociti, monociti, globuli rossi, eosinofili, basofili. I risultati ottenuti dall'analisi biochimica e dall'esame emocromocitometrico sono stati analizzati utilizzando il programma *mixed procedure* del software *Statistical Analysis Software (SAS/STAT®)*, in cui giorni e gruppi sono stati considerati fattori fissi, animale dentro gruppi random ed il primo controllo covariato (in modo da tenere conto delle differenze iniziali nei valori delle variabili tra i tre gruppi); è stato inoltre introdotto un fattore interazione giorno* gruppo per stabilire se le quantità variano in maniera diversa nei 2 gruppi al passare dei giorni.

Isolamento virale

Per determinare l'eventuale presenza di BTV, i campioni di sangue con anticoagulante sono stati esaminati mediante la tecnica descritta per l'isolamento virale (11): un ml di ciascun campione di sangue con EDTA è stato centrifugato a 812 g per 10 min per separare il plasma dai globuli rossi; il sedimento cellulare è stato lavato due volte mediante sospensione in tampone fosfato (PBS) antibiotato e

centrifugazione a 812 g per 10 min. Il pellet è stato quindi risospeso in 9 ml di MEM addizionato di antibiotici. I campioni sono stati sonicati per liberare il virus adeso ai globuli rossi, centrifugati e, quindi, il surnatante inoculato per via endovenosa in uova embrionate di pollo al 12° giorno di incubazione.

I campioni positivi hanno causato intense, diffuse e spesso letali emorragie negli embrioni. Sono stati esaminati gli embrioni morti tra il secondo e il settimo giorno post infezione: ne è stato prelevato il cuore e il cervello che sono stati omogenati in PBS ed antibiotici, centrifugati a 1.827 g per 15 min e 0,8 ml di surnatante sono stati utilizzati per infettare monostrati confluenti di cellule Vero in flasks da 25 cm². Dopo un'ora di contatto a 37°C, ad ogni flask sono stati aggiunti 8 ml circa di MEM con antibiotici e 3% FCS e sono state poste in incubatore a 37°C con 5% di CO₂. Le cellule sono state osservate quotidianamente per verificare la comparsa dell'effetto citopatico tipico del BTV: presenza di cellule globose, ricche di granulazioni, inizialmente limitate a pochi foci ma che tendono in poco tempo ad estendersi all'intero monostrato. In assenza di effetto citopatico evidente nel corso di una settimana di incubazione, le cellule sono state staccate meccanicamente, raccolte con il terreno colturale, centrifugate a 812 g per 10 min e il surnatante utilizzato per infettare un nuovo monostrato. Le flask infettate sono state controllate quotidianamente per evidenziare l'eventuale comparsa dell'effetto citopatico o di fenomeni di tossicità cellulare. Al termine del secondo passaggio o a seguito della comparsa di ECP, ciascun campione è stato saggiato con una prova di immunofluorescenza diretta: sono state raccolte le cellule del monostrato, lavate due volte mediante diluizione in tampone fosfato (PBS) e centrifugazione 812 g per 10 min, distribuite su vetrino a pozzetti, inserendo controlli positivi e negativi, lasciate asciugare a temperatura ambiente e fissate in acetone a -20°C per 20 min. L'identificazione virale è stata condotta con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale prodotto dall'IZS A&M (6). I campioni positivi hanno mostrato la presenza

di granuli fluorescenti intracitoplasmatici, segno caratteristico della presenza del BTV. Tutti i campioni positivi sono stati titolati e tipizzati seguendo le metodiche descritte precedentemente.

Risultati

Prova di sicurezza

Cinque giorni dopo la vaccinazione si sono evidenziate al punto di inoculo reazioni locali caratterizzate da edema ed arrossamento. Le reazioni si sono evidenziate in tutti gli animali vaccinati e non. Non si sono evidenziate sintomi clinici riferibili a BT né negli animali vaccinati né tantomeno in quelli di controllo.

Prova di efficacia

Test sierologici

Tutti gli animali hanno evidenziato risposta anticorpale alla c-ELISA 14 giorni dopo l'intervento vaccinale. Al contrario, in nessun animale si sono rilevati anticorpi neutralizzanti BTV-2.

Challenge test

Tra l'8° ed il 13°giorno pi, 6 animali vaccinati (75%) e 2 di controllo (50%) hanno evidenziato temperature febbrili (>40°C) (Fig. 1).

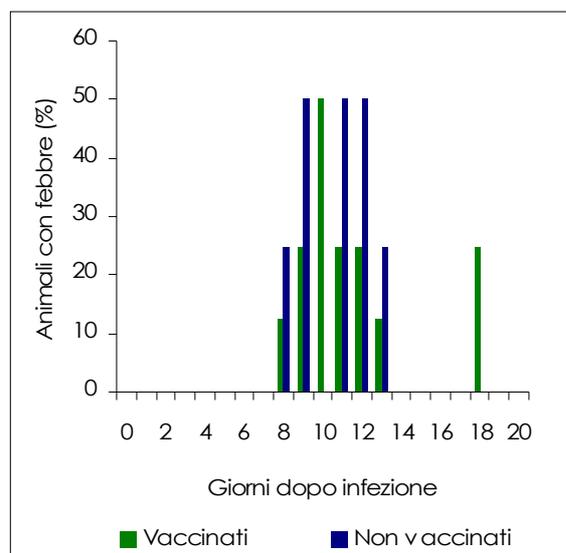


Figura 1
Reazione febbrile in pecore vaccinate con vaccino ricombinante dopo infezione con un ceppo virulento del sierotipo 2 del virus della bluetongue

Il virus è stato isolato da tutti gli animali a partire dal 7 giorno (I prelievo) fino al 16 giorno pi. In Figura 2 sono illustrati i titoli viremici rilevati nel gruppo vaccinato ed in quello di controllo dopo l'infezione virale con il ceppo BTV-2 di campo.

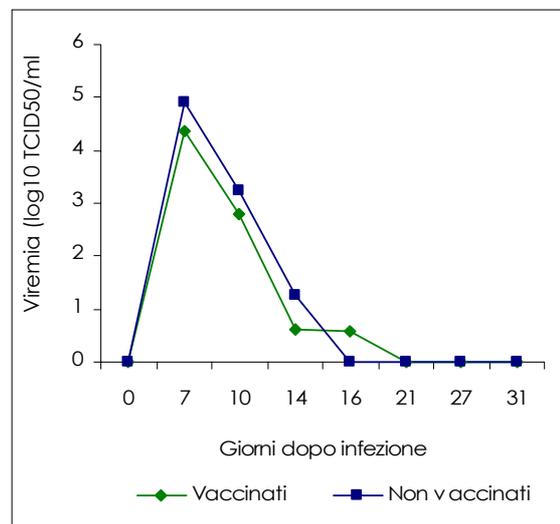


Figura 2
Titoli viremici in pecore vaccinate con vaccino ricombinante ed infettate con un ceppo virulento del sierotipo 2 del virus della bluetongue

Non si sono evidenziate differenze significative nei parametri emo-chimici considerati così come non è stata riscontrata alcuna interazione significativa nei gruppi in esperimento.

Discussione

I recenti sviluppi della biotecnologia hanno reso possibile la sintesi di vaccini composti da virioni prodotti sinteticamente la cui caratteristica principale è quella di somigliare morfologicamente alla particella virale originale mancando però di tutta quella impalcatura genetica necessaria al virus per replicarsi (2, 9). Il prodotto usato in questo studio è composto da virioni sintetici contenenti le 4 maggiori proteine virali del BTV2: VP2, VP5, VP7 e VP3 (3). Quando sperimentato in Sudafrica, lo stesso tipo di vaccino è stato in grado di stimolare nelle pecore una risposta anticorpale neutralizzante

capace di prevenire la forma clinica ed impedire la viremia in animali vaccinati e successivamente infettati con il virus selvaggio (9, 10). In questa prova, il vaccino, non solo ha causato una leggera reazione al punto di inoculo attribuibile con ogni probabilità all'adiuvante impiegato, ma non è stato nemmeno in grado di inibire la viremia né di prevenire, dopo infezione con il ceppo BTV-2 di campo, la forma clinica negli animali vaccinati.

L'esito negativo della prova era stato in qualche modo anticipato dalla insufficiente risposta immunitaria neutralizzante evidenziata in tutti gli animali vaccinati con due inoculazioni di vaccino, tant'è che, prima di poter effettuare il challenge, si era reso necessario (su indicazione della dr.ssa Polly Roy) un terzo intervento vaccinale quanto mai impraticabile in una ipotetica campagna vaccinale. È noto come gli anticorpi neutralizzanti siano stimolati dalle proteine strutturali del capsido esterno, VP2 e in parte VP5, mentre anticorpi verso la proteina del capsido interno, VP7, sono rilevati dall'ELISA competitiva (4, 5). Il ruolo protettivo degli anticorpi neutralizzanti nei confronti del BTV così come l'estraneità all'azione protettiva

degli anticorpi c-ELISA, sono stati più volte descritti in passato (7, 13). Non ha quindi sorpreso, in questo studio, osservare, dopo infezione con ceppo di campo, rialzo febbrile e titoli viremici nelle pecore positive alla c-ELISA. Di conseguenza, si può tranquillamente ipotizzare che l'inadeguata risposta immunitaria di tipo neutralizzante osservata negli animali vaccinati sia con ogni probabilità dovuta ad una inefficace stimolazione antigenica da parte della VP2 presente nel virione sintetico.

Confermando quanto osservato negli studi clinici e virologici, anche gli esami emo-chimici non hanno evidenziato alcuna differenza significativa tra il gruppo di animali vaccinato e quello non vaccinato.

Si può pertanto concludere che il vaccino ricombinante sintetizzato per proteggere gli animali dall'infezione con il BTV sierotipo 2 non è risultato completamente innocuo, non è stato in grado di proteggere gli animali dalla forma clinica né tantomeno di ridurre la durata e l'entità dei titoli virali negli animali vaccinati dopo infezione con virus virulento.

References

1. Gómez-Tejedor C. 2004. Brief overview of the bluetongue situation in Mediterranean Europe, 1998-2004. In *Bluetongue, Part I* (N.J. MacLachlan & J.E. Pearson, eds). Proc. Third International Symposium, Taormina, 26-29 October. *Vet Ital*, **40**, 57-60.
2. French T.J. & Roy P. 1990. Synthesis of bluetongue virus (BTV) core-like particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J Virol*, **64**, 1530-1536.
3. Hewat E.A., Booth T.F. & Roy P. 1994. Structure of correctly self-assembled bluetongue virus-like particles. *J Struct Biol*, **112**, 183-191.
4. Huismans H. & Erasmus B.J. 1981. Identification of the serotype specific and group specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res*, **48**, 51-58.
5. Jeggo M., Wright P., Anderson J., Eaton B., Afshar A., Pearson J., Kirkland P. & Ozawa Y. 1992. Review of the IAEA meeting in Vienna on standardization of the competitive ELISA test and reagents for the diagnosis of bluetongue. In *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses* (T.E. Walton & B.I. Osburn, eds). Proc. Second International Symposium, Parigi, 17-21 June 1991. CRC Press, Boca Raton, 547-569.
6. Lelli R., Portanti O., Langella V., Luciani M., Di Emidio B. & Conte A. 2003. Produzione di un kit ELISA competitiva per la diagnosi sierologica della Bluetongue. *Vet Ital*, **47**, 5-13.
7. Osburn B.I. 1992. Immune response to orbiviruses. In *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses* (T.E. Walton & B.I. Osburn, eds). Proc. Second International Symposium, Parigi, 17-21 June 1991. CRC Press, Boca Raton, 511-524.
8. Osburn B.I. 1994. The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **17**, 189-196.

9. Roy P. & Erasmus B.J. 1992. Second generation candidate vaccines for bluetongue disease. *In* Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses (T.E. Walton & B.I. Osburn, eds). Proc. Second International Symposium, Paris, 17-21 June 1991. CRC Press, Boca Raton, 856-867.
10. Roy P., French T. & Erasmus B.J. 1992. Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. *Vaccine*, **10**, 28-32.
11. Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M.A., Baldi L., De Santis P., Meiswinkel R. & Caporale V. 2005. Bluetongue virus (BTV) isolations from the Obsoletus Complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec*, **157**, 133-139.
12. Savini G., Monaco F., Citarella R., Calzetta G., Panichi G., Ruiu A. & Caporale V. 2004. Monovalent modified vaccine against bluetongue virus serotype 2: immunity studies in cows. *In* Bluetongue, Part II (N.J. MacLachlan & J.E. Pearson, eds). Proc. Third International Symposium, Taormina, 26-29 October. *Vet Ital*, **40**, 664-667.
13. 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.
14. World Organisation for Animal Health (*Office International des Épizooties*: OIE) 2004. Bluetongue, Chapter 2.1.9. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Parigi.