



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Studie av antikroppssvaret hos kor vaccinerade mot bluetongue i svenska mjölkbesättningar

Sandra Janson

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:19*

Studie av antikroppssvaret hos kor
vaccinerade mot bluetongue i svenska
mjölkbesättningar

Sandra Janson

Handledare: Stefan Alenius, Institutionen för Kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Ulla Carlsson, SVA

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Bluetongue, vaccination, Sweden, dairy cows.

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:19*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	3
ABSTRACT.....	4
INLEDNING.....	5
Litteraturoversikt.....	5
Smittämne	5
Smittspridning	6
Epidemiologi.....	7
Bluetongue i Sverige	9
Patogenes	11
Immunsvär	13
Kliniska symptom.....	13
Diagnostik	15
Sjukdomskontroll	17
Vaccin mot bluetongue.....	17
Vaccinprestanda	19
Sveriges vaccinationskampanj	19
Utvecklingen av bluetongue i Sverige och Europa.....	20
EU:s policy gällande bluetongue.....	21
METODER OCH MATERIAL	21
RESULTAT	23
DISKUSSION.....	28
LITTERATURFÖRTECKNING	31
Böcker och artiklar	31
Internet.....	33
Personligt meddelande.....	34

SAMMANFATTNING

Bluetongue, en vektorburen infektionssjukdom som drabbar idisslare, har tidigare endast funnit i tropiska samt subtropiska delar av världen. Sedan ett drygt decennium tillbaka har denna bild förändrats och sjukdomen förekommer nu även längre norrut i Europa. Sverige fick sitt första konstaterade fall av infektion med bluetonguevirus, vilket var av serotyp 8 (BTV-8), i september 2008. En vaccinationskampanj i de södra delarna av landet inleddes snabbt med syftet att utrota denna epizootisjukdom från Sverige. Även i många andra EU-länder har man inlett en omfattande vaccination av mottagliga tamdjur med ett avdödat vaccin mot BTV-8. I detta examensarbete har antikroppssvaret efter vaccination hos mjölkkor i Sverige undersökts med en indirekt antikropps-ELISA för mjölkprov. Vaccinerade djur har provtagits vid olika tidpunkter efter vaccination. Ovaccinerade kor har också provtagits som en negativ kontroll. Provsvaren från de negativa kontrollerna låg alla samlade kring låga värden. Några av de vaccinerade djuren hade mycket låga antikroppsvärden, medan en del tankmjölksprov hade så höga värden att en eventuell naturlig infektion hos djuren kan misstänkas. Ingen generell nedåtgående trend vad gäller antikropps-nivån kunde ses som en funktion av förfluten tid efter vaccination. De höga cut off-värdena hos mjölkprovs-ELISA:n i studien kan ifrågasättas och ett nytt värde på 20 % förslås istället. Detta för att undvika att prover från vaccinerade djur felaktigt räknas som negativa avseende förekomst av antikroppar mot BTV-8.

ABSTRACT

Bluetongue is a vectorborne, infectious disease that affects ruminants. Before the last decade the disease appeared almost exclusively in tropical and subtropical parts of the world. But the situation has changed and nowadays bluetongue is a reality for ruminants in northern Europe too. In September 2008 Sweden got its first verified animal infected with bluetongue virus, serotype 8 (BTV-8). A vaccination campaign in the southern parts of the country started shortly after, in order to try to eradicate the disease. In this thesis, a study was made over the resulting antibody levels among vaccinated dairy cows in Sweden. An indirect antibody ELISA for milk was used. Unvaccinated cows were used as a negative control. The unvaccinated individuals all had low test values. Some of the vaccinated cows had very low antibody levels but others might be suspected to have undergone a natural infection with BTV-8, due to high test values for bulk milk. No declining trend in general, regarding the antibody levels, could be seen as a function of time elapsed after the vaccination date. The high cut off values recommended by the manufacturer of the ELISA can be questioned. The risk is that tests from vaccinated animals incorrectly are regarded as negative according to the presence of antibodies against BTV-8. A new cut off value of 20 % is suggested.

INLEDNING.

Bluetongue är en vektorburen infektionssjukdom som drabbar idisslare. Traditionellt sett har sjukdomen endast förekommit i tropiska samt subtropiska delar av världen. Situationen har dock ändrats under det senaste decenniet och bluetongue figurerar nu även på nordligare breddgrader i Europa. Sverige fick sitt första fall av sjukdomen hösten 2008. Jordbruksverket valde att agera snabbt och sätta en omfattande vaccinationskampanj mot bluetongue i verket i södra Sverige. Målsättningen är att kunna utrota sjukdomen från landet. Det är ett avdödat vaccin från företaget Merial som används.

Då vaccinationskampanjens inleddes var vaccinet nyligen framtaget. Man visste då inte så mycket om vilken effekt med avseende på antikroppssvaret vaccinet skulle komma att få i fält. Inte heller dokumentationen kring vaccinets säkerhet var så omfattande som hade varit önskvärt. (<http://www.sva.se/sv/navigera/Djurhalsa/Epizootisjukdomar/Bluetongue-samlad-information/Vaccinering-mot-bluetongue/>).

Syftet med examensarbetet är att göra en studie av antikroppssvaret hos kor vaccinerade mot bluetongue i svenska mjölkbesättningar. Dessutom kommer en litteraturstudie av sjukdomen bluetongue att göras.

LITTERATURÖVERSIKT

Smittämne

Epizootisjukdomen bluetongue (BT) orsakas av bluetonguevirus (BTV) som är ett genetiskt sett heterogent virus. BTV är ett *Orbivirus* som tillhör familjen *Reoviridae*. Man har tills nyligen räknat med att det finns 24 olika serotyper av BTV (BTV-1 t.o.m. BTV-24) världen över. (Radostits O. M. et al., 2007). Under 2008 upptäcktes dock en möjlig 25:e serotyp av BTV i Schweiz, det så kallade Toggenburgviruset (Dal Pozzo F. et al., 2009a).

De olika serotyperna av BTV har en mycket varierande virulens, och ger därmed upphov till sjukdom av skiftande allvarlighetsgrad (Radostits O. M. et al., 2007).

BTV är mycket stabilt i miljöer där protein finns tillgängligt. Smittämnet är känsligt för pH-värden mindre än 6 och större än 8. (http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A090.htm).

Genomet består av ca 19200 baspar och är fördelat på tio segment med dubbelsträngat RNA. Virusets yttre skal utgörs av två strukturprotein: VP2 och VP5. Mellanlagret består av strukturprotein VP7 och innanför detta finns ett antal andra strukturprotein. Dessutom bidrar några icke-strukturella proteiner till virusets uppbyggnad. Bland de senare finns NS1 och NS2 som exempelvis tros delta i virusreplikationen. Orbivirus, till skillnad från enkelsträngade RNA-virus, är stabila under infektionsförloppet och några punktmutationer verkar inte inträffa. Utbyte av dsRNA segment kan dock förekomma om två bluetonguevirus av olika stam eller serotyp infekterar samma cell. (Schwartz-Cornil I. et al., 2008).

Smittspridning

Bluetongue överförs mellan mottagliga djur med hjälp av svidknott av släktet *Culicoides spp.* Det är framförallt får som är känsliga och i högre grad än andra idisslare uppvisar klinisk sjukdom vid infektion med BTV. Speciellt känsliga fårraser är finullsfår samt muttonraser (Radostits O. M. et al., 2007). Nötkreatur kan också drabbas av klinisk sjukdom, men får främst subklinisk sjukdom och fungerar då i första hand som reservoarer för smittämnet. BTV kan uppförökas hos dem och sedan spridas vidare. Infektion med BTV kan även ske hos getter och vilda idisslare men även dessa djurarter får i första hand en subklinisk sjukdom (Saegerman C. et al., 2008).

BTV är beroende av *Culicoides spp.* för sin spridning mellan värddjur (se fig. 1). Då svidknotten är klimatkänsliga så är temperatur och luftfuktighet två avgörande faktorer för svidknottens och därmed även sjukdomens geografiska utbredning. I endemiska områden där klimatet är gynnsamt för svidknotten är BTV ständigt närvarande. Klinisk bluetongue är dock sällsynt i dessa områden, men kan bryta ut om nya stammar av BTV kommer in i regionen eller om icke inhemska djur tas in. Områden där infektion med BTV och klinisk sjukdom uppträder med några års mellanrum finns. Akuta sjukdomsutbrott kan ske i regioner där BTV normalt inte förekommer och djur kan då drabbas av mer allvarliga symptom. (Saegerman C. et al., 2008).

I tempererade områden inträffar bluetongue främst i slutet av sommaren och början av vintern medan den i subtropiska områden uppträder på våren eller försommaren, men kan förekomma året runt (Saegerman C. et al., 2008).

Efter att ett svidknott ätit ett mål blod från ett BTV-infekterat djur passerar viruset genom knottets mag-/tarmkanal. Därefter distribueras virus via knottets hemocoel ut till olika vävnader och sedan till spottkörtlarna, där det fortsätter att replikeras. Virus utsöndras sedan undan för undan i insektens saliv. Överföring av BTV sker om knottet biter en annan idisslare. Vektorn når sin maximala infektionsförmåga tio dagar efter att det sugit blod från ett viremiskt djur. (Saegerman C. et al., 2008).

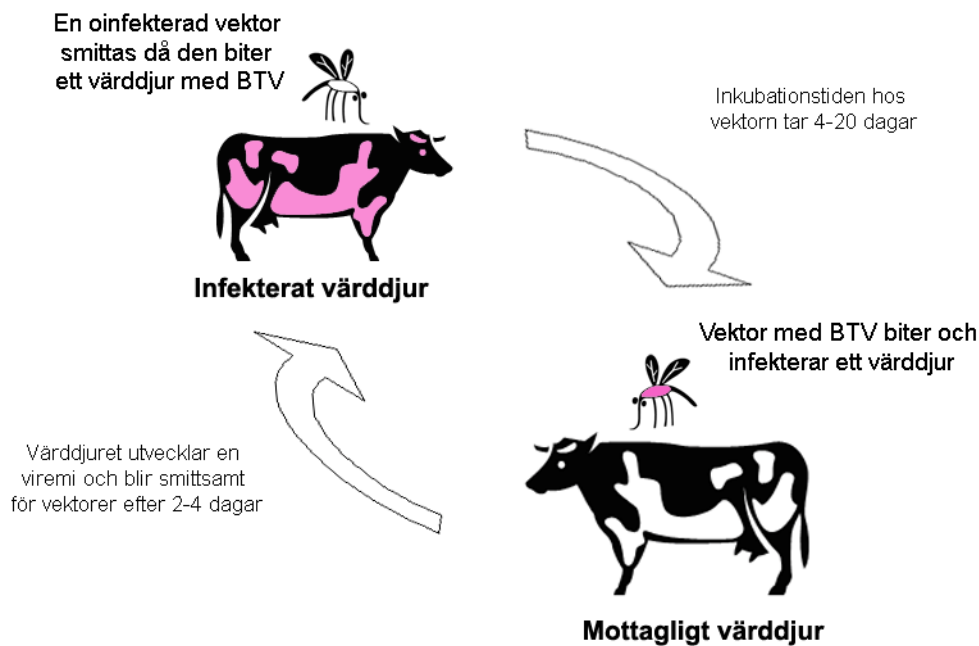


Fig. 1. Bluetongues smittcykel. BTV är beroende av svidknott av arten *Culicoides* spp. för sin överföring mellan värdjur.

(Efter http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/fig_tab/nrmicro1090_F2.html).

Resultatet från en tysk studie (Menzies F. D. et al., 2008) tyder på att BT kan spridas både via placenta men även via direktkontakt. Två seropositiva, avseende BT, kvigor som ingick i studien födde tillsammans tre kalvar. Alla kalvarna var positiva på PCR-test avseende BTV och från en av dem kunde BTV isoleras från blodet. Två andra djur, en ko och en kviga, i studien smittades också av BT och författarna menar att de har infekterats genom att de ätit av placentor innehållande BTV-8.

Epidemiologi

Traditionellt sett har bluetongue varit en sjukdom som förekommit i tropiska och subtropiska delar av världen och har drabbat djur i Afrika, Asien, Nordamerika, Sydamerika och Australien mellan latituderna 40°N och 35°S. Idisslare i sydeuropeiska länder som Portugal, Spanien, f.d. Jugoslavien och Grekland har också råkat ut för hastigt uppkomna sjukdomsfall tidigare. Sedan 1998 och framåt har dock en markant förändring skett med avseende på BT:s utbredning i Europa. (Radostits O. M. et al., 2007).

Från år 1998 och framåt har åtminstone åtta olika BTV-stammar tillhörande sex olika serotyper (1, 2, 4, 8, 9, 16) infekterat djur i ett flertal europeiska länder. Under 2006 upptäcktes BTV-8 i Nederländerna och spreds sedan till Tyskland, Belgien och Frankrike. Totalt registrerades ca 2300 fall av bluetongue i Europa under 2006. Året därpå förvärrades situationen och nästan 41000 fall av sjukdomen upptäcktes under 2007. Nya länder som Luxemburg, Danmark, Schweiz, Tjeckien och Storbritannien drabbades också. (Schwartz-Cornil I. et al., 2008).

Den BT-smitta som kom till norra Europa under 2006 identifierades som BTV serotyp 8. Hela genom sekvenserades och jämfördes med andra stammar, varvid man kom fram till att den europeiska BT-smittan härrörde från Afrika söder om Sahara. Det är dock oklart hur viruset har kommit in i Europa, även om man kunnat slå fast att det inte härstammar från något BTV-8 vaccinerat. (Maan S. et al., 2008).

Under 2008 utvidgades området för bluetongue i Europa ytterligare och Sverige, Ungern, Österrike och Italien drabbades då (Carpenter S. et al., 2009). Under samma år blev smittsituationen också mer komplicerad i och med att ytterligare två serotyper (BTV-6 och BTV-11) påvisades i Nederländerna respektive Belgien (Dal Pozzo F. et al., 2009a). Under säsongen 2008-2009 konstaterades även ett fåtal fall av bluetongue på nötkreatur i Norge (<http://eubtnet.izs.it/btnet/reports/BTV8.html>). Tabell 1 visar antalet fall av bluetongue i Europa 2008-2009.

Tabell. 1. Uppgifter om antal utbrott av bluetongue i stort respektive hos nötkreatur samt antalet fall hos nötkreatur i Europa under perioden 1 maj 2008-10 dec 2009. (<http://eubtnet.izs.it/btnet/reports/BTV8.html>)

Antal utbrott av BT totalt	Antal utbrott av BT hos nötkreatur	Antal fall av BT hos nötkreatur
30891	23141	33039

Per den 29/10 2009 fanns sex stycken serotyper av BTV i Europa. Dessa är BTV-1, -2, -4, -8, -9 och -16. (http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bt_restrictedzones.pdf).

Den globala förekomsten av bluetongue sträcker sig för tillfället mellan 53°N och 34°S. (http://www.oie.int/eng/Normes/mcode/en_chapitre_1.8.3.htm#rubrique_fievre_c_atarrhale_du_mouton_controle).

Det utbrott av bluetongue som har skett i nya länder i Europa tillskrivs dels klimatförändringar, dels att europeiska Culicoidesarter har kunnat fungera som nya smittbärare av BTV (Saegerman C. et al., 2008, MacLachlan N. J. et al., 2009, Purse B. V. et al., 2005).

Det finns över 1400 Culicoidesarter, men endast ett begränsat antal av dem kan fungera som vektorer för BTV. *C. imicola* förknippas med bluetongue i södra Europa och *C. obsoletus* samt *C. pulicaris* har identifierats som nya vektorer för BTV i Europa. (Radostits O. M. et al., 2007).

Culicoides obsoletus är en förenkling av ett komplex som består av fyra arter, dessa är *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus*, och *C. dewulfi*. Dessa är svåra att sinsemellan skilja åt morfologiskt och kallas därför ofta för obsoletuskomplexet eller obsoletusgruppen. Alla fyra anses vara vektorer för BTV idag och alla fyra finns i Sverige. Dock är de vanligast förekommande *C. obsoletus* och *C. scoticus*. *C. pulicaris* anses också vara en vektor för BTV efter att virus har isolerats från denna art i Italien. *C. pulicaris* finns vanligt förekommande i norra Europa och i Sverige. (Personligt meddelande, Mats Ander, SVA, 2009-12-04).

BTV:s överföringscykel (se fig. 1) påverkas i högsta grad av omgivningens temperatur och fuktighet. Dessa två parametrar är essentiella för överlevnaden av de *Culicoides*arter som fungerar som vektorer för BTV. Det finns, med bakgrund i behovet av en gynnsam miljö för vektorer, skäl att dra paralleller mellan spridningen av bluetongue in i nya områden i Europa och de klimatförändringar som skett under samma tid. Det varmare och fuktigare klimatet gynnar förekomsten av *Culicoides*knott, vilket innebär fler potentiella smittöförare på nya områden. Aktiviteten hos vektorerna ökar vid varma förhållanden (18-19 °C), särskilt kvälls- och nattetid. Antalet månader med en medeltemperatur över 12,5 °C är en kritisk faktor för förekomsten av *Culicoides*knott. (Purse B. V. et al., 2005).

Sedan juli 2007 har vektoraktiviteten i Sverige följts med hjälp av knottfällor. 2007 konstaterades den säsongsmässigt fria vektorperioden börja den 11 dec och 2008 var startdatumet 15 nov. Svidknottens aktivitet avtog dock i mitten av oktober båda åren. 2007 fångades 49000 knott in och året därpå var antalet infångade knott 30000. Ca 93 % av knotten tillhörde arterna *C. pulicaris* samt *C. obsoletus*. (Sternberg Lewerin S. et al., 2009).

Jordbruksverket har beslutat att knottfri period gäller från den 1 november 2009 (www.sjv.se).

Bluetongue är en ekonomiskt sett viktig sjukdom. Lantbrukare drabbas dels i form av försämrad produktion då djur som insjuknar tappar i kondition och tillväxt. Det tar tid innan djuren kommer tillbaka till full hälsa och risk finns även för dödsfall. Dräktiga tackor kan abortera och fårens ullkvalitet försämras. En annan mycket betydelsefull ekonomisk aspekt med bluetongue är de handelsrestriktioner med avseende på djur och djurprodukter som införs från smittade områden. (Radostits O. M. et al., 2007).

BTV kan enligt Saegerman C. et al. (2008) föras in i ett område på fyra olika vis: 1) genom införsel av djur, djurprodukter (sperma, embryon) eller kontaminerade vaccin; 2) genom infekterade vektorer som kommer med djur/växter eller via transportmedel; 3) genom aktiv förflyttning av *Culicoides*; 4) genom passiv förflyttning av *Culicoides* med luftströmmar. Om virus sedan kan etablera sig eller ej är beroende av faktorer som antal möjliga värddjur och hur de är spridda geografiskt, hur omfattande och långvarig viremin blir hos värddjuren, hur stor vektorpopulationen är samt omgivningstemperaturen. Utbrottet och spridningen av BTV-8 i mer nordliga delar av Europa på senare år tyder på att villkoren för bluetongue uppfylls även där.

Ågren E. et al. (2009) presenterar resultat från undersökningar med atmosfäriska datamodeller. Dessa stödjer teorin att svidknott infekterade med BTV-8 nått Sverige under sommaren 2008 med hjälp av vindströmmar från Danmark och Tyskland.

Bluetongue i Sverige

Sveriges första fall av bluetongue upptäcktes i Halland den 6 sep 2008. Det fångades upp i det sedan 2007 pågående svenska övervakningsprogrammet mot

bluetongue via tankmjölksprover. Vidare provtagning bekräftade sedan bluetonguesmitta hos ett djur som var positivt på serologi samt positivt med BTV-8 specifik PCR. Ett spärrområde med 20 km radie och ett restriktionsområde med radien 150 km infördes kring den smittade besättningen. Provtagning av mottagliga djur i närheten inleddes sedan. Ett fåtal av dem var positiva med PCR och ännu färre fick positivt utslag med serologitest. I takt med att fler positiva djur hittades utökades restriktionsområdet. Senaste utökningen gjordes i februari 2009. (Sternberg Lewerin S. et al., 2009). I fig. 2 visas spärr- samt restriktionsområdena.

I Sveriges aktiva övervakning av BT-situationen ingår förutom slumpmässiga tankmjölksprover från hela landet även provtagning av idisslare vid slakt. Av 6486 tankmjölksprover tagna under 2008 var 11 stycken positiva. Dessutom erhöles en viss övervakning av den vilda idisslarpopulationen genom att jägare skickade in prover från skjutna vilt under 2008. Av 785 prover totalt, var en älg positiv på serologi, men negativ vid PCR-test. Kampanjer riktade mot både lantbrukare och veterinärer har också genomförts för att hålla en passiv, klinisk övervakning vid liv. Alla kliniskt misstänkta fall har provtagits med PCR, men ingen individ testades positivt under 2008. Totalt under 2008 påvisades BTV-infektion i 30 nötbесättningar och 3 fårbesättningar. De flesta av dessa besättningar hade 1-2 infekterade djur. Av alla de djur som provtogs i den passiva och aktiva övervakningen var det endast ett PCR-positivt djur som visade milda kliniska symptom på bluetongue. Dessa symptom försvann också snabbt. (Sternberg Lewerin S. et al., 2009).

En seropositiv, men PCR-negativ ko födde i december 2008 en kalv som var positiv både på serologi och vid PCR-test. Det är det första konstaterade fallet av transplacental överföring av BTV-8 i Sverige. (Sternberg Lewerin S. et al., 2009).

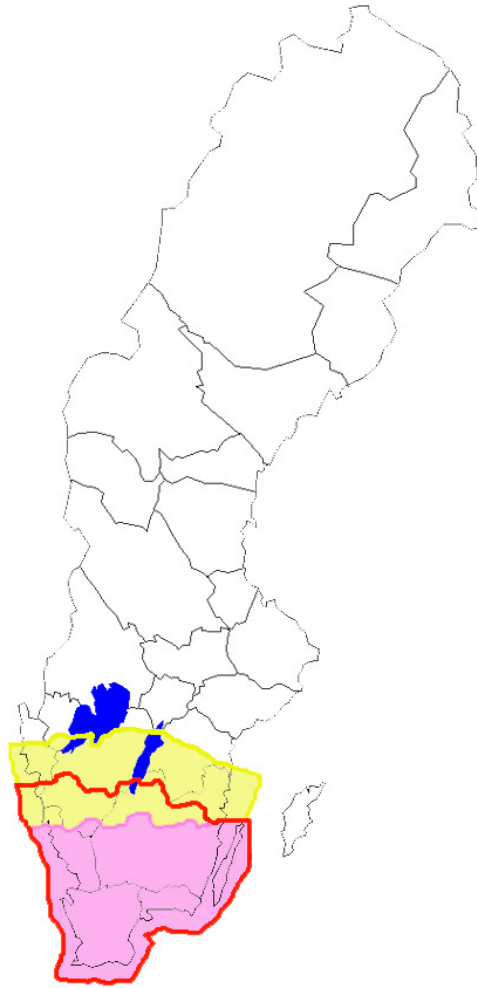


Fig. 2. Karta över ungefärliga gränser för Sveriges restriktions- (gult område) och spärrområde (rosa område) för bluetongue per den 090218. Den röda linjen visar gränsen för vaccinationsområdet per den 081119. (Efter <http://www.jordbruksverket.se/download/18.2ce1c8ad1213e6b28d48000228/Karta+%C3%B6ver+vaccinationsomr%C3%A5det+i+Sverige.pdf>).

Patogenes

Startpunkten för de patologiska förändringarna som uppkommer vid infektion med någon serotyp av BTV är skador på endotelet i små blodkärl. Dessa skador kan sedan i sin tur orsaka disseminerad intravaskulär koagulation samt nekros hos vävnader som försörjs av de trasiga blodkärlen. Följderna kan då bli ödem, blodstockning, blödningar och inflammation. Efter att infektion skett via ett bett från ett infekterat svidknott replikeras virus i den lokala lymfknutan. BTV förökar sig i cytoplasman hos infekterade celler och produktionen av nya viruspartiklar är exponentiell mellan åttonde och 24:e timmen efter infektionstillfället (Schwartz-Cornil I. et al., 2008). Spridning av virus sker sedan via mononukleära celler i blodet till andra replikationsställen som lymfoid vävnad och lungor. Lungorna som är chockorganet hos idisslare är extra känsliga för skador i kärlpermeabiliteten vid en BTV-infektion (Schwartz-Cornil I. et al., 2008). Viremi kan ses från dag tre efter infektion och mängden virus i blodet ökar därefter för att nå sitt maximala värde dag 6-7, innan nivån sjunker igen. En

panleukopeni som drabbar alla sorters lymfocyter och särskilt CD8 T-celler, fås och når sin höjdpunkt 7-8 dagar efter infektion (Schwartz-Cornil I. et al., 2008).

Inkubationstiden är 5-20 dagar
(http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A090.htm).

Patogenesen skiljer sig något åt då det gäller bluetongue hos nötkreatur och vilda idisslare. Till skillnad mot hos får så infekteras deras endotelceller inte alls i lika stor utsträckning. Istället är det i första hand erythrocyter och trombocyter som invaderas av BTV hos nötkreatur. Virus kan inte replikeras inuti röda blodkroppar då dessa inte har någon cellkärna, men får där skydd mot neutraliserande antikroppar som cirkulerar i blodet. De persisterar i invaginationer i cellmembranet i form av intracellulära vesiklar. Virus inne i erythrocyter kan ses redan 24 timmar efter infektion och kvarstår sedan under hela viremiperioden (Schwartz-Cornil I. et al., 2008). En BTV-infektion hos idisslare karaktäriseras därför av en förlängd cellassocierad viremi. BTV-RNA har påvisats hos nötkreatur upp till 222 dagar efter infektion (Schwartz-Cornil I. et al., 2008). Andra försök har visat på en viremi som varat i ca 60 dagar (Saegerman C. et al., 2008).

I en studie (MacLachlan et al., 1990) infekterades elva stycken kalvar med BTV-10. Virus kunde övergående hittas i mononukleära celler i blodet samt i plasman, men kunde under hela förloppet isoleras från erythrocyter. Höga virustitrar fanns i lungor, preskapulära samt mesenteriska lymfknutor, thymus och i mjälten. Dock var det ingen av kalvarna som fick några kliniska symptom på BT under studien.

Vid BT hos både nöt och får är infektion av endotelceller i små blodkärl i lungorna en viktig del av sjukdomsförloppet. En möjlig förklaring till att får i betydligt högre grad än nöt drabbas av skador i de små blodkärlen kan vara den artspezifika produktionen av och aktiviteten hos inflammatoriska mediatorer. Dessa mediatorer framkallas av endotelcellerna och bidrar till den ökade känsligheten hos får. (DeMaula et al., 2002).

Infekterade tjurar kan utsöndra virus i sperma och vara bärare av virus under en lång tid (Saegerman C. et al., 2008).

BTV kan även överföras vertikalt via placenta (Saegerman C. et al., 2008). Även MacLachlan N. J. et al. (2009) anger att transplacental överföring av BTV hos idisslare som leder till infektion av fostret kan ske med vissa virusstammar.

BTV har rapporterats kunna överleva under 9-12 månader, oftast vintertid, utan tillgång till vektorer och utan att man har kunnat hitta fall av viremi, sjukdom eller serokonvertering hos värddjur. Denna övervintringsperiod överstiger den maximala viremiperioden som rapporterats, varför BTV måste överleva på annat sätt. Det finns heller inga bevis för transovariell överföring av BTV hos vektorerna. En föreslagen förklaring till denna övervintring är att BTV persistent kan infektera $\gamma\delta$ T-celler hos får. Dessa celler kan sedan aktiveras genom interaktion antingen med fibroblaster eller med antikroppar riktade mot ett ytprotein på $\gamma\delta$ T-cellerna. Då en oinfekterad Culicoidesmygga efter vintersäsongen biter ett får med persistent infekterade $\gamma\delta$ T-celler uppkommer,

liksom i vanliga fall, en hudinflammation på bettstället. En mängd $\gamma\delta$ T-celler samlas då i inflammationsområdet. När dessa sedan interagerar med fibroblaster i området triggas en lytisk infektion igång och virusreplikation och utsöndring av virus sker då. (Takamatsu H. et al., 2003).

Immunsvär

Immunitet mot BTV tycks vara specifik för en viss stam av viruset (Radostits O. M. et al., 2007).

Både ett humoralt respektive ett cellmedierat immunsvär kan ge skydd vid en infektion med BTV. BTV-specifika antikroppar ger ett immunsvär mot en viss serotyp av viruset. I ett homologt skydd mot en viss BTV-serotyp ingår antikroppar och T-celler riktade mot externa VP2 samt VP5-protein. Det finns även ett bredare, heterologt, immunsvär som utgörs av T-celler riktade mot NS1-proteinet. Neutraliserande antikroppar skyddar generellt endast mot homologa virus. Då vissa serotyper av BTV liknar varandra mer kan dock antikroppar som bildas vid en infektion med en viss serotyp skydda även mot somliga andra serotyper. Cytotoxiska T-celler har också visat sig ingå i individens försvar mot bluetongue. (Schwartz-Cornil I. et al., 2008).

Jeggo M. H. & Wardley R. C. (1985) menar också att immunförsvaret mot BTV innehåller både humorala samt cellmedierade komponenter. Det humorala immunsvaret är serotypspecifikt, medan det cellmedierade svaret är bredare via korsreaktiva cytotoxiska T-lymfocyter.

Kliniska symptom

Hos nötkreatur är de flesta infektioner med BTV subkliniska. Det finns dock undantag och sjuka nötkreatur kan då uppvisa följande symptom:

- feber (40-41°C)
- överdriven salivering
- ödem i läpparna
- inappetens
- näsflöde
- illaluktande andedräkt
- stelhet och håla på samtliga ben
- ulcerationer på tunga, läppar, tandkött, mule och spenar
- inflammation i kronränderna
- abortering/missbildning hos foster

Nötkreatur kan också få en IgE-medierad hyperkänslighetsreaktion vid en BTV-infektion. Den stam av BTV-8 som nyligen gjort att djur i norra Europa insjuknat i bluetongue är speciell såtillvida att ett större antal nötkreatur än vanligt har visat symptom på sjukdom (Schwartz-Cornil I. et al., 2008).

Hos får är bluetongue många gånger en allvarlig sjukdom, förutom i enzootiska områden där den oftast är subklinisk. Feber uppemot 41°C som vara i 5-6 dagar uppkommer ungefär en vecka efter infektion med BTV. Därefter ses näsflöde och salivering, svullnad ödem och rodnade slemhinnor på läppar, tandkött och tunga.

Följden blir senare sår och nekrotiska ulcerationer på de affekterade slemhinnorna. Tungan kan färgas blålila, men det är ganska ovanligt. Påverkade djur får svårt att svälja och kan även få problem att andas. Hos vissa djur kan skador på klövarna i form av kronrandsinflammation samt fång uppstå. Dessa skador uppkommer ofta lite senare i sjukdomsförloppet, då munhålelesionerna har börjat läka av. En del får drabbas även av allvarlig konjunktivit. Att djuren helt eller delvis tappar ullen tillhör också sjukdomsbilden. Djur som dör till följd av sina skador avlider oftast en knapp vecka efter att symptomen uppkommit. För de får som överlever bluetongueinfektionen tar det lång tid, flera månader är inte ovanligt, innan de helt har återhämtat sig igen.

Saegermann C. et al. (2008) beskriver kliniska symptom hos nötkreatur med konstaterad infektion med BTV från elva gårdar i Belgien under 2006. Feber sågs endast hos ett fåtal djur, men kan ha missats om temperaturstegringen endast var liten och snabbt övergående. En nedsatt mjölkproduktion rapporterades från hälften av gårdarna. Viktsförlust kunde ses, kanske beroende på en temporär aptitnedsättning i den febrila fasen eller p.g.a. lesioner i munhålan. Slöhet kunde förekomma hos de drabbade djuren.

Desymptom som både kom först och varade längst samt var vanligast, var lokaliserade till mule och näsborrar. Ulcerativa till nekrotiska lesioner kunde ses dorsalt på mulen, framförallt på de opigmenterade delarna. Liknande skador var även vanliga på näsborrarnas utsidor. Lesionerna bildade senare krustor. Nosflöde förekom hos en del djur, detta var då seromuköst eller mukopurulent. Strax efter uppkomsten av såren på nos/näsborrar kunde lesioner ses även i munhålan. Vanligaste platsen var nära tänderna, på kindsidan av tandköttet. Ulcerationer förekom även på tandplattan samt kindslemhinnan och tungan. Cyanos av tungan var ovanligt. Överdriven salivering och frekventa uppstötningar observerades ibland. Dermatitis runt ögonen var vanligt och ibland sågs också krustor samt ett ökat tårflöde. Submandibulärt ödem upptäcktes endast hos en ko.

I början av sjukdomsförloppet kunde svullnad i nedre delen av benen noteras. Djuren tvekade ibland vid rörelse och visade hälta samt muskelstelhet och även ovilja till rörelse i vissa fall. Hudskador förekom även på juvret med ulcerativa och nekrotiska lesioner på spenarna. Skador liknande de som uppträder vid fotosensibilitet kunde ses hos ett flertal djur på den opigmenterade huden på ryggen och vid svansroten. Dessa hudskador uppkom dock två-tre veckor efter de första kliniska symptomen.

I de allra flesta fall överlevde korna sjukdomen och lesionerna gick tillbaka under en period av fyra till åtta veckor. Även om inga kliniska tecken tycks vara patognomona för bluetongue så består den vanliga kliniska bilden av ulcerativa och nekrotiska lesioner på mule och näsborrar samt i munhålan, hälta och lesioner på spenarna. Hos får är lesionerna generellt mer ödematösa och hemorragiska än hos nötkreatur.

Dal Pozzo F. et al. (2009b) har gjort en studie där två kvigkalvar av rasen Holstein experimentellt infekterades med BTV-8. Båda kalvarna visade tydliga kliniska symptom på bluetongue. Symptomen uppkom fyra dagar efter infektion och förvärrades sju dagar efter infektion. Båda kalvarna drabbades av feber, ögonflöde

samt konjunktivit, näsflöde, ödem och erosioner på munslemhinna, tandkött och tunga. BTV påvisades i material från tungan, vilket också det tyder på att virus aktivt replikeras i munslemhinnan. Även submandibulärt ödem och kronrandsinflammation tillhörde den kliniska bilden hos kalvarna. Författarna menar att utvecklandet av kliniska symptom hos nötkreatur som infekterats med BTV-8 inte är typiskt, eftersom bluetongue annars brukar vara subklinisk hos nöt. De pekar på att mekanismerna för hur BTV-8 ger lesioner hos nöt behöver undersökas vidare.

I en engelsk studie (Darpel K. E. et al., 2007) infekterades fyra får och fyra kalvar av mjölkras experimentellt med en stam av BTV-8 från norra Europa. Samtliga får visade tecken på klinisk sjukdom inom 1-2 veckor efter infektionstillfället. Bortsett från mild konjunktivit och lindriga ulcerationer i munslemhinnan hos en individ visade kalvarna under studien inte några andra kliniska symptom på BT. Vid provtagning hade de däremot höga nivåer av viralt RNA i blodet. En av kalvarna avlivades och obducerades och då gjordes flera patologiska fynd, framförallt i form av endotelskador, trots frånvaron av kliniska symptom. En generell, kraftig lymfadenopati med petechiella blödningar sågs i lymfknutorna. Även tonsillerna var förstörade med petechiella blödningar. Dessutom fanns petechiella blödningar på flera andra organ, som tunga, njurar och mjälten. Lungorna var makroskopiskt normala, men en blödning fanns på utsidan av aortaväggen. Författarna menar att denna patologiska bild kan ge upphov till kliniska symptom hos mer mottagliga djur och/eller känsligare raser. De påpekar även att frånvaron av kliniska symptom i kombination med höga virusnivåer i blodet hos nötkreatur kan spela en viktig roll i spridningen av sjukdomen då de kan fungera som symptomfria smittbärare. Med hjälp av realtids RT-PCR undersöktes förekomsten av viralt RNA och hittades mellan dag 1-6 hos samtliga kalvar. Maxvärden erhöles mellan 7 och 14 dagar efter infektion. Antikroppar mot BTV påträffades sex dagar efter infektion hos fåren och efter åtta till tolv dagar hos kalvarna. Knappt 10 % av nötkreaturen i drabbade BT-områden i Europa uppges ha fått kliniska symptom, men andelen dödsfall hos de djur som blivit kliniskt sjuka uppgår också till 10 %.

Diagnostik

Den specifika diagnosen bluetongue kan ställas på tre olika sätt; virusisolering, detektion av viralt antigen eller nukleinsyra från BTV alternativt genom att påvisa specifika antikroppar. Virusisolering eller detektion av viral nukleinsyra är det säkraste sättet att konfirmera BTV-infektion med. Det tar dock 2-4 veckor innan svar fås om virusisolering används. Antikroppar kan påvisas 5-15 dagar efter infektion och kvarstår i två år eller mer. Den kompetitiva ELISA:n tycks vara bland de mest sensitiva och är även höggradigt specifik. (Radostits O. M. et al., 2007).

I arbetet med att detektera virus har ELISA-tekniker, speciellt sandwich-ELISA, ett antal fördelar, som att de är ekonomiskt gynnsamma, specifika samt snabba (Karam C. et al., 2009).

21 st nationella referenslaboratorier med avseende på bluetongue (Bluetongue virus European Community national reference laboratories) deltog 2007 i ett färdighetstest. Syftet var att testa laboratoriernas förmåga att dels påvisa

antikroppar mot BT med hjälp av cELISA, dels påvisa viralt RNA med RT-PCR. Resultaten visade att alla de sex olika kommersiella ELISA-analyser som laboratorierna använde sig av, däribland ID-Vet, kunde detektera antikroppar mot de BTV-serotyper som nyligen eller för närvarande påvisats i Europa. Sensitiviteten varierade hos de olika laboratoriernas RT-PCR analyserna, men samtliga hade förmågan att påvisa BTV-8 RNA. Spädning av proverna gjordes i syfte att efterlikna poolning, varvid en del av testerna inte längre klarade att påvisa BTV-RNA. Slutsatsen blev därför att poolade prover innebär en risk att missa infekterade djur och icke poolade prover rekommenderas därför. (Batten C.A. et al., 2009).

I en holländsk studie (Kramps J. A. et al., 2008) jämfördes en indirekt ELISA (tillverkad av ID.VET, Montpellier, Frankrike) för att påvisa antikroppar mot BTV-8 i mjölk med en i sammanhanget rutinmässigt använd ELISA för antikroppsdetektion i serumprov (tillverkad av ID.VET, Montpellier, Frankrike). Med tillverkarens rekommenderade cut-off värde (se förklaring av detta begrepp under rubriken "metoder och material" nedan) på 50 % blev den relativa specificiteten respektive sensitiviteten 96,5 % respektive 98,9 %. I studien erhöles dock en optimal specificitet i kombination med en optimal sensitivitet med ett cut-off värde på 90 % istället, d.v.s. betydligt högre än det av tillverkaren rekommenderade värdet. Dock försämrades sensitiviteten och specificiteten i mycket liten utsträckning i intervallet 30-100 % med avseende på cut-off värden för testet. Cut-off värdet måste dock anpassas till den aktuella testsituationen. Det tänkta syftet i författarnas studie är att använda mjölk-ELISA:n för att leta efter kor som har infekterats med BTV. Om ett djur nyligen har infekterats och antikroppshalten därmed ännu är låg, behöver cut-off värdet vara lägre (ca 50 %) för att ELISA-testet ändå skall få ett positivt utslag. Positiva resultat på mjölkprov kan konfirmeras genom att även köra ett serumtest och/eller BTV-PCR. I studien erhöles S/P-värden (se förklaring av detta begrepp under rubriken "metoder och material" nedan) på mellan 100 och 250 % för mjölkprov från djur som var seropositiva avseende BTV-8.

I samma studie kördes även ett antal historiskt negativa mjölkprover, både individuella samt tankmjölk. Alla prov blev negativa med mjölk-ELISA:n och för individproverna blev medelvärdet för S/P 11,0 % med en standardavvikelse på 2,8 % och för tankmjölken var medelvärdet för S/P 10,2 % och standardavvikelsen 0,8 %. Undersökningar med prover utspädda fyra gånger gjordes också och författarnas slutsats var att testprestandan blev något försämrad med utspädda prover. Författarna kom även fram till att mjölk-ELISA:n var ett pålitligt diagnostiskt verktyg för påvisande av infektion med BTV-8 för utspädda prover och med ett cut-off värde mellan 30 % och 110 %. Andra fördelar är att mjölkprov är enkla samt billiga att ta. Slutsatsen var att mjölk-ELISA:n bör väljas i första hand, framför serumtestet. (Kramps J. A. et al., 2008).

Vandenbussche et al. (2008) påpekar vikten av pålitligheten hos diagnostiska hjälpmedel vid kontrollen av BT, men menar även att data gällande sensitiviteten (Se) och specificiteten (Sp) ofta saknas. I studien utvärderas och jämförs en kompetitiv ELISA (cELISA) samt en realtids RT-PCR (RT-qPCR). Den cELISA som användes var ID Screen® Bluetongue Competition assay tillverkad av ID VET. Specificiteten var i stort sett likvärdig; RT-qPCR: 98,5 % och cELISA: 98,2

%. Sensitiviteten var dock högre för RT-qPCR (99,5 %) jämfört med cELISA (87,8 %).

I en holländsk studie (van Weering et al., 2007) avseende den diagnostiska prestandan hos en antikropps-ELISA för påvisande av antikroppar för *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* fann man att cut-off värdet från tillverkaren (30 %) gav en relativt låg sensitivitet för tankmjölksprov. Författarna ville istället revidera cut-offen till 12,5 %. Laktationsstadium kan ha haft betydelse för testresultatet, med högre chans för positivt mjölk-ELISA-test i början av laktationen. En korrelation mellan resultat från individuella mjölk- respektive serumprov sågs. S/P-värden var generellt lägre för individuella mjölkprov än för serumprov. En klar koppling sågs mellan S/P-värdet för det utspädda provet och titern vid en undersökning av titerfördelningen i ett antal positiva mjölkprov.

Sjukdomskontroll

Dels kan man vaccinera mottagliga djur inom det aktuella området i syfte att få sjukdomssituationen under kontroll, dels rikta in sig på förebyggande åtgärder mot vektorerna. (Radostits O. M. et al., 2007).

Enligt Saegerman C. et al. (2008) är vaccination mot bluetongue det mest effektiva bekämpningsverktyget som går att använda i ett drabbat område. Huvudsyftet är att undvika klinisk sjukdom. Men vaccination används även för att få kontroll över sjukdomen samt för att möjliggöra säker handel med djur och möjligen även i syfte att utrota sjukdomen.

Även Gethmann J. et al. (2009) konstaterar att vaccination av mottagliga djurarter anses vara den bäst lämpade metoden för att få kontroll över bluetonguesmittan. Schwartz-Cornil I. et al. (2008) menar att inaktiverade vaccin som är riktade mot en specifik serotyp ger en skyddande immunitet och kan användas i syfte att få kontroll över epizootier.

I ett uttalande i Veterinary Record (16 feb 2008) säger Dr Chris Oura från the Institute for Animal Health, att 80 procent av antalet idisslare i ett område sannolikt behöver vaccineras för att få spridningen av virus under kontroll. Han påpekar även att det är viktigt att vaccinera djur så snart praktisk möjlighet finns. Dr Oura bedömer att det i England troligtvis blir nödvändigt att vaccinera under tre års tid för att få kontroll över sjukdomen.

Savini G. et al. (2008) drar slutsatsen att det är troligt att en utrotning av bluetongueviruset endast kan ske om klimatförhållandena och geografin är fördelaktiga. Kalla vintrar som omöjliggör övervintring, geografiska barriärer etc. försvårar och/eller förhindrar aktiviteten hos vektorerna. Denna slutsats, menar författarna, bygger dock på att vertikal BTV-överföring inte sker i insekter.

Vaccin mot bluetongue

De tillgängliga vaccin som finns mot bluetongue är antingen attenuerade eller avdödade. Deras immunitet är serotypspecifik. De avdödade vaccinen är säkra och kan användas i syfte att få kontroll över ett utbrott av bluetongue. Dock kan

ekonomiska hinder finnas eftersom mer än 80 % av idisslarna i ett område måste vaccineras för att tillräckligt många djur ska vara immuna för att stoppa smittspridningen på sikt. Detta innebär stora vaccinkostnader. (Schwartz-Cornil I. et al., 2008).

Savini et al. (2008) beskriver de olika former av vacciner som har använts mot bluetongue i Europa samt de vaccin som då var under utveckling. Det rör sig om avdödade vaccin, virusliknande partiklar (VLPs), som tillverkats av rekombinanta baculovirus, levande attenuerade vacciner (även kallade modifierade levande virus, MLVs) och levande rekombinanta vacciner. Alla har sina för- respektive nackdelar. Men det är bara avdödade vaccin samt levande attenuerade vaccin som har använts i kontrollprogram mot bluetongue i Europa till dags dato.

Fördelar med avdödade vaccin är att de är mycket säkra om de har tillverkats korrekt. De har visats vara i hög grad effektiva och möjlighet finns för att i framtiden skilja infekterade från vaccinerade djur via DIVA-metoden. De avdödade vaccinens nackdelar är deras höga produktionskostnad samt behovet av upprepade immuniseringar. Detta då avdödade vaccin generellt endast ger en övergående immunitet. (Savini G. et al., 2008).

Då korsvist skydd mellan serotyper inte förekommer i någon stor utsträckning försvåras arbetet mot bluetongue med vaccinationskampanjer. I det nyliga utbrottet av BTV-8 har avdödade vacciner från två olika företag använts. En immunisering har använts på får och två på nötkreatur. Arbeta med att ta fram alternativ till de traditionella vaccinerna pågår. T.ex. forskas det på BTV-liknande strukturer samt strukturer som liknar partiklar i viruskärnan. Dessa försök har hittills givit förhoppningsfulla resultat. (Patel & Heldens, 2009).

Utvärdering av effektiviteten hos ett vaccin baseras på kliniska och virologiska data samt på immunogeniciteten. Immunogeniciteten å andra sidan baseras på en analys av antikroppssvaret som en immunisering ger upphov till. Vaccinets effekt utvärderas hos vaccinerade djur genom inokulation av en infektiös dos av levande, virulent BTV. Vireminivån efter virusinokulationen anses vara det mest objektiva sättet att mäta effektiviteten hos den vaccininducerade immuniteten (Savini G. et al., 2008).

Hos nötkreatur har effektivitetsstudier gjorts på BTV-4 samt BTV-2- och 4-vaccin. Två doser av det avdödade BTV-4 eller BTV-2- och 4-vaccinet visade sig skydda mot viremi hos vaccinerade djur då de utsattes för virusinokulation en månad efter den senaste vaccindosen (Savini G. et al., 2008).

I länder som USA och Indien, finns MLVs tillgängliga för flera olika BTV-serotyper. De har även använts i Italien och Bulgarien. Deras fördelar är att de stimulerar ett starkt antikroppssvar, som en följd av deras förmåga att replikera i det vaccinerade djuret. De är också billiga att producera i stora kvantiteter, de genererar skyddande immunitet efter endast en vaccindos. Samt att de har visat sig vara effektiva vad gäller att skydda mot klinisk bluetongue. Nackdelar är möjlig attenuering i alltför låg grad. Andra potentiella bieffekter är nedsatt mjölkproduktion, abort/embryodöd samt teratogena effekter hos avkomma. Ytterligare en fara med MLVs är risken att de sprids av vektorer. Efter

immunisering med MLVs, cirkulerar det attenuerade viruset i blodet och kan då infektera vektorer och därigenom överföras till mottagliga värdjur. Det attenuerade vaccinviruset kan då eventuellt åter bli virulent eller utbyta gener med vilda virusstammar. Det är inte heller möjligt att kunna skilja vaccinerade från naturligt infekterade djur (Savini G. et al., 2008).

The European Food Safety Authority (EFSA) rekommenderar användningen av avdödade vaccin istället för levande dito. Detta eftersom de avdödade vaccinen visat sig vara säkra och effektiva (Gethmann J. et al., 2009).

2008 blev avdödade vaccin mot BTV-8 tillgängliga och omfattande vaccinationskampanjer genomfördes då i europeiska länder drabbade av bluetongue. Vaccinationerna styrdes via ett EU-direktiv och fick endast utföras i vissa områden. (Sternberg Lewerin S. et al., 2009).

Vaccinprestanda

Hamers et al. (2009) kommer i sin studie fram till att en enkeldos av ett avdödat, monovalent BTV-2 vaccin hos får genererar en stark immunitet som ger skydd i åtminstone ett år. Alla de vaccinerade får som ingick i undersökningen var friska under hela studietiden och inga kliniska symptom kunde ses, varför författarna drar slutsatsen att det är ett säkert vaccin. Får som i studien istället fick två vaccindoser fick virusneutralisationstitrar som hade ett 1,5 gånger högre högstavärde än de som immuniserades en gång. De djuren bibehöll även högre antikropstitrar under hela det år som observationer gjordes.

Gethmann J. et al. (2009) testade i en fältstudie säkerheten hos tre avdödade BTV-8-vaccin (BLUEVAC[®] 8, CZ Veterinaria, Spanien; BTVPUR[®] AISap 8, Merial, Frankrike; och Zulvac[®] 8 Ovis respektive Bovis, Fort Dodge, Nederländerna). Under studien bibehöll samtliga ingående djur en god hälsostatus. Inga tecken på anafylaktisk chock noterades hos något av djuren. Hos fåren sågs lokala svullnader efter den första vaccinationen och efter revaccinationen uppkom tydligare svullnader vid vaccinationsstället samt att några av djuren fick en övergående hypertermi. Bland nötkreaturen uppkom inga signifikanta kroppstemperaturstegringar och endast lindriga lokala svullnader kunde ses vid injektionsställena. Varken mjölkproduktionen hos korna eller celltalet i mjölken ändrades i någon signifikant utsträckning. Vad gäller eventuella reproduktionsstörningar så rapporterades inga aborter eller teratogena effekter bland nötkreaturen och ingen signifikant skillnad kunde heller ses hos de vaccinerade fåren med avseende på reproduktionsdata. Tre veckor efter den första vaccinationen av nötkreaturen hade 49 % av dem antikroppar mot bluetongue (alla var serologiskt negativa avseende BTV innan vaccinationen). Tre veckor efter revaccinationen var samma siffra uppe i 98,7 %.

Sveriges vaccinationskampanj

Sverige inledde sin vaccinationskampanj den 8 sep 2008, alltså två dagar efter att det första fallet av bluetongueinfektion upptäcktes. Man hade sedan tidigare utarbetat en vaccinationsplan som var baserad på en riskbedömning gällande risken för introduktion av BTV och möjliga konsekvenser för vild- och tamdjurspopulationen i Sverige. Utifall att infektion med BTV påträffades i landet

under den period då vektorer är aktiva eller att hotet för introduktion av virus blev överhängande skulle vaccination inledas. (Sternberg Lewerin S. et al., 2009).

Målet med vaccinationerna är att utrota bluetonguesmittan från Sverige (www.sjv.se).

De vaccin mot bluetongue som används i Sverige är tillverkade av Merial och finns på licens. Nötkreatur i besättningar med mer än 10 djur måste vaccineras i det område som bestämts av Jordbruksverket. De grundvaccineras två gånger med 3-6 veckors mellanrum och revaccination skall sedan ske senast 13 månader efter den sista grundvaccinationen. Även får ingår i vaccinationskampanjen, medan getter endast vaccineras på ägares eget initiativ. Får grundvaccineras endast en gång. (www.sjv.se)

I normala fall får vaccination ej ske mot sjukdomar som ingår i epizootilagen (SFS 1999:657). I 8 § finns dock anvisat att myndighet utsedd av regeringen, i detta fall Jordbruksverket (SJV) får beslutat om vaccination i enskilda fall. (<http://www.riksdagen.se/Webbnav/index.aspx?nid=3911&bet=1999:657>).

Alla aktioner i samband med bluetongueinfektionen i Sverige har letts av Jordbruksverket. Via delegation från SJV har sedan veterinärer deltagit i det praktiska arbetet på regional och lokal nivå. (Sternberg Lewerin S. et al., 2009).

Statliga medel används för att bekosta vaccin samt kringkostnader som vaccinationspersonal och resor. Djurägare är skyldig att hjälpa till i enlighet med epizootilagen. Sammanlagt ungefär 500000 djur har vaccinerats under hösten och vintern 2008. Under återvaccinationen som inleds i slutet av 2009 räknar man med att ca 1,1 miljoner nötkreatur och får kommer att vaccineras i södra Sverige. (www.sjv.se)

Utöver de vaccinationer som har genomförts och kommer att genomföras i södra Sverige så har även spärr- samt restriktionsområden upprättats i enlighet med SFS 1999:657. Ett spärrområde har radien 20 km och införs kring en smittad besättning. Restriktionsområdet tar vid utanför spärrområdet och har en radie på 150 km. Mellan spärr- och restriktionsområde samt ut från ett restriktionsområde finns begränsningar gällande hur värddjur för bluetongue får förflyttas. Inom ett restriktionsområde är det dock tillåtet att förflytta de aktuella djurslagen. Under den knottfria perioden är det tillåtet att flytta ovaccinerade djur ut ur spärr- och restriktionsområde efter provtagning enligt Jordbruksverkets anvisningar. (www.sjv.se)

Utvecklingen av bluetongue i Sverige och Europa

Tre kalvar infekterade med BTV-8 påvisades i Sverige under vårvintern 2009, men i övrigt har inga smittade djur påträffats sedan hösten 2008. I Europa ses en starkt nedåtgående trend vad gäller antal infekterade djur sedan vaccinationerna mot bluetongue inleddes. Ett 70-tal fall av smitta med BTV-8 har påvisats i år i Europa, vilket kan jämföras med drygt 50000 fall mellan hösten 2007 och våren 2008, innan vaccinationerna inleddes. (www.sjv.se)

EU:s policy gällande bluetongue

EU:s policy gällande bluetongue har vuxit fram parallellt med sjukdomens allt större utbredning i Europa under de senaste tio åren. Direktivet 2000/75/EEC innehåller riktlinjer för EU:s policy gällande bluetongue och är skrivet på så sätt att det skall kunna anpassas till rådande lokala omständigheter. Om ett utbrott av bluetongue konstateras eller misstänks i ett medlemsland i EU måste landet följa direktivets riktlinjer för bekämpning av sjukdomen. Ett restriktionsområde upprättas med en radie av minst 20 km runt den/de infekterade besättningen/besättningarna. En skyddszon (100 km radie) samt en övervakningszon (sträcker sig minst 50 km bortom skyddszonens gräns) sätts också upp. Dessa restriktionsområden hävs inte förrän viruset har utrotats och sjukdomen inte längre förekommer i området.

EU:s bluetonguepolicy har tre huvudsakliga områden: övervakning och överföring/utbyte av epidemiologisk information, proportionerliga restriktioner vad gäller djurförflyttningar, samt vaccinationer. Övervakningsprogram införs i restriktionsområden och syftet är att inhämta information om bluetongues spridning och utveckling. Det innebär dels serologisk övervakning, men även ett program där vektorer fångas i särskilda fällor för att uppskatta en eventuell säsongsmässig variation i antalet vektorer. Utanför restriktionsområdena pågår en passiv klinisk övervakning för att tidigt få in varningar om eventuella kliniska fall av bluetongue samt serologisk övervakning och studier av vektorer i området. Ett informationssystem kallat BT-net har etablerats för att samla och utbyta information om BT-övervakning inom EU samt länder som gränsar till unionen. (Saegerman C. et al., 2008).

METODER OCH MATERIAL

Mjolkprover har tagits in från en småländsk samt 27 halländska mjölkbesättningar, vilka alla har djur vaccinerade mot bluetongue. Det är ett urval av tankmjölksprov, individuella mjölkprov samt samlingsprov från ett fåtal kor. Proverna är tagna vid tre olika tidpunkter från dess att grundvaccination har skett. Tiderna är 5, 8 respektive 12 månader efter grundvaccinationen. Inga av djuren hade ännu hunnit vaccineras en tredje gång. Som en negativ kontroll har även mjolkprover från 18 jämtländska besättningar tagits, alla med djur som inte har vaccinerats mot bluetongue. Bland de negativa kontrollerna finns också tio individuella mjölkprov från ovaccinerade djur från en gård i Södertälje.

För att utvärdera antikroppsinnehållet i mjolkproverna har en indirekt antikropps-ELISA använts. Det franska företag som har tagit fram ELISA-testet heter ID Vet och produktens namn är ID Screen[®] Bluetongue Milk Indirect. Proverna har körts på laboratorium på SVA i Uppsala.

För varje mjolkprov räknas ett S/P-värde fram enligt följande formel:

$$S/P = \frac{OD_{\text{prov}} - OD_{\text{NK}}}{OD_{\text{PK}} - OD_{\text{NK}}} * 100$$

Där NK står för negativ kontroll och PK för positiv kontroll. OD är en förkortning för optisk densitet och anges i formeln för provet samt de positiva och negativa kontrollerna i testet. S/P är en förkortning för "sample positive ratio" och anger storleksförhållandet mellan prov och positiv kontroll. Ju högre nivån av antikroppar är i mjölkprovet, desto högre blir S/P-värdet och vice versa. Resultatet får enheten procent och tolkas enligt tillverkaren ID Vet enligt tabell 2 då det gäller tankmjölksprov.

Tabell 2. Cut off-värden för tankmjölksprover

Resultat (S/P %)	Provets status
S/P % \leq 30 %	Negativt
30 % < S/P % < 40 %	Tveksamt
S/P \geq 40 %	Positivt

För individuella mjölkprov är gränsvärdet, det så kallade cut off-värdet, för att provet skall anses vara positivt högre och återfinns i tabell 3.

Tabell 3. Cut off-värden för individuella mjölkprover

Resultat (S/P %)	Provets status
S/P % \leq 90 %	Negativt
90 % < S/P % < 110 %	Tveksamt
S/P \geq 110 %	Positivt

Cut off-värdena är således 30 % för tankmjölk och 90 % för individmjölk.

Resultaten från den småländska besättningen där individuella mjölkprov har tagit kan ses i tabell 4. Från besättningar i Halland har dels tankmjölksprover, dels poolade mjölkprov från 3-5 förstakalvare tagits. Analysen av de poolade proverna ger möjlighet att studera hur de yngsta korna svarar på vaccinet. Med i studien är främst medelstora mjölkfogårdar, vilka alla är med i kokontrollen. Proverna från Halland har tagits i två omgångar, dels under våren, dels under tidig höst. Gårdarna är inte slumpmässigt utvalda, utan har valts med tanke på praktiska omständigheter. En del av proverna har t.ex. samlats in i samband med en annan studie. Det är inte samma halländska gårdar som är provtagna på våren respektive under hösten. Resultaten från de halländska proverna redovisas i tabellerna 5 och 6.

Från de ovaccinerade besättningarna i Jämtland har tankmjölksprover och samlingsprover tagits, vars sammanfattade resultat redovisas i tabell 8. Dessutom finns individuella mjölkprover från tio ovaccinerade djur i Södertälje, vilka har sammanställts i tabell 9.

Vid de tankmjölksscreeningar som genomförts i Sverige i syfte att leta efter naturligt infekterade djur hittades hösten 2008 några positiva tankmjölksprov. Ett fåtal av dessa provresultat redovisas i tabell 10.

RESULTAT

I tabellerna 4-12 nedan redovisas resultaten från de prover som tagits inom ramen för detta examensarbete samt prover som tidigare har körts på tre besättningar där naturligt infekterade djur har påträffats vid rutinmässiga screeningundersökningar.

För att ge en bild över spridningen av resultaten har medelvärde samt standardavvikelser räknats ut för värden från vaccinerade samt ovaccinerade djur. Dessa framgår av tabellerna 7-9 samt 11 och 12.

Fig. 3 visar fördelningen av resultaten från de vaccinerade djuren.

Tabell 4. Individuella mjölkprover samt tankmjölksprov från en vaccinerad besättning i Småland. Proven är tagna ca 8 mån efter grundvaccination

Besättn.	Född	Senaste kalvning	Material	Senast vacc.	Provdatum	Tid från vacc. till prov	S/P %
Småland	-97	090823	ind. mjölk	090115	090914	8 mån	23
”	-03	090626	”	”	”	”	17
”	-03	090414	”	”	”	”	20
”	-03	090702	”	”	”	”	14
”	-03	090717	”	”	”	”	20
”	-04	090111	”	”	”	”	19
”	-04	090414	”	”	”	”	12
”	-05	090224	”	”	”	”	44
”	-05	090515	”	”	”	”	10
”	-05	090223	”	”	”	”	56
”	-05	090611	”	”	”	”	20
”	-05	090306	”	”	”	”	17
”	-06	080822	”	”	”	”	45
”	-06	090815	”	”	”	”	16
”	-02	081214	”	”	”	”	21
”	-06	090211	”	”	”	”	10
”	-06	090806	”	”	”	”	60
”	-06	090715	”	”	”	”	27
”	-07	090714	”	”	”	”	21
”	-07	090622	”	”	”	”	10
”	-07	090526	”	”	”	”	11
”	-07	090801	”	”	”	”	24
”	-06	090904	”	”	”	”	60
”	-03	090802	”	”	”	”	29
”			tank- mjölk	”	”	”	22

Tabell 5. Tankmjölksprover samt samlingsprover tagna 5 mån efter grundvaccination från 17 besättningar i Halland

Besättning	Material	Provdatum	Tid från vacc. till prov	S/P %
Halland, besättning 1	tankmjölk	maj-juni -09	ca 5 mån	76
	saml.prov	”	”	30
Halland, besättning 2	tankmjölk	”	”	37
	saml.prov	”	”	27
Halland, besättning 3	tankmjölk	”	”	42
	saml.prov	”	”	45
Halland, besättning 4	tankmjölk	”	”	43
	saml.prov	”	”	100
Halland, besättning 5	tankmjölk	”	”	137
	saml.prov	”	”	76
Halland, besättning 6	tankmjölk	”	”	61
	saml.prov	”	”	35
Halland, besättning 7	tankmjölk	”	”	56
	saml.prov	”	”	61
Halland, besättning 8	tankmjölk	”	”	31
	saml.prov	”	”	32
Halland, besättning 9	tankmjölk	”	”	16
	saml.prov	”	”	103
Halland, besättning 10	tankmjölk	”	”	21
	saml.prov	”	”	27
Halland, besättning 11	tankmjölk	”	”	24
	saml.prov	”	”	18
Halland, besättning 12	tankmjölk	”	”	33
	saml.prov	”	”	73
Halland, besättning 13	tankmjölk	”	”	30
	saml.prov	”	”	77
Halland, besättning 14	tankmjölk	”	”	34
	saml.prov	”	”	39
Halland, besättning 15	tankmjölk	”	”	21
	saml.prov	”	”	23

Halland, besättning 16	tankmjölk saml.prov	”	”	31 41
Halland, besättning 17	tankmjölk saml.prov	”	”	22 27

Tabell 6. Tankmjölksprover samt samlingsprover från 10 vaccinerade besättningar i Halland. Proven är tagna ca 12 mån efter grundvaccination

Besättning	Material	Senast vacc.	Provdatum	Tid från vacc. till prov	S/P %
Halland, besättning 18	tankmjölk saml.prov	081015 ”	091012 ”	12 mån ”	78 154
Halland, besättning 19	tankmjölk saml.prov	081015 ”	091009 ”	12 mån ”	56 47
Halland, besättning 20	tankmjölk saml.prov	081015 ”	091008 ”	12 mån ”	52 64
Halland, besättning 21	tankmjölk saml.prov	081014 ”	091008 ”	12 mån ”	57 85
Halland, besättning 22	tankmjölk saml.prov	081008 ”	091008 ”	12 mån ”	52 63
Halland, besättning 23	tankmjölk saml.prov	081020 ”	091008 ”	11,5 mån ”	47 149
Halland, besättning 24	tankmjölk saml.prov	081006 ”	091008 ”	12 mån ”	34 30
Halland, besättning 25	tankmjölk saml.prov	081008 ”	091008 ”	12 mån ”	45 24
Halland, besättning 26	tankmjölk saml.prov	okt -08 ”	091012 ”	12 mån ”	76 69
Halland, besättning 27	tankmjölk saml.prov	okt -08 ”	091012 ”	12 mån ”	20 29

I tabellerna 7, 8 och 9 ses en sammanställning över provresultaten från de vaccinerade djuren i Småland och Halland.

Tabell 7. Medelvärde och standardavvikelse för S/P för individuella mjölkprov från 24 vaccinerade kor från en småländsk besättning 8 mån efter grundvaccination

S/P (%)	Medelvärde	Standardavvikelse
	25	16

Tabell 8. Medelvärde och standardavvikelse för S/P för tankmjölksprov från 17 vaccinerade besättningar i Halland 5 mån efter grundvaccination

S/P (%)	Medelvärde	Standardavvikelse
	42	29

Tabell 9. Medelvärde och standardavvikelse för S/P för tankmjölksprov från 10 vaccinerade besättningar i Halland 12 mån efter grundvaccination

S/P (%)	Medelvärde	Standardavvikelse
	52	17

Tabell 10. Tankmjölksprover från tre svenska besättningar som har haft naturligt infekterade djur hösten 2008

Besättning	Material	Provdatum	S/P %
A	tankmjölk	hösten 2008	59
B	”	”	85
C	”	”	48

Tabell 11. Medelvärde samt standardavvikelse för S/P för tankmjölksprover tagna från 18 ovaccinerade besättningar i Jämtland

S/P (%)	Medelvärde	Standardavvikelse
	6,1	0,9

Tabell 12. Medelvärde och standardavvikelse för S/P för individuella mjölkprover från 10 ovaccinerade kor i Södertälje

S/P (%)	Medelvärde	Standardavvikelse
	6,8	1,4

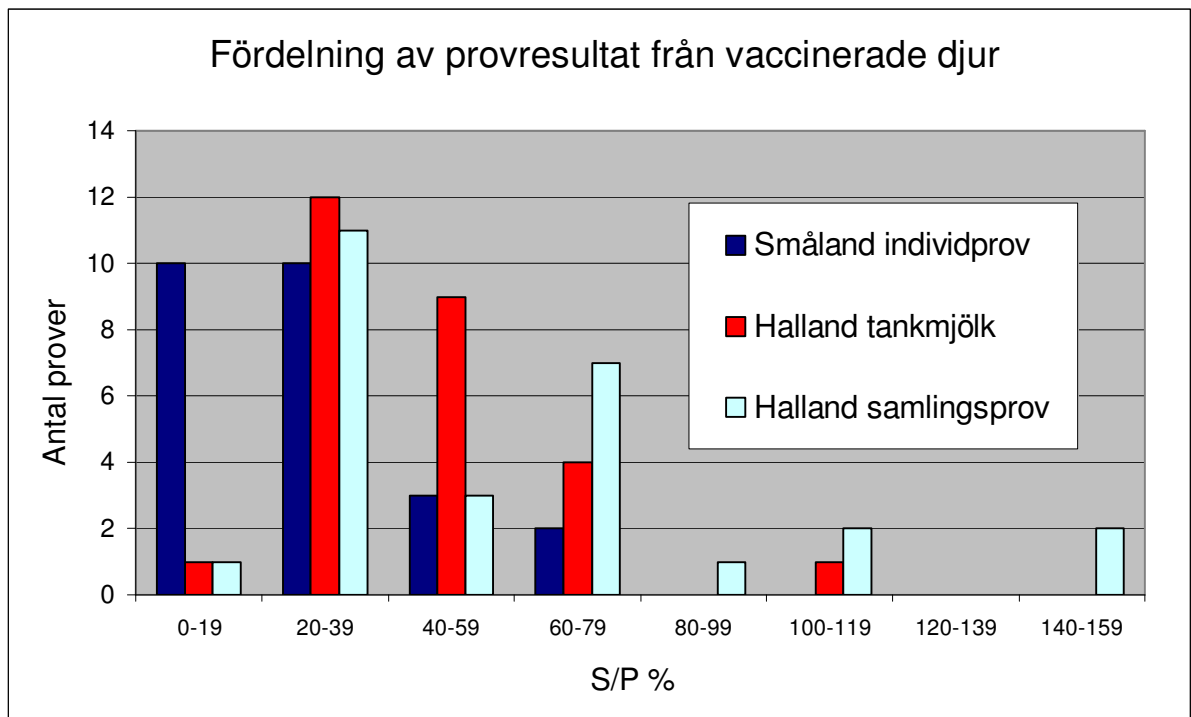


Fig.3. Här ses fördelningen av provresultaten från gården i Småland samt de halländska besättningarna.

DISKUSSION

Individproverna från de småländska korna hade generellt sett låga S/P-värden. Några av dem var till och med nere på samma låga nivå som en del av de ovaccinerade individerna hade i studien. Nästan en femtedel av de småländska djuren (fem kor) hade dock värden som utmärkte sig genom att vara betydligt högre än de övriga. Spridningen var således stor resultatmässigt, med en standardavvikelse för S/P på 16 och medelvärdet 25. Medelvärdet ligger nära S/P-värdet för tankmjölksprovet som var 22 %. Dessa individskillnader vad gäller S/P-värdet kan delvis tänkas vara åldersberoende. Alla de fem korna med högre värden var födda 2005 eller senare, medan individer födda tidigare än så överlag hade låga värden. Denna bild stämmer dock inte full ut, i och med att djur födda 2007 stod för några av de lägsta värdena totalt sett. Laktationsstadiet är en annan faktor som kan ha inverkan på S/P-värdet (van Weering et al., 2007) då chansen för en positiv mjölk-ELISA i studien visade sig vara större i laktationens inledning än senare under laktationstiden. Någon tydlig tendens för detta går dock inte att utläsa av testresultaten.

I studien går det inte att se någon generell sjunkande trend bland testvärdena kopplat till en längre förfluten tid efter grundvaccination. Tvärtom, så är medelvärdet för S/P i tankmjölk 12 månader efter vaccination högre än samma värde 5 månader efter vaccination bland Hallandsbesättningarna. Och medelvärdet för S/P vad gäller individproverna tagna 8 månader efter vaccination är lägre än båda medelvärdena från tankmjölken. Dock är antalet prover ganska litet, varför det inte går att dra några alltför långtgående slutsatser av resultaten. Men tänkas kan att andra faktorer än den faktiska tiden efter vaccination har en betydande inverkan på S/P-värdet. T.ex. kan det vara förhållanden som att

enskilda individers immunsvaret kan svara olika på vaccinet och att kvaliteten vid själva vaccinationstillfällena skiljer sig åt. Alla djur kanske exempelvis inte har fått i sig riktigt hela vaccindosen på grund av olika omständigheter. Ofta har vaccinationerna utförts som massvaccinationer, d.v.s. många djur har vaccinerats under kort tid. Det kan tänkas att kvaliteten på injektionerna ibland har blivit något lidande av detta som en följd av det höga arbetstempot. Som nämnts ovan kan även ålder och laktationsstatus hos djuren inverka. Det allmänna hälsoläget i besättningen kan också det ha betydelse för hur antikroppsstatusen hos djuren blir.

Immunskyddet hos en individ med ett högre S/P-värde torde vara bättre än för ett djur med ett lägre värde. Det går dock inte att ge någon allmängiltig lägstanivå för antikroppar under vilken individen inte har något skydd mot en bluetongueinfektion. Även om S/P-värdet är lågt har individen fördelar av att ha kommit i kontakt med vaccinet. S/P-värdet säger t.ex. inget om individens cellmedierade svar, vilket också ingår i immunsvaret mot bluetongue (Schwartz-Cornil I. et al., 2008, Jeggo M. H. & Wardley R. C., 1985). Tack vare det immunologiska minnet som byggs upp efter en vaccination reagerar individens immunförsvar också snabbare om den senare skulle utsättas för en infektion med BTV. Sammanfattningsvis bör även kor med individuellt låga antikropps nivåer ändå ha skydd mot klinisk bluetongue. Däremot kan det möjligen vara tveksamt huruvida de är skyddade mot att överföra en BTV-8-infektion till sina foster.

Vid tolkningen av resultaten måste det tas med i beräkningen att de antikropps nivåer som mjölkproverna visar på inte är en helt sann bild. Serumnivåerna av antikroppar kan vara högre än motsvarande nivå i mjölken. Detta stöds av van Weering et al. (2007) som i sin studie fick som resultat att S/P-värden generellt var högre för individuella serumprov än för mjölkprov, även om detta gällde en annan sorts antikroppar.

Cut off-värdena på 30 % för tankmjölksprov och 90 % för individmjölk som tillverkaren av ELISA-testet rekommenderar kan ifrågasättas. Om dessa används skulle 75 % (21/28) av tankmjölksproverna från vaccinerade djur räknas som positiva. Samlingsproverna har högre toppvärden avseende S/P. Totalt sett är det dock endast 74 % (20/27) av dessa prover som överstiger ett cut off-värde på 30 % och därmed skulle räknas som positiva. Det är också många av resultaten från både tankmjölks- och samlingsproverna som befinner sig inom intervallet där de räknas som tveksamma. För individprovernas del så skulle inte ett enda värde räknas som positivt vad gäller antikroppar mot BTV om cut off-värdet på 90 % används. Väljer man att istället använda 30 % som cut off-värde för individproverna så skulle ändå bara 21 % betraktas som positiva (5/24). Risken med ett för högt cut off-värde är att alltför många individer eller besättningar inte betraktas ha antikroppar mot BTV även om de är vaccinerade enligt riktlinjer från vaccintillverkaren. Cut off-värdet måste sättas i relation till vad man vill uppnå med testet och den antikropps nivå som kan förväntas antingen bland vaccinerade eller bland naturligt infekterade djur.

För svenska förhållanden när det gäller att med mjölk-ELISA:n avgöra om ett vaccinerat djur har antikroppar eller ej mot BTV så kan istället ett övre cut off-värde för S/P på 20 % anses vara rimligt. Denna gräns skulle kunna användas både för tankmjölk och för individmjölk. Som gråzon kan 10-20 % fungera och

under 10 % kan provet räknas som negativt. Om 20 % används som övre cut off-värde skulle 96 % (27/28) av samtliga tankmjölksprover från vaccinerade djur i studien räknas som positiva. Av individproverna från vaccinerade djur skulle 71 % (14/24) betraktas som positiva med ett reviderat cut off-värde på 20 %. Fler individprover från vaccinerade och ovaccinerade djur behöver dock undersökas för att få en bättre uppfattning om ett adekvat cut off-värde för S/P.

Tankmjölks- och samlingsproverna från respektive besättning skiljer sig inte åt i någon markant utsträckning. Från 67 % (18/27) av de halländska besättningarna var S/P-värdet från samlingsprovet högre än dito från tankmjölken. I några av fallen var dock differenserna mellan tankmjölks- och samlingsprovsvärdena mycket stora. Från besättning 9 var t.ex. tankmjölksvärdet 16 % och samlingsprovsvärdet 103. När värdena är så pass höga som 100 % och mer (Kramps et al., 2008) så kan det misstänkas att någon/några av individerna har blivit naturligt infekterade av BTV innan vaccinationen genomfördes. För att få klarhet i detta kan individerna testas med PCR för att leta efter eventuell nukleinsyra från BTV i blodet under den period som antigenet kan förväntas finnas kvar hos djuret.

Testresultaten från de ovaccinerade korna ligger alla väl samlade kring ett lågt S/P-värde på mellan 4-9 % för tankmjölksproven. De individuella proverna hamnade också i detta intervall, med undantag för ett prov som uppgick till 10 %. Medelvärde + 3 standardavvikelser för S/P för tankmjölksprover från de ovaccinerade djuren uppgår till 8,9 %. Baserat på testdata innebär detta att 99,9 % av testresultaten från ovaccinerade djur har ett S/P-värde som kan förväntas understiga 8,9 %. Resultaten från de ovaccinerade djuren i denna undersökning är också i linje med de som Kramps et al. (2008) fick i sin studie med ett medelvärde för de negativa tankmjölksproverna på 10 % respektive 11 % för individproverna. Att de ovaccinerade korna överlag testades med låga S/P-värden är även ett tydligt tecken på att ELISA-testet i studien fungerar på ett tillförlitligt sätt och är ett bra övervakningsinstrument i detta sammanhang.

Att vaccinet ger så pass låga S/P-värden enligt studien gör att det torde kunna gå att använda ELISA-testet för att skilja ut djur infekterade med BTV från vaccinerade djur. Dels kan de ha infekterats med BTV-8 innan vaccinationen, dels kan de efter vaccination ha infekterats med en annan serotyp av BTV. Det finns dock i nuläget inga undersökningar som har påvisat någon annan serotyp av BTV i Sverige än BTV-8.

Att prevalensen av bluetongue har sjunkit dramatiskt i Europa i år positivt. Det är dock vanskligt att dra slutsatser om i vilken utsträckning vaccination av idisslare i området är orsak till detta då det är svårt att få en överblick över smittosituationen. Vaccinationen har dock sannolikt bidragit till den förbättrade situationen. I Sverige har endast tre fall av bluetongue hos kalvar rapporterats under detta år. Men det är även här svårt att veta i vilken grad den förbättrade smittosituationen beror på Sveriges vaccinationskampanj. Det kan vara så att det inte har funnits någon BT-smitta i landet i år. Vektorer har fångats in i fällor, men man har inte letat efter bluetonguevirus hos svidknotten. Norge har valt att inte vaccinera alls och inte heller där har något fall av sjukdomen rapporterats in under 2009.

Vidare undersökningar som en förlängning av examensarbetet kommer att följa upp tankmjölks- och individprover efter den tredje vaccinationen som görs under senare delen av hösten 2009. Det vore intressant att se hur höga S/P-värdena blir nära efter revaccinationen men vore även av värde att provtaga djuren och undersöka S/P-värdena vid något senare tillfälle under 2010. Att följa antikroppsutvecklingen med serumneutralisationstest vore även det av intresse. Ett sådant test kan vara känsligare än ett ELISA-test. Fler prover beöver överlag tas för att få en säkrare bild över situationen hos de vaccinerade djuren. Dessutom kan det, som nämnts ovan, finnas anledning att göra vidare undersökningar avseende eventuell naturlig infektion kopplat till de samlingsprov med markant högre S/P-värden som erhöles i denna studie.

LITTERATURFÖRTECKNING

Böcker och artiklar

- Batten C.A. et al. (2009) Bluetongue virus: European Community proficiency test (2007) to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods with special reference to pooling of samples. *Vet Microbiol.* Vol 135, issues 3-4, 30 Mar, pp. 380-383.
- Carpenter S. et al. (2009) Culicoides and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends Microbiol.* Vol. 17 No. 4. Review.
- Dal Pozzo F. et al. (2009a) Bluetongue: state of the art and European situation. Proceedings, European Buiatrics Forum, Marseille, 1-3 Dec 2009, pp. 127-133.
- Dal Pozzo F. et al. (2009b) Experimental reproduction of bluetongue virus serotype 8 clinical disease in calves. *Vet Microbiol.* Vol 136, issues 3-4, 12 May, pp. 352-358.
- Darpe K. E. et al. (2007) Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Vet Rec.* 161:253-261.
- DeMaula C.D. et al. (2002) The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology.* May 10;296(2):330-7.
- Gethmann J. et al. (2009) Comparative safety study of three inactivated BTV-8 vaccines in sheep and cattle under field conditions. *Vaccine.* Jun 24; 27(31): 4118-26.
- Hamers C. et al. (2009) Protective duration of immunity if an inactivated bluetongue (BTV) serotype 2 vaccine against a virulent BTV serotype 2 challenge in sheep. *Vaccine.* MayII; 27(21):2789-93.

- Jeggo M. H. & Wardley R. C. (1985) Bluetongue vaccine: cells and/or antibodies. *Vaccine*. Mar;3(1):57-8.
- Karam C. et al. (2009) A polyclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of bluetongue virus in cell culture and blood of sheep infected experimentally. *J Virol Methods*. 160, pp. 189-192.
- Kramps J. A. et al. (2008) Validation of a commercial ELISA for the detection of bluetongue virus (BTV)-specific antibodies in individual milk samples of Dutch dairy cows. *Vet Microbiol*. 130 pp. 80-87.
- Maan S. et al. (2008) Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology*. Vol 377, Issue 2, 1 Aug, pp. 308-318.
- MacLachlan N.J. et al. (1990) The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. *Vet. Pathol*. Jul; 27(4):223-9.
- MacLachlan N.J et al. (2009) The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue. *J Comp Pathol*. Vol 141, Issue 1, Jul, pp. 1-16.
- Menzies F. D. et al. (2008) Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Vet Rec*. 163:203-309.
- News & Reports: Vaccination considered the only practical safeguard against bluetongue. *Vet Rec*. 2008 Feb 16; 162(7): 194-5.
- Patel J. R. & Heldens J. G. M. (2009) Immunoprophylaxis against important virus diseases of horses, farm animals and birds. *Vaccine*. Mar 13;27 (12):1797-1810. Review.
- Purse B. V. et al. (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 3. s. 171-181.
- Radostits O. et al. (2007) *Veterinary medicine - the textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10 ed. Spain: Saunders.
- Saegerman C. et al. (Ed.) (2008) *Bluetongue in northern Europe*. ISBN: 978-92-9044-719-1.
- Savini G. et al. (2008) Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. Mar;31(2-3):101-20.

Schwartz-Cornil I. et al. (2008) Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.* 39:46

Sternberg Lewerin S. et al. (2008) Infection with bluetongue serotype 8 in Sweden 2008. Acceptorad i *Vet Rec.*

Takamatsu H. et al. (2003) A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *J Gen Virol* 84, pp. 227-235.

Vandenbussche F. et al. (2008) Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. *Vet Microbiol.* Vol 129, Issues 1-2, 25 May, pp. 15-27.

Van Weering H. et al. (2007) Diagnostic performance of the pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Vet Microbiol.* Vol 125, Issues 1-2, 15 Nov, pp. 49-58.

Ågren E. (2009) A likely way of introduction of BTV8 to Sweden in August 2008 - comparison of results from two models for atmospheric transport of the biting midge vector. Unpublished results. 2009. Acceptorad i *Vet Rec.*

Internet

EC – Europakommissionen. Hemsida [online](2009-12-15) Tillgänglig: http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bt_restrictedzones.pdf. [2009-12-07]

EU Surveillance network for Bluetongue. Hemsida [online](2009-12-04) Tillgänglig: <http://eubtnet.izs.it/btnet/reports/BTV8.html>. [2009-12-04]

Nature Reviews Microbiology. [online](feb 2005) Tillgänglig: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/fig_tab/nrmicro1090_F2.html . [2009-10-20]

OIE – Världorganisationen för djurhälsa. Hemsida [online](2002-04-22) Tillgänglig: http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A090.htm. [2009-10-08]

OIE – Världorganisationen för djurhälsa. Hemsida [online](2009) Tillgänglig: http://www.oie.int/eng/Normes/mcode/en_chapitre_1.8.3.htm#rubrique_fievre_catarr_hale_du_mouton_controle. [2009-11-10]

SJV – Statens Jordbruksverk. Hemsida [online] Tillgänglig: <http://www.sjv.se>. [aug-dec 2009]

SJV – Statens Jordbruksverk, karta över vaccinationsområdet för bluetongue. Hemsida [online](2009-02-18) Tillgänglig:
<http://www.jordbruksverket.se/download/18.2ce1c8ad1213e6b28d48000228/Karta+%C3%B6ver+vaccinationsomr%C3%A5det+i+Sverige>. [2009-11-14]

SVA – Statens Veterinärmedicinska Anstalt. Hemsida [online](2008-10-03) Tillgänglig:
<http://www.sva.se/sv/navigera/Djurhalsa/Epizootisjukdomar/Bluetongue-samlad-information/Vaccinering-mot-bluetongue>. [2009-11-02]

Sveriges Riksdag; Svensk författningssamling, epizootilag. Hemsida [online] Tillgänglig:
<http://www.riksdagen.se/Webbnav/index.aspx?nid=3911&bet=1999:657>. [2009-11-17]

Personligt meddelande

Ander, Mats. Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala. Mailkontakt, december 2009.