

# Produzione e controllo di efficacia di un vaccino vivo attenuato per l'ectima contagioso ovino

Maria Teresa Mercante, Rossella Lelli, Gaetano Federico Ronchi & Attilio Pini

## Riassunto

L'agente eziologico responsabile dell'ectima contagioso è il virus Orf, appartenente alla famiglia *Poxviridae*, genere *Parapoxvirus*. Negli allevamenti colpiti la morbilità raggiunge il 100 % mentre la mortalità è compresa tra l'1 e il 10 %. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale' (IZS A&M) ha prodotto, secondo *Farmacopea Europea*, un vaccino vivo attenuato contro l'ectima contagioso degli ovini. Il ceppo di campo utilizzato è stato attenuato mediante passaggi seriali su fibroblasti primari di embrioni di pollo e quindi liofilizzato a rappresentare la master seed dalla quale è stato allestito il vaccino. L'innocuità del vaccino è stata valutata, su 20 agnelli di età compresa tra 10 e 15 giorni e 20 pecore gestanti nel secondo periodo di gravidanza, per somministrazione di dose unica, 10 dosi e due dosi ripetute a distanza di una settimana l'una dall'altra, ogni singola dose pari ad 1 ml, somministrata per via intramuscolare, aveva titolo di  $10^{4.5} \text{TCID}_{50}$ . L'immunogenicità è stata valutata su 10 pecore 10 agnelli inoculati con la dose vaccinale e un gruppo di 5 agnelli e 5 pecore come controllo. Gli animali inoculati sono stati monitorati sierologicamente mediante ELISA indiretta. Al 30° giorno dalla vaccinazione gli animali sono stati sottoposti a challenge mediante inoculazione per via intradermica nella regione labiale di un ceppo di campo di ectima. Tutti gli animali vaccinati non hanno mostrato segni clinici a differenza dei controlli che hanno manifestato i segni clinici dell'ectima contagioso. Ad ulteriore conferma dell'efficacia del vaccino è stata

condotta una sperimentazione in campo su quattro allevamenti con malattia in atto. Lo studio dell'evoluzione delle lesioni cliniche da ectima contagioso nei soggetti vaccinati ha evidenziato una rapida remissione della sintomatologia clinica.

## Parole chiave

Ectima contagioso ovino, Orf, *Parapoxvirus*, Pecore, *Poxviridae*, Vaccino, Virus.

## Introduzione

L'ectima contagioso è una patologia ad alta trasmissibilità dei piccoli ruminanti, in particolare di pecore e capre. Occasionalmente è stata descritta nei grossi ruminanti domestici e selvatici, può colpire anche l'uomo. E' presente in tutto il mondo, sono indenni solo Madagascar, Giappone, Indonesia e isole come le Seychelles e la Polinesia francese (1, 3). La malattia è caratterizzata da eruzioni a carico della cute e delle mucose; particolarmente interessate risultano le labbra, la mammella, le gengive ed il cavo orale (7). L'agente eziologico responsabile è il virus Orf, appartenente alla famiglia *Poxviridae*, genere *Parapoxvirus*.

Nelle aree ad alta densità ovina e caprina la malattia tende ad endemizzare provocando gravi perdite economiche (5). Negli allevamenti la morbilità può raggiungere il 100 % (6), mentre la mortalità si limita all'1 %, anche se, in situazioni di stress ed immunodepressione può raggiungere il 10 % (3). Nonostante la malattia colpisca animali di tutte le età, nei giovani si osservano le forme

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale' (IZS A&M), Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italy  
t.mercante@izs.it

cliniche più gravi (2) in quanto gli adulti, probabilmente a seguito di infezioni pregresse, sono provvisti di immunità acquisita. La diffusione e l'endemizzazione dell'infezione sono correlate all'elevata resistenza del *virus* Orf nell'ambiente. In condizioni ambientali favorevoli il virus, protetto dal materiale crostoso, è in grado di resistere anche per alcuni anni, per questo motivo, nella aree ad elevata densità ovina e caprina, il risanamento mediante profilassi diretta risulta impraticabile, l'unica via percorribile risulta quindi essere quella della vaccinazione.

I primi tentativi di immunizzazione specifica con esito favorevole risalgono al 1923. Il vaccino era ottenuto mediante polverizzazione e sospensione in glicerina di materiale crostoso infetto. La vaccinazione veniva effettuata mediante scarificazione (9). Questo tipo di vaccinazione, è ancora utilizzato dagli allevatori ma può applicarsi solo successivamente all'infezione ed inoltre contribuisce alla contaminazione ambientale (1).

Nel lavoro qui riportato si descrive la messa a punto di un vaccino attenuato contro l'ectima contagioso, prodotto e controllato secondo *Farmacopea Europea*, in grado di proteggere il patrimonio ovino nazionale da questa malattia che è causa di gravi danni economici agli allevatori.

## Materiali e metodi

### Ceppo virale

Il ceppo virale utilizzato per la preparazione della semenza virale, identificato con la sigla 10177/TE, è stato isolato da materiale patologico ottenuto da porzioni di tessuto escisso, in corrispondenza delle lesioni labiali, da ovini appartenenti ad un gregge con infezione in atto. Le porzioni di tessuto, sospese in PBS, sono state omogeneizzate e successivamente filtrate con membrane da 0,22 µm. La sospensione virale era quindi utilizzata per infettare monostrati di fibroblasti primari di embrioni di pollo allestiti a partire da uova SPF. Al raggiungimento del 70 % di effetto citopatico (ECP), il materiale è stato raccolto, aliquotato e congelato a -70°C +10°C, per costituire lo stock di lavoro. Una aliquota

prelevata prima del congelamento è stata sottoposta alle prove di identificazione, purezza, assenza di contaminanti batterici e mycoplasmi. Il titolo infettante, saggiato su fibroblasti embrionali di pollo, era 10<sup>4,5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml.

### Attenuazione del ceppo virale, controllo del grado di attenuazione e prove di rivirulentazione

Un' aliquota dello stock di lavoro è stata sottoposta a processo di attenuazione mediante dieci passaggi seriali su fibroblasti primari di embrione di pollo (10). Al 10° passaggio è stato prodotto, aliquotato e sottoposto a processo di liofilizzazione uno stock di riferimento avente titolo di 10<sup>4,2</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (*master seed*).

Il grado di attenuazione ottenuto è stato controllato su due agnelli, siero negativi al virus dell'ectima, nati da pecore allevate presso l'IZS A&M, mediante inoculazione per via intradermica in più punti della commessura labiale.

Dai due agnelli sono state prelevate, previa anestesia e mediante biopsia campioni di tessuto labiale eritematoso sviluppatosi nei punti di inoculazione. Il materiale prelevato omogenato in PBS e filtrato su membrane da 0,22 µm è stato utilizzato per un successivo passaggio in due agnelli e per l'isolamento del virus in substrato cellulare. Al fine di escludere fenomeni di rivirulentazione e confermare la presenza dell'agente eziologico, sei passaggi seriali sono stati condotti con la metodica sopra descritta.

Un'aliquota di master seed è stata amplificata su monostrati di fibroblasti primari di embrione di pollo e sottoposta a processo di liofilizzazione per costituire uno stock di lavoro (*working seed*).

### Produzione del vaccino sperimentale

Il working seed è stato utilizzato per produrre un lotto di vaccino sperimentale. Il virus è stato amplificato su monostrati di fibroblasti primari di embrione di pollo. La sospensione virale raccolta al 70 % di ECP è stata centrifugata a 3 000 rpm per 30' a +4°C, il surnatante è stato raccolto titolato e successiva-

mente diluito e liofilizzato previa aggiunta di soluzione stabilizzatrice nel rapporto 1:1 v/v.

Il vaccino, identificato con la sigla 1/96 sotto forma liofila, presentava dopo liofilizzazione un titolo pari a  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/dose. Sul prodotto finito sono stati effettuati, con esito favorevole, i controlli previsti dalla *Farmacopea Europea* (8) per la produzione di vaccini virali vivi attenuati (identificazione, purezza, assenza di virus estranei, sterilità e assenza di micoplasmi).

### Controllo di innocuità

L'innocuità del vaccino è stata valutata per somministrazione di dose unica, dose eccessiva e dose ripetuta, ogni singola dose pari ad 1 ml aveva titolo di  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>.

A tale scopo sono stati scelti 20 agnelli di età compresa tra 10 e 15 giorni e 20 pecore gestanti nel secondo periodo di gravidanza sieronegativi per anticorpi al virus dell'ectima. Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi, composto ciascuno, da cinque agnelli e cinque pecore gestanti.

#### Per dose unica

Ciascun soggetto del gruppo n°1 ha ricevuto una dose di vaccino per via intramuscolare alla spalla destra.

#### Per dose eccessiva

Ciascun soggetto del gruppo n°2 ha ricevuto 10 dosi di vaccino per via intramuscolare alla spalla destra. A tal fine, per evitare la somministrazione di 10 ml di vaccino, volume ritenuto eccessivo in agnelli di circa 10 giorni di età, il vaccino liofilizzato è stato ricostituito in modo da avere 10 dosi in 2 ml di diluente.

#### Per dose ripetuta

Ciascun soggetto del gruppo n°3 ha ricevuto una dose di vaccino per via intramuscolare, alla spalla destra, al tempo zero, ed una seconda dose di vaccino dopo una settimana dalla prima inoculazione.

#### Controlli

I soggetti del gruppo n°4 non sono stati trattati, ma tenuti a contatto con i soggetti degli altri tre gruppi, per evidenziare l'eventuale trasmissione del ceppo virale vaccinale.

I soggetti componenti i 4 gruppi sono stati sottoposti a visita clinica giornaliera e rilievo della temperatura nei 14 giorni successivi alla vaccinazione, al fine di rilevare reazioni nel punto di inoculazione, eventuale risentimento generale o altre reazioni indesiderate riferibili alla somministrazione del prodotto.

Durante l'esecuzione delle prove sono stati raccolti, ogni 24 ore e nei tre giorni successivi al trattamento, campioni di saliva, urine, feci e sangue da due agnelli e due pecore del gruppo 1 (dose unica) e da due agnelli e due pecore del gruppo 2 (dose decupla), per la ricerca del virus dell'ectima.

Gli agnelli appartenenti ai 4 gruppi sono stati inoltre pesati all'inizio e alla fine della sperimentazione per valutare l'eventuale effetto della vaccinazione sull'incremento ponderale.

### Controllo di immunogenicità

Al fine di valutare l'immunogenicità, 1 ml di vaccino contenente  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> di virus è stato inoculato, per via intramuscolare alla spalla destra, in un gruppo composto da 10 pecore e 10 agnelli di età compresa tra 10 e 15 giorni allevati in isolamento presso gli stabulari dell'Istituto.

Contemporaneamente è stato mantenuto nelle stesse condizioni, e inoculato con 1 ml di soluzione fisiologica un gruppo di controllo composto da cinque agnelli e cinque pecore.

Da ciascun soggetto sono stati effettuati prelievi di sangue, al tempo zero e al 14° ed al 30° giorno dalla vaccinazione, per la ricerca di anticorpi al virus dell'ectima mediante ELISA indiretta. I valori di assorbanza (DO) al di sopra del cut off, stabilito a 0,225, erano considerati indice di reazione anticorpale.

Al 30° giorno dalla vaccinazione gli animali, stabulati in isolamento, sono stati sottoposti a challenge mediante inoculazione per via intradermica nella regione labiale di  $100$  TCID<sub>50</sub> di un ceppo virale di ectima, ottenuto per omogeneizzazione in PBS di croste prelevate da un agnello all'acme della malattia.

Tutti i soggetti sono stati controllati clinicamente per 45 giorni, al fine di rilevare l'eventuale comparsa di sintomatologia clinica.

La temperatura rettale è stata rilevata giornalmente solo nel corso della prima settimana dall'inizio della prova.

### Prove di campo

Ad ulteriore conferma dell'efficacia del vaccino è stata condotta una sperimentazione in campo su di un totale di 300 ovini appartenenti a quattro allevamenti con malattia in atto. In ciascun gregge infetto è stato identificato un gruppo di ovini da sottoporre a vaccinazione, pari al 90 % dell'effettivo e un gruppo di controllo da non vaccinare pari al rimanente 10 %. Tutti i soggetti nei quattro allevamenti sono stati sottoposti a esame clinico per due mesi dalla vaccinazione, quotidianamente nella prima settimana e a cadenza settimanale successivamente.

I seguenti parametri sono stati presi in considerazione:

- comparsa di effetti indesiderati nei soggetti vaccinati
- evoluzione della sintomatologia clinica nei soggetti malati sia nel gruppo dei vaccinati che nel gruppo dei non vaccinati
- comparsa di nuovi casi clinici nei due gruppi.

## Risultati

### Attenuazione del ceppo virale, controllo del grado di attenuazione e prove di rivirulentazione

In tutti gli agnelli inoculati con il virus al 10° passaggio su fibroblasti embrionali di pollo, si sono osservate, nei punti di inoculazione, aree di tessuto eritematoso aventi un diametro non superiore a 5 mm che non evolvevano in pustole (4). In tutti i campioni di materiali biotico prelevati, è stato isolato virus Orf.

Le prove di rivirulentazione non hanno evidenziato alcun effetto indesiderato consentendo di ritenere stabile il grado di attenuazione del ceppo 10177/TE da utilizzare per la produzione del vaccino.

### Controlli di innocuità per dose unica per dose eccessiva per dose ripetuta

Gli animali non hanno evidenziato reazioni locali o generali indesiderate a seguito della somministrazione della corrispondente dose vaccinale.

L'incremento della temperatura rettale, rilevata nei soggetti inoculati con la dose decupla, è stato transitorio, tornando nella norma, in 24-48 ore (Fig. 1).

Non si sono osservate differenze di incremento ponderale tra gli agnelli vaccinati e quelli di controllo.

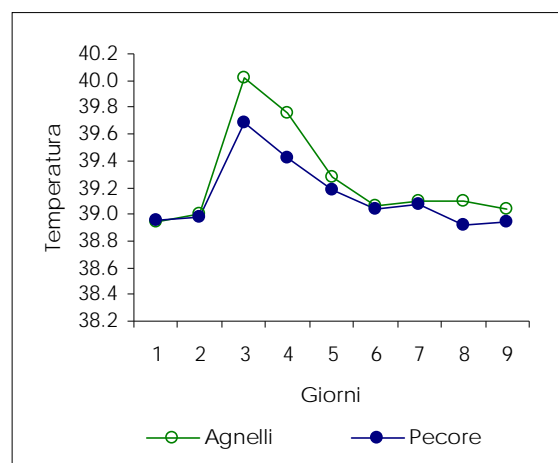


Figura 1  
Temperature medie rettali negli animali inoculati con dose decupla di vaccino

Dall'analisi dei risultati, si poteva concludere che il vaccino era innocuo per la specie ovina.

La ricerca dell'agente eziologico dell'ectima, sui prodotti organici, degli agnelli e delle pecore del gruppo 1 e 2 ha dato esito negativo.

### Prove di efficacia

#### Controllo di immunogenicità

Tutti gli animali al tempo zero sono risultati negativi per anticorpi specifici al test ELISA e così pure gli animali del gruppo di controllo nel corso di tutta la sperimentazione. I risultati dell'ELISA indiretta hanno evidenziato risposta anticorpale negli animali vaccinati a partire dal 14° giorno (Fig. 2).

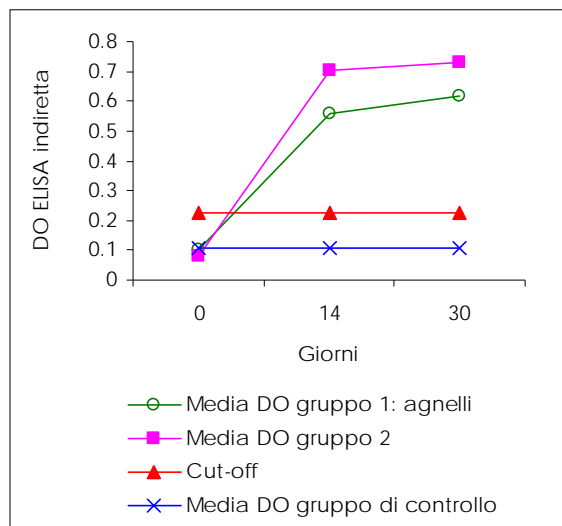


Figura 2  
Media dei valori DO in ELISA indiretta nel  
controllo di immunogenicità del vaccino

### Prova di infezione sperimentale

Il virus virulento ha provocato negli animali immunizzati una lieve reazione flogistica nel punto di inoculazione nella regione labiale. La reazione è comparsa tra il terzo e quarto giorno dall'infezione ed è regredita nelle 24-48 ore successive, senza evoluzione in escara. In coincidenza con la comparsa della reazione flogistica si è evidenziato un rialzo termico di 1°C al di sopra della temperatura fisiologica che è perdurato per 24-48 ore.

I cinque agnelli del gruppo di controllo hanno manifestato, tra il terzo ed il sesto giorno dall'infezione, i segni clinici evolutivi dell'ectima contagioso: pustole e papule a carico della regione labiale e, in due soggetti, sul piatto interno delle cosce. Dal materiale patologico prelevato dalle lesioni è stato possibile isolare il virus Orf. Gli animali sono sopravvissuti e sono clinicamente guariti in un tempo medio di 38 giorni dall'infezione.

### Bibliografia

1. Codazza D. & Colzani A. 1995. I poxvirus attraverso la storia, oggi e nel futuro. *Vet Ital*, **XXI** (18), 35-50.
2. Diaz A.E., Ayala B.G., Prado F.J. & Tortora P.J. 1989. Effect of age on the response of kids to vaccination against contagious ecthyma. *In* Memorias VI Congreso Nacional, Asociación Mexicana de Zootecnistas y Técnicas en Caprinoculture, AC, 17-20 October, Guadalajara, Jal. AZTECA, DF, Mexico, 41-45.
3. Di Marco V.D., Guercio A., Caracappa S., Capucchio M.T., Guarda F. & Fiasconaro M. 2000. An atypical case of malignant contagious ecthyma. *Obiettivi Doc Vet Bologna*, **12**, 29-35.

### Prove di campo

Lo studio dell'evoluzione delle lesioni cliniche da ectima contagioso nei soggetti vaccinati ha evidenziato una rapida remissione della sintomatologia clinica e la pressoché assenza di comparsa di nuovi casi a partire mediamente dal 4° giorno successivo alla vaccinazione.

Negli ovini di controllo, la malattia ha seguito il suo tipico decorso clinico, con comparsa di nuovi casi clinici.

### Conclusioni

Dalle prove preliminari è risultato che il ceppo virale 10177/TE di ectima contagioso, al decimo passaggio in fibroblasti embrionali di pollo, se inoculato nella rima labiale di agnelli siero negativi al virus Orf, si limita a produrre un'area eritematosa, al punto di inoculazione, che non evolve nella tipica lesione che caratterizza la malattia. Le prove di rivirulentazione condotte in agnelli hanno dato esito favorevole, consentendo di ritenere stabile il grado di attenuazione.

Le prove di innocuità condotte secondo *Farmacopea Europea* con il vaccino vivo, allestito con il ceppo virale attenuato e somministrato per via intramuscolare, hanno dato esito favorevole. Il vaccino induce la produzione di anticorpi ed è capace di proteggere gli animali al challenge, sia in condizioni sperimentali che di campo.

La disponibilità di un vaccino innocuo ed efficace per il controllo dell'ectima contagioso è esigenza molto sentita dagli allevatori e la presente sperimentazione ha permesso di avviare la procedura per la sua immissione nel mercato.

4. Gillespie J.H. & Timoney J.F. 1995. Ectima contagioso ovino. *In* Hagan Bruner's Microbiologia e malattie infettive degli animali domestici, III Ed. Editoriale Grasso, Bologna, 702-706.
5. Gumbrell R.C. & McGregor D.A. 1997. Outbreak of severe fatal orf in lambs. *Vet Rec*, **141**, 150-151.
6. Marques L.C., Fagliari J.J. & Amancio L.R. 1996. Occurrence of a disease similar to contagious ecthyma in sheep in São Paulo State, Brazil. *Ars Vet*, **12**, 120-124.
7. Parnell A.G. 1965. Ecthyma contagiosum (orf). *Br J Oral Surgery*, **3**, 128-135.
8. Farmacopea Europea 1997. Vaccins pour usage vétérinaire. Monographie N° 0062. Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé, Strasbourg, 1823-1827.
9. Precausta P. & Mackowiak M. 1986. L'ecthyma des ovins et des caprins. *Sci Vet Med Comp*, **88**, 55-75.
10. Rossi G.A. 1973. Adattamento del virus dell'ectima contagioso su substrati cellulari di origine aviare. *Vet Ital*, **XXIV**, 199-222.