

# L'immunogenicità nella cavia e nel cavallo di due formulazioni di un vaccino inattivato e adiuvato per la peste equina

Gaetano Federico Ronchi, Simonetta Ulisse, Emanuela Rossi, Paola Franchi, Gisella Armillotta, Sara Capista, Agostino Peccio, Mauro Di Ventura & Attilio Pini

## Riassunto

L'efficacia di due vaccini monovalenti, inattivati e adiuvati per il controllo della Peste Equina, allestiti con i sierotipi 5 e 9, è stata saggiata su cavia per selezionare la formulazione con le migliori capacità immunogene. Nella formulazione dei vaccini sono state prese in considerazione: la risposta immunitaria evocata nella cavia e le proprietà infiammatorie di due diversi tipi di adiuvanti precedentemente saggiati nella specie di destino del vaccino. Il vaccino allestito con il sierotipo 9, saggiato in uno studio pilota su cavallo, si è dimostrato capace fin dalla prima somministrazione di stimolare la produzione di anticorpi neutralizzanti. La risposta anticorpale evocata ha subito un marcato rialzo dopo la somministrazione della dose di richiamo, effettuata dopo 28 giorni, perdurando per almeno 10 mesi. La cavia sembra essere un utile modello di laboratorio per la valutazione delle proprietà antigeniche dei vaccini contro la peste equina.

## Parole chiave

Adiuvante, BEI, Bromoethylenimine hydrobromide, Cavia, Indice sieroneutralizzante, Peste equina.

## Introduzione

La peste equina (PE) è una malattia virale, non contagiosa, che colpisce gli equidi e viene trasmessa da Artropodi vettori del genere

*Culicoides*. Il virus responsabile della patologia, come quello della bluetongue, appartiene al genere *Orbivirus*, famiglia *Reoviridae*. Sono stati identificati nove sierotipi che manifestano patogenicità variabile. Nel cavallo la malattia si può manifestare in quattro forme cliniche (7). La sintomatologia clinica è osservabile anche nei muli, negli asini europei, asiatici e africani mentre nella zebra l'infezione ha un decorso subclinico (23).

Negli equini la malattia è endemica in molti paesi dell'Africa sub-sahariana, ma incursioni del virus si sono verificate in Nord Africa (1965), Spagna (1966 e 1987-1990) e Medio Oriente (1959, 1961 1989) (23). Le incursioni del virus della PE, al di fuori dell'area endemica, sono state, sin'ora, sempre dovute a un unico sierotipo, il sierotipo 4 o il sierotipo 9 (23).

Le esperienze degli ultimi decenni hanno evidenziato come l'Italia sia un paese particolarmente esposto alle malattie infettive definite "emergenti", endemicamente presenti nel continente Africano. La presenza nel territorio nazionale di Artropodi del genere *Culicoides* fa sì che la possibilità di un'incursione e diffusione del virus della PE non debba essere sottovalutata. Prove diagnostiche per la conferma dell'infezione e del sierotipo responsabile del focolaio, unitamente a presidi immunitari di sicura innocuità e di provata efficacia, devono essere prontamente disponibili per far fronte all'emergenza.

Nei Paesi dove la malattia è endemica, un vaccino vivo e attenuato, contenente sette dei nove sierotipi, prodotto in Sud Africa da *Onderstepoort Biological Products (OBP)*, è stato utilizzato con successo per molti anni. Il sierotipo 5, originariamente incluso nella formulazione, è stato escluso nel 1990 in seguito a fenomeni di patogenicità residua riscontrati sul campo. Il sierotipo 9 non è mai stato incluso nel vaccino a causa della cross-reazione con il sierotipo 6 e della sua irrilevanza nella situazione epidemiologica Sudafricana.

Vaccini poli o monovalenti vivi attenuati *ad hoc* potrebbero essere messi a disposizione dal produttore Sudafricano in tempi più o meno brevi a seconda della disponibilità. La Commissione Europea ha costituito una riserva strategica di 100.000 dosi, per ognuno dei 7 sierotipi attenuati, da impiegare in situazioni di emergenza (6). Naturalmente ciò non tiene in considerazione le obiezioni che usualmente accompagnano l'utilizzo di prodotti immunizzanti contenenti virus attenuato vivo.

Nel corso degli anni sono state oggetto di ricerca soluzioni alternative. Sono state saggiate varie formulazioni di prodotti inattivati e adiuvati (14, 18, 23, 24, 25) e, in tempi più recenti, l'attenzione si è focalizzata sui vaccini ricombinanti (7, 8, 13, 16, 17, 29,31).

Relativamente ai vaccini inattivati, i risultati indicano la loro capacità di proteggere la popolazione equina dalla malattia; nel passato un vaccino inattivato era disponibile commercialmente. I vaccini ricombinanti, in particolar modo quelli basati su Canarypox e virus Ankara modificato, potrebbero nel futuro diventare un'alternativa ai vaccini vivi attenuati e inattivati contro la Peste equina in quanto il loro potenziale è stato dimostrato in vari studi sperimentali (8, 9, 17). Lo studio su efficacia e innocuità dei vaccini per la PE ha come limite l'utilizzo del cavallo nella sperimentazione. I costi per l'acquisto e la gestione degli animali sono elevati e i locali per la sperimentazione devono essere adeguati e a prova di rischio biologico. Inoltre, l'utilizzo nella sperimentazione degli animali d'affezione è molto contestata. In ragione di queste considerazioni la disponibilità di

modelli animali da laboratorio, che possa sostituire il cavallo, sarebbe indubbiamente vantaggiosa.

La cavia è da tempo stata usata per la produzione di sieri immuni di riferimento, Erasmus (15) l'aveva utilizzata per uno studio sul neurotropismo dei ceppi vaccinali attenuati e, a conclusione del suo lavoro, indicava questa specie animale come un possibile strumento per una valutazione preliminare del potere immunogeno dei presidi immunitari per il controllo della malattia. Più tardi altri Autori (24) hanno presentato risultati che sembrano confermare questa ipotesi.

Lo studio qui riportato è motivato innanzitutto dal fatto che, nel caso dovesse verificarsi in Italia una emergenza epidemica dovuta al virus della PE, un presidio immunizzante caratterizzato e prodotto secondo una metodica standardizzata, dovrebbe essere disponibile non appena fosse identificato il sierotipo responsabile dell'emergenza.

In questo studio, che rientra nella politica di pronto intervento del Centro di Referenza Nazionale per le Malattie Esotiche, l'attenzione è stata posta sulla produzione e formulazione del prodotto; quest'ultima si è basata sulla risposta sierologica riscontrata nella cavia, seguita da una prova pilota nel cavallo, al fine di definirne il valore predittivo.

Lo studio è stato condotto con i sierotipi 5 e 9 non incorporati nel vaccino vivo disponibile in commercio.

Il sierotipo 9, considerato virus a bassa patogenicità, non sembra aver causato fenomeni epidemici in Sud Africa, nella popolazione trattata con vaccino vivo contenente il sierotipo 6 che, come già detto, cross reagisce con il sierotipo 9. Il sierotipo 9 è stato anche causa, in Medio Oriente-Asia del Sud Ovest, di una grave epidemia caratterizzata da elevata mortalità (19, 20). In considerazione del concomitante numero elevato di animali guariti, Howell non escludeva che nella stessa area geografica fossero presenti ceppi virali aventi differente patogenicità (19).

Quest'ultimo è stato isolato in Namibia e ritenuto responsabile della malattia (28) (T. Di Mattia, comunicazione personale).

## Materiali e metodi

### Linee cellulari

Cellule BHK<sub>21</sub> (clone 13) fornite da European Collection of Cell Cultures (ECACC) sono state utilizzate per la produzione di Master (MS) e Working Seeds (WS) e per le sospensioni virali necessarie all'allestimento dei vaccini. Come terreno di crescita è stato utilizzato il terreno Eagle (Biowest SAS, Nuaille, Francia) con aggiunta di Tryptone Soya Broth e 5% di siero fetale bovino (Sigma Aldrich, Milano, Italia) mentre, per la replicazione del virus si ometteva il siero.

Cellule Vero, fornite da ECACC, coltivate su terreno *Minimal Essential Medium* (Biowest SAS, Nuaille, Francia) con siero fetale bovino al 10%, sono state utilizzate per la determinazione del titolo infettante, espresso in TCID<sub>50</sub>, e l'esecuzione delle prove di sieroneutralizzazione (SN).

### Virus

I sierotipi virali 5 e 9 provenienti da AHS reference antigens (Bob Swanepoel collection), sono stati gentilmente forniti dal Dr Otto Hübschle<sup>†</sup> del Central Veterinary Laboratory of Windhoek (Namibia). I MS e WS, prodotti in seguito all'amplificazione virale su cellule BHK, sono stati sottoposti a processo di liofilizzazione e conservati a 5°C ± 3°C.

Le sospensioni virali utili alla preparazione dei lotti di vaccino, ottenute mediante due passaggi seriali di amplificazione del WS, sono state centrifugate a 13.500 g per 30 minuti a 5°C ± 3°C. I surnatanti ottenuti sono stati sottoposti a processo di purificazione e concentrazione utilizzando cassette Millipore (Pellicon® "Cassette" filter, Millipore S.p.A, Milano, Italia). Le sospensioni virali purificate, concentrate 10 volte (10X), sono state conservate a 5°C ± 3°C.

I controlli di sterilità microbiologica, assenza di micoplasmi e virus estranei, seguiti dal controllo del titolo infettante e dalla prova di sierotipizzazione, sono stati condotti nel corso

dei vari stadi di lavorazione, secondo quanto indicato dalla Farmacopea Europea (12). La tipizzazione virale è stata condotta mediante sieroneutralizzazione nei confronti dei nove sierotipi virali.

### Sieroneutralizzazione e c-ELISA

I sieri ottenuti dai campioni di sangue sono stati posti a -20°C ± 3°C. Per la determinazione degli indici sieroneutralizzanti (ISN) i sieri sono stati inattivati per 30' a 56°C ± 1°C e successivamente diluiti 1:10 in terreno MEM. I test sono stati effettuati utilizzando i ceppi di campo della Peste equina. I titoli virali del virus sierotipo 5 e del sierotipo 9, utilizzati per l'esecuzione del test ISN, erano rispettivamente pari a 10<sup>7.31</sup> TCID<sub>50</sub>/ml e 10<sup>7.53</sup> TCID<sub>50</sub>/ml. Cinquanta microlitri di ogni diluizione, dalla 10<sup>-1</sup> fino alla 10<sup>-7</sup>, sono stati aggiunti nei pozzetti di una piastrina a 96 pozzetti a fondo piatto per colture cellulari assieme ad un eguale volume di siero inattivato e diluito 1:10 in terreno MEM. Come controllo positivo sono stati utilizzati due sieri positivi per PE, uno per il sierotipo 5 e uno per il sierotipo 9, entrambi con titolo neutralizzante pari a 7,0 log<sub>10</sub>. Come controllo negativo è stato utilizzato un siero di riferimento negativo per PE.

Tutti i test sono stati condotti effettuando quattro repliche per ciascun siero testato. Le piastre, contenenti il virus a contatto con i sieri, sono state incubate a 37°C ± 1°C per 1h in atmosfera modificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo un ora di incubazione ad ogni pozzetto sono state aggiunte 10<sup>4</sup> cellule VERO sospese in un volume di MEM pari a 100 microlitri al 10% di siero fetale bovino. Dopo sette giorni di incubazione è stata effettuata la lettura.

I pozzetti con un effetto citopatico (ECP) > 50% sono stati considerati positivi. Il titolo virale è stato calcolato utilizzando il metodo Reed e Muench (27). L'indice sieroneutralizzante è dato dalla differenza tra il titolo virale, espresso come log<sub>10</sub>, in presenza del siero negativo e il titolo virale, espresso come log<sub>10</sub>, in presenza del siero da saggiare (11).

La c-ELISA è stata eseguita utilizzando 'INGEZIM AHSV COMPAC PLUS', un kit commerciale fornito da Ingenasa (Madrid, Spagna).

## Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

La reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) è stata usata per rilevare il virus della peste equina nei campioni biologici. Il test è stato condotto seguendo la metodica descritta da Stone-Marschat *et al.* (30).

## Inattivante

Per la produzione di bromoethylenimina hydrobromide (BEI), una soluzione 1N di 2-bromoethylamine hydrobromide Sigma-Aldrich B65705 (BEA) in NaOH 0,175N è stata sottoposta a processo di ciclizzazione secondo il metodo descritto da Bahneman (2, 3, 4, 26).

Quattro aliquote di sospensione virale purificata e concentrata dei sierotipi 5 e 9 sono state sottoposte al processo di inattivazione utilizzando BEI alle concentrazioni 3 mM e 5mM rispettivamente.

Dopo l'aggiunta dell'inattivante, le sospensioni virali sono state poste a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in agitazione elettromagnetica. Alla 12<sup>a</sup> ora ogni sospensione è stata trasferita in un secondo contenitore, secondo quanto previsto dalla Farmacopea Europea (12).

Ogni due ore è stato prelevato un campione di 5ml da ciascuna sospensione virale, bloccando il processo di inattivazione con l'aggiunta del 10% v/v di una soluzione 1M di sodio tiosolfato. In attesa di essere sottoposti a titolazione virale, tutti i campioni prelevati sono stati conservati a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

I titoli ottenuti sono stati utilizzati per elaborare, con software Microsoft® Excel 2000 (9.0.3821 SR-1 Redmond, Washington), le curve di inattivazione.

I campioni risultati negativi alla presenza di virus vitale, sono stati sottoposti a successivo controllo effettuando tre passaggi seriali, ognuno di 7 giorni, su cellule VERO. Al terzo passaggio, in assenza di effetto citopatico, le cellule formanti il monostrato sono state rimosse ed esaminate mediante fluorescenza per verificare l'eventuale presenza del virus.

## Adiuvante

### Risposta infiammatoria dei cavalli agli adiuvanti

Per valutare la risposta infiammatoria degli adiuvanti ISA 27VG e Montanide™ GEL, gentilmente forniti dalla ditta SEPPIC (Seppic Srl, Milano), è stato condotto un test preliminare. Ognuno dei due prodotti è stato emulsionato, alle concentrazioni prescritte, in terreno Eagle in assenza di antigene. Sebbene la via di immunizzazione sia stata intramuscolare, ogni emulsione è stata inoculata per via sottocutanea, alla dose di 1 ml, a livello del quadrante di mezzo del collo sul lato sx. Le reazioni al punto di inoculo sono state misurate ed espresse in cm<sup>2</sup>, con l'ausilio di un calibro, ogni giorno per i primi dieci giorni e, in seguito, ogni tre giorni fino al 48° giorno dall'inoculazione.

### Immunogenicità su cavia

Le sospensioni virali dei due sierotipi, a concentrazione 10 $\times$  e inattivate con BEI 5mM, sono state divise in aliquote di pari volume e trattate come segue:

#### Sierotipo 5

Un'aliquota della sospensione virale purificata e concentrata 10 $\times$  e una aliquote della stessa diluita 1:10 in terreno Eagle, sono state rispettivamente emulsionate con ISA27VG o Montanide™ GEL. Si sono così ottenuti quattro lotti di vaccino:

- Lotto 1 = ISA 27 VG + PE5 10 $\times$
- Lotto 2 = ISA 27 VG + PE5
- Lotto 3 = Montanide™ GEL+ PE5 10 $\times$
- Lotto 4 = Montanide™ GEL + PE5

Ognuno dei quattro lotti di vaccino è stato saggiato su gruppi di quattro cavie di sesso femminile e peso compreso tra i 350 e 500 g. Le cavie inoculate con 1 ml di vaccino nella regione retro-scapolare sono state soggette a richiamo, con la stessa dose, a 28 giorni dalla prima inoculazione. Gli animali sono stati sottoposti a prelievo di sangue tramite puntura cardiaca al 24°, 28° (prima del richiamo) e 58° giorno dall'immunizzazione.

#### Sierotipo 9

Un'aliquota della sospensione virale purificata e concentrata 10 $\times$  e una aliquote della stessa

diluita 1:10 in terreno Eagle sono state utilizzate per la produzione di due lotti di vaccino entrambi adiuvati con ISA27VG.

- Lotto 5 = ISA 27 VG + PE9 10×
- Lotto 6 = ISA 27 VG + PE9

Il numero di animali impiegati, le modalità di inoculazione e dei prelievi di sangue sono stati gli stessi del sierotipo 5. La reattività sierologica è stata saggiata fino al 306° giorno dall'immunizzazione.

### Immunogenicità su cavallo

In seguito alla valutazione della risposta infiammatoria dei due adiuvanti su cavallo e sulla base dei risultati ottenuti con le prove di immunogenicità su cavia, si è proceduto a una prova pilota di immunogenicità su cavalli utilizzando il vaccino preparato con il sierotipo 9. Sono stati selezionati animali costituenti un gruppo omogeneo in base all'esame clinico, al profilo biochimico e all'esame emocromocitometrico. Il cavallo numero 1 è stato inoculato con il vaccino lotto 5 utilizzando una dose di 1 ml, il cavallo n° 2 è stato inoculato con il vaccino lotto 5 con dose pari a 2 ml. L'animale numero 3 e l'animale numero 4 sono stati vaccinati rispettivamente con il vaccino lotto 6 con dosi pari ad uno (cavallo n°3) e due ml (cavallo n°4) (Tabella I).

Tabella I  
Tipologia di vaccino e dose somministrata ai cavalli in sperimentazione

Cavallo	Tipo vaccino	Dose
1	Lotto 5 adiuvato ISA 27VG PE 9 10 X	1 ml
2	Lotto 5 adiuvato ISA 27VG PE 9 10 X	2 ml
3	Lotto 6 adiuvato ISA 27VG PE 9	1 ml
4	Lotto 6 adiuvato ISA 27VG PE 9	2 ml

PE 9peste equino sierotipo 9

Al tempo zero ( $T_0$ ) è stato effettuato un prelievo di siero per escludere, mediante ELISA competitiva e SN, la presenza di anticorpi contro i 9 sierotipi del virus. Il vaccino è stato somministrato nel terzo medio del collo, lato sinistro, per via intramuscolare. Nei successivi 15 giorni sono stati effettuati il

rilievo della temperatura corporea e la verifica della reazione infiammatoria nel sito di inoculo. Una dose di richiamo di pari volume è stata somministrata al  $T_{28}$  inoculando gli animali nel terzo medio del collo, lato destro. Nei 15 giorni successivi sono stati eseguiti nuovamente il rilevamento giornaliero della temperatura corporea e la verifica della reazione infiammatoria al punto di inoculo. A intervalli prestabiliti ( $T_{28}$ ,  $T_{35}$ ,  $T_{42}$ ,  $T_{49}$ ,  $T_{57}$ ,  $T_{86}$ ,  $T_{114}$ ,  $T_{147}$ ,  $T_{176}$ ,  $T_{211}$ ,  $T_{240}$ ,  $T_{280}$  e  $T_{301}$ ) sono stati effettuati prelievi ematici dalla giugulare per il monitoraggio dell'andamento dei titoli anticorpali mediante c-ELISA e SN.

### Periodo di validità del vaccino

Il lotto 1 di vaccino PE5 10×, adiuvato con ISA27VG e conservato a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , è stato saggiato su cavie a distanza di 12 e 24 mesi dalla data di produzione. La dose vaccinale primaria, la dose di richiamo e i tempi relativi ai prelievi ematici sono stati gli stessi utilizzati nella prova di immunogenicità condotta nella stessa specie ad un mese dalla formulazione del prodotto.

## Risultati

### Controlli di qualità

I controlli di sterilità per batteri, funghi e micoplasmi effettuati nel corso delle fasi produttive e sui prodotti finiti, hanno dimostrato la sterilità dei prodotti.

I controlli per l'identità virale e l'assenza di virus estranei hanno sempre confermato la sola presenza di virus PE 5 o PE 9, a seconda delle preparazioni saggiate.

### Inattivante

In base ai titoli virali ottenuti ad intervalli biorari sono state calcolate le curve di inattivazione per le due concentrazioni di BEI e per i due sierotipi.

La curva ottenuta per il sierotipo 5 alla concentrazione 3mM di BEI è risultata essere  $Y = -0,1862X + 8,4856$  con coefficiente di correlazione  $R^2 = 0,9701$  (Figura 1); per la concentrazione 5mM di BEI la curva è risultata essere  $Y = -0,3604X + 8,4387$  con un coefficiente di correlazione  $R^2 = 0,9847$  (Figura 2).

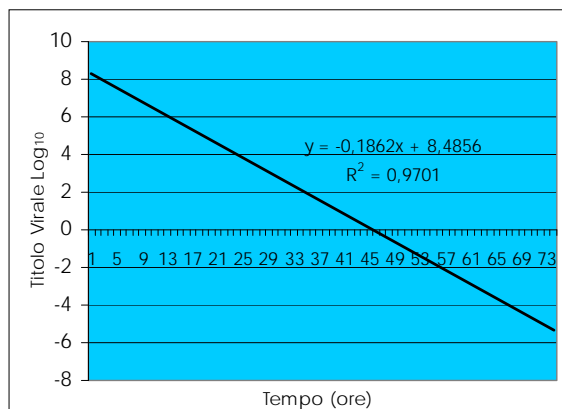


Figura 1  
Curva di inattivazione del virus della PE sierotipo 5 con BEI 3mM ed equazione retta

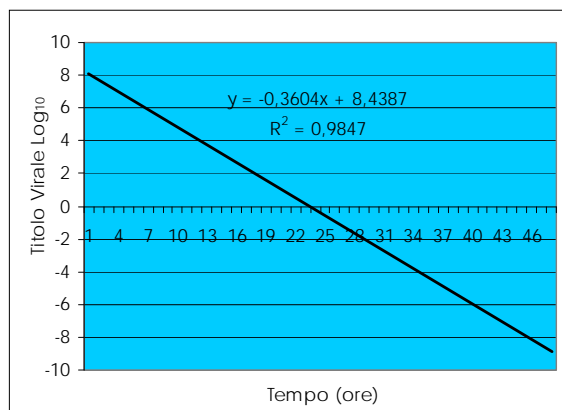


Figura 2  
Curva di inattivazione del virus della PE sierotipo 5 con BEI 5mM ed equazione retta

Alla concentrazione 3mM e 5mM i tempi di inattivazione sono stati rispettivamente di 45 e 23 ore.

La curva ottenuta per il sierotipo 9 alla concentrazione 3mM di BEI è risultata essere  $Y = -0,1738 X + 8,4525$  con coefficiente di correlazione  $R^2 = 0,9213$  (Figura 3); per la concentrazione 5mM di BEI la curva è risultata essere  $Y = -0,3633X + 9,0944$  con un coefficiente di correlazione  $R^2 = 0,9193$  (Figura 4).

Alla concentrazione 3mM e 5mM i tempi di inattivazione sono stati rispettivamente di 48 e 25 ore.

La concentrazione 5mM è stata considerata la più idonea all'inattivazione delle sospensioni virali per la produzione dei vaccini. I tempi di inattivazione variano a seconda del tasso di inattivazione e del volume della sospensione

virale da trattare. In particolare per un volume di 200 ml di ciascuna sospensione virale il tempo di inattivazione per il sierotipo 5 è stato pari a 30 ore e per il sierotipo 9 di 31 ore.

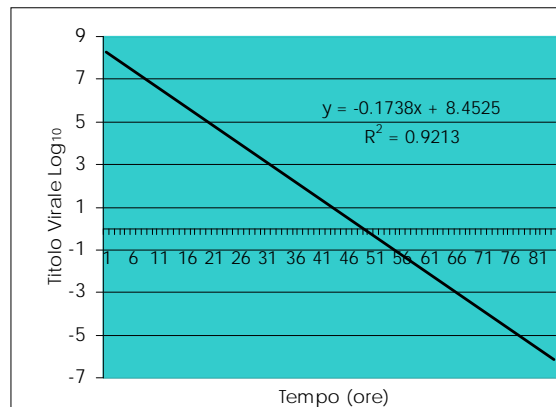


Figura 3  
Curva di inattivazione del virus della PE sierotipo 9 con BEI 3mM ed equazione retta

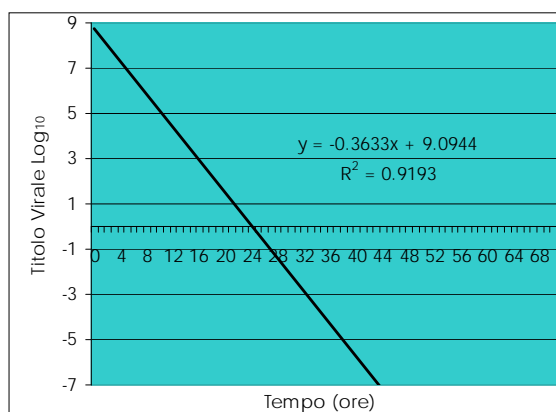


Figura 4  
Curva di inattivazione del virus della PE sierotipo 9 con BEI 5mM

## Adiuvante

La prova effettuata su cavallo per la determinazione della risposta infiammatoria delle due tipologie di adiuvanti, somministrati per via sottocutanea, ha dato i risultati riportati in Figura 5. La dose vaccinale produceva, con entrambi gli adiuvanti, un nodulo che si riduceva rapidamente nelle susseguenti 24 ore. Con Montanide gel la risposta infiammatoria si registrava tra il giorno quattro e sette mentre con ISA 27 VG si

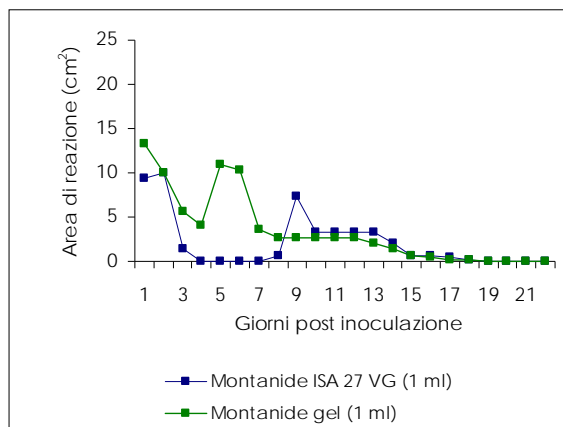


Figura 5  
Reazioni al punto di inoculo in seguito alla somministrazione per via sottocutanea di due tipologie di adiuvante alla dose di 1 ml

registrava il giorno nove. Entrambi gli adiuvanti sono stati considerati idonei alla formulazione del vaccino. Per il prosieguo della sperimentazione è stato scelto

l'adiuvante ISA 27 VG che ha provocato reazioni infiammatorie di minore entità.

### Immunogenicità su cavia

Gli ISN ottenuti negli animali trattati con i lotti 1, 2, 3 e 4 di vaccino prodotti utilizzando il sierotipo 5 e i lotti 5 e 6 allestiti con il sierotipo 9 sono riportati, rispettivamente, nelle Tabelle II e III. Gli ISN al T<sub>0</sub> erano minori di 0,5 e non sono riportati nelle tabelle. Gli ISN per il sierotipo 5 sono stati disponibili sino al 58° giorno dall'immunizzazione per la morte degli animali dovuta a cause ambientali, non legate alla somministrazione del vaccino come confermato dai risultati negativi ottenuti nei test RT-PCR per il virus della PE condotti sugli organi degli animali. I loro valori medi, al 58° giorno, sono risultati compresi tra 4,99 e 6,16. Per il sierotipo 9 gli ISN sono stati disponibili sino al 306° giorno, con valori medi compresi tra 4,39 e 5,5.

Tabella II  
Indici sieroneutralizzanti medi su cavie inoculate con le quattro tipologie di vaccino PE5

Lotto	Dose	Indici sieroneutralizzanti medi log <sub>10</sub>		
		24 gg	28 gg*	58 gg
Lotto 1 ISA 27 VG + PE 5 10×	1 ml	3,17	4,17	6,16
Lotto 2 ISA 27 VG + PE 5	1 ml	3,12	4,33	4,99
Lotto 3 Montanide™ gel + PE 5 10×	1 ml	3,28	3,04	5,91
Lotto 4 Montanide™ gel + PE 5	1 ml	1,56	3,32	6,16

PE 5 peste equino sierotipo 5

\* dose richiamo

Tabella III  
Indici sieroneutralizzanti medi su cavie inoculate con due tipologie di vaccino PE9

Lotto	Dose	Giorni								
		28*	58	88	120	189	208	249	277	306
Lotto 5 ISA 27 VG + PE 9 10×	1 ml	3,46	4,58	4,62	4,16	4,00	4,08	5,50	5,50	5,50
Lotto 6 ISA 27 VG + PE 9	1 ml	3,00	3,49	3,77	2,59	3,11	3,33	4,39	4,39	4,39

PE 9 peste equino sierotipo 9

\* dose richiamo

## Immunogenicità su cavalli

### Segni clinici

Il cavallo n° 4 immunizzato con 2 ml di vaccino è deceduto il giorno successivo al trattamento per cause traumatiche; i test RT-PCR per il virus della PE condotti sugli organi dell'animale hanno dato esito negativo. I rilievi termometrici effettuati durante i successivi 15 giorni dalla somministrazione della dose primaria e della dose di richiamo nei tre cavalli non hanno evidenziato innalzamenti della temperatura corporea. Per quel che riguarda le reazioni infiammatorie locali, si è osservato un ispessimento della cute di lieve entità, non dolente e non caldo alla palpazione, risoltosi nei successivi 4-5 giorni, indipendentemente dalla dose di 1 o 2 ml (Figura 5).

### Sierologia

#### Competitive -ELISA

In relazione alla prova c-ELISA, i sieri dei soggetti 1 e 3 immunizzati, rispettivamente, con 1 ml di PE9 10<sup>x</sup> lotto 5 e PE9 lotto 6 sono

risultati positivi al T<sub>28</sub>. Il siero dell'animale n° 2, soggetto a inoculazione con PE9 10<sup>x</sup> lotto 5, alla dose di 2 ml, è risultato dubbio. Al T<sub>35</sub>, 7 giorni dopo il richiamo, i tre sieri hanno dato esito positivo.

#### Siero neutralizzazione

I tre soggetti hanno presentato sierconversione al T<sub>28</sub> (Figura 6). Gli ISN al T<sub>0</sub> erano ≤ 0.5 e non sono riportati nella figura 6. La dose di richiamo ha prodotto un rialzo degli ISN in tutti i soggetti, al T<sub>301</sub> gli indici hanno mostrato una variazione tra 1,72 e 2,56, in relazione alla preparazione.

#### Periodo di validità del vaccino

Il Lotto 1 ISA 27 VG + PE5 10<sup>x</sup> è stato saggiato su cavia per la valutazione delle proprietà immunogene a intervalli di 12 e 24 mesi dalla data di produzione.

Gli ISN ottenuti sono riportati in Tabella IV. Il vaccino ha mantenuto la propria capacità immunogena fino al 24° mese quando la prova è stata interrotta.

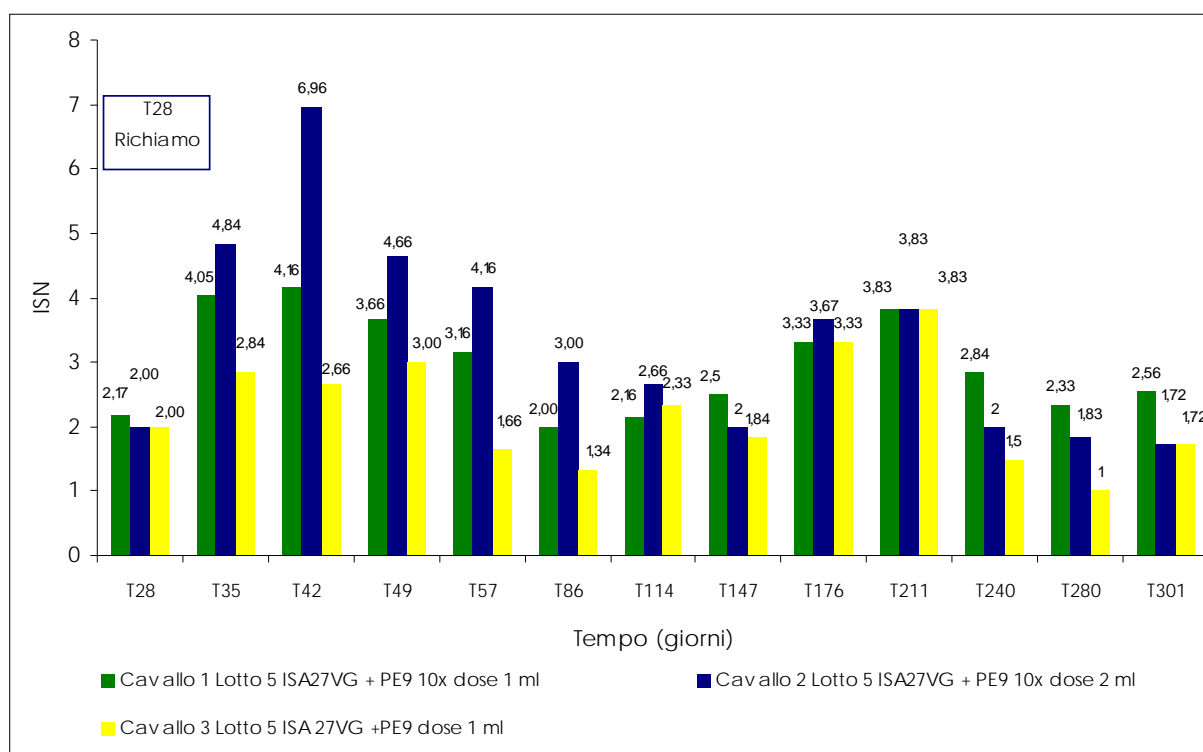


Figura 6  
Indici sieroneutralizzanti (log<sub>10</sub>) su cavalli immunizzati con due tipologie di vaccino PE9 somministrati per via intramuscolare alla dose di 1 ml e 2 ml



Tabella IV

Valutazione su cavia del periodo di validità del vaccino PE5 lotto 1

Vaccino lotto	T0*	T12 mesi	T24 mesi
		Indici sieroneutralizzanti medi log <sub>10</sub>	
Lotto 1 ISA 27 VG + PE 5 10×	4,2	4	3,66

PE 5 peste equino sierotipo 5

\* indice sieroneutralizzante a un mese dalla preparazione

## Conclusioni

Sono stati prodotti due vaccini monovalenti, inattivati ed adiuvati, per il controllo della Peste equina rispettivamente con il sierotipo 5 e il sierotipo 9. La reattività sierologica dei due prodotti è stata saggiata in prima istanza su cavia e, nel caso del vaccino prodotto con il sierotipo 9, anche su cavallo.

Come inattivante è stato usato bromoethylenimina (BEI) alla concentrazione di 5mM, il prodotto, agendo sugli acidi nucleici e non sulla componente proteica del virus, non ne compromette le proprietà immunogene (21). Il BEI è stato utilizzato con successo per l'inattivazione del virus della PE e per l'allestimento di altri prodotti immunizzanti contro afta epizootica (2, 3), rabbia (22), febbre della Valle del Rift (5), ecc. Gli adiuvanti utilizzabili nella formulazione dei vaccini sono numerosi (1,10), nella presente sperimentazione si è fatto ricorso a due prodotti considerati appropriati per l'impiego su cavallo. La risposta infiammatoria saggiata in precedenza per via sottocutanea aveva dato esito favorevole. Per la vaccinazione dei cavalli è stata prescelta la via intramuscolare poiché via di elezione per l'immunizzazione degli equini. La reazione al punto di inoculo è stata appena osservabile nel caso dell'adiuvante ISA 27VG sia dopo l'immunizzazione primaria sia dopo la dose di richiamo.

L'esperimento condotto sulla cavia conferma l'intuizione di Erasmus (15) riguardo ad un

suo possibile uso nella valutazione dell'efficacia dei vaccini contro la Peste equina. I vaccini prodotti con entrambi i sierotipi hanno fatto registrare su cavia elevati indici sieroneutralizzanti a partire dal 24° giorno dall'immunizzazione primaria, con un rialzo significativo dopo la dose di richiamo. I titoli sieroneutralizzanti sono stati rilevabili per oltre dieci mesi, con la componente antigenica somministrata sia in forma concentrata che non concentrata.

Gli ISN su cavia hanno trovato corrispondenza con quelli riscontrati su cavallo. La cavia, pertanto, dà prova di poter essere un utile modello di laboratorio per la valutazione preliminare dei prodotti immunogeni e di alcune loro caratteristiche come, ad esempio, la stabilità.

I dati riportati saranno verificati in una sperimentazione, in corso in Namibia, che contempla il "challenge" dell'immunità su cavallo.

## Ringraziamenti

Si ringrazia il signor Pasquale Belfiore (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo) per l'attenta e puntuale collaborazione tecnica fornita nel corso della sperimentazione.

## Bibliografia

1. Aucouturier J., Dupuis L. & Ganne V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, **19**, 2666-2672.
2. Bahnmann H.G. 1973. The inactivation of foot and mouth disease virus by ethylenimine and propylenimine. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, **20**, 356-360.

3. Bahnemann H.G. 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol*, **47**, 47-56.
4. Bahnemann H.G. 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*, **8**, 299-303.
5. Blackburn N.K., Besselaara T.G. 1991. A study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins antibodies using monoclonal antibodies. *J Virol Methods*, **33** (3), 367-374.
6. European Commission (EC) 2009. Commission Decision of the 18 December 2008 establishing Community reserve of vaccine against African horse sickness, (2009/3/CE). *Off J*, **L 2**, 06/01/2009, 9-10.
7. Castillo-Olivares J., Calvo-Pinilla E., Casanova I., Bachanek-Bankowska K., Chiam R., Maan S., Nieto J.-M., Ortego J. & Mertens P.P.C. 2011. A modified vaccinia Ankara virus (MVA) vaccine expressing African horse sickness virus (AHSV) VP<sub>2</sub> protects against AHSV challenge in an IFNAR -/- mouse model. *PLoS One*, **6**, e16503 ([www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016503](http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0016503) ultimo accesso 3 Marzo 2012).
8. Chiam R., Sharp E., Maan S., Rao S., Mertens P., Blacklaws B., Poynter N.D., Wood J. & Castillo-Olivares J.C. 2009. Induction of antibody responses to African horse sickness virus (AHSV) in ponies after vaccination with recombinant modified vaccinia Ankara (MVA). *PLoS ONE*, **4** (6), e5997. doi:10.1371/journal.pone.0005997.
9. Coetzer J.A.W. & Guthrie A.J. 2004. African Horse Sickness. In *Infectious diseases of livestock* (J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin, eds). Oxford University Press, Cape Town, 1231-1246.
10. Cox J.C. & Coulter A.R. 1997. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, **15** (3), 248-256.
11. Cunningham C.H. 1973. Immunologic methods in avian research: neutralization test. *Avian Dis*, **17** (1), 227-235
12. Direction de la Qualité du Médicament du Conseil de l'Europe (DEQM). European Pharmacopeia 2004. European Pharmacopeia, 5th Ed, June 2004. Aubin, Ligugé, 01/2005:0062, 628-634.
13. Du Plessis M., Cloete M., Aitchison H., Van Dijk A.A. 1998. Protein aggregation complicates the development of baculovirus-expressed African horsesickness virus serotype 5 VP2 subunit vaccines. *Onderstepoort J Vet Res*, **65**, 321-324.
14. Dubourget P., Préaud J., Detraz F., Lacoste F., Fabri A., Erasmus B. & Lombard M. 1992. Development, production, and quality control of an industrial inactivated vaccine against African horse sickness virus serotype 4. In *Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses* (T.E. Walton & B.I. Osburn, eds). Proc. Second International Symposium. CRC Press, Boca Raton, 874-886.
15. Erasmus B.J. 1963. Preliminary observations on the value of the guinea-pig in determining the innocuity and antigenicity of neurotropic attenuated horsesickness strains. *Onderstepoort J Vet Res*, **30**, 11-22.
16. Gillespie J.H. & Timoney J.F. 1988. African horse sickness. In *Hagan and Bruner. Microbiology and infectious diseases of domestic animals*, Eighth Ed. Cornell University Press, Londra, 712-715.
17. Guthrie A.J., Quan M., Lourens C.W., Audonnet J.C., Minke J.M., Yao J., He L., Nordgren R., Gardner I.A. & MacLachlan N.J. 2009. Protective immunization of horses with a recombinant canarypox virus vectored vaccine co-expressing genes encoding the outer capsid proteins of African horse sickness virus. *Vaccine*, **27**, 4434-4438.
18. House J.A., Lombard M., Dubourget P., House C. & Mebus C.A. 1994. Further studies on the efficacy of an inactivated African horse sickness serotype 4 vaccine. *Vaccine*, **12** (2), 142-144.
19. Howell P.G. 1960. The epizootic of African horse sickness in the Middle East and SW Asia. *J S Afr Vet Med Assoc*, **3**, 329-344.
20. Howell P.G. 1962. The isolation and identification of further antigenic types of African horsesickness virus. *Onderstepoort J Vet Res*, **29** (2), 139-149.
21. Käsermann F., Wyss K. & Kempf C. 2001. Virus inactivation and protein modifications by ethylenimines. *Antiviral Res*, **52**, 33-41.
22. Larghi O.P. & Nebel A.E. 1980. Rabies virus inactivated by binary ethylenimine: new method for inactivated vaccine production. *J Clin Microbiol*, **11** (2), 120-122.
23. Mellor P.S. & Hamblin C. 2004. African horse sickness. *Vet Res*, **35**, 445-466.

24. Nashwa K.M. & Rofaiil S. K. 2007. Evaluation of bivalent inactivated oil adjuvant African horse sickness vaccine in guinea-pigs and mice. 5th Scientific Conference, 5 November, Beni-Suef 62111, Egypt, *Beni Suef Vet Medi J*, **18** (1), 57-61.
25. Parker J. 1975. Inactivation of African horse-sickness virus by betapropiolactone and by pH. *Arch Virol*, **47**, 357-365.
26. Ramakrishnan M.A., Pandey A.B., Singh K.P., Singh R., Nandi S. & Mehrotra M.L. 2005. Immune response and protective efficacy in sheep immunised with hydroxylamine-inactivated bluetongue virus vaccine. *Vet Ital*, **41** (3), 149-155.
27. Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, **27**, 493-497.
28. Scacchia M., Lelli R., Peccio A., Di Mattia T. Mbulu R.S., Hager A.L., Monaco F., Savini G. & Pini A. 2009. African horse sickness: a description of outbreaks in Namibia. *Vet Ital*, **45** (2), 265-274.
29. Scanlen M., Paweska J.T., Vershoor J.A. & van Dijk A.A. 2002. The protective efficacy of a recombinant VP2-based African horse sickness subunit vaccine candidate is determined by adjuvant. *Vaccine*, **20**, 1079-1088.
30. Stone-Marschat M., Carville A., Skowronek A. & Laegreid W.W. 1994. Detection of African horse sickness virus by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, **32** (3), 697-700.
31. Wade-Evans A.M., Pullen L., Hamblin C., O'Hara R., Burroughs J.N. & Mertens P.P.C. 1997. African horse sickness virus VP7 sub-unit vaccine protects mice against a lethal, heterologous serotype challenge. *J Gen Virol*, **78**, 1611-1616.