



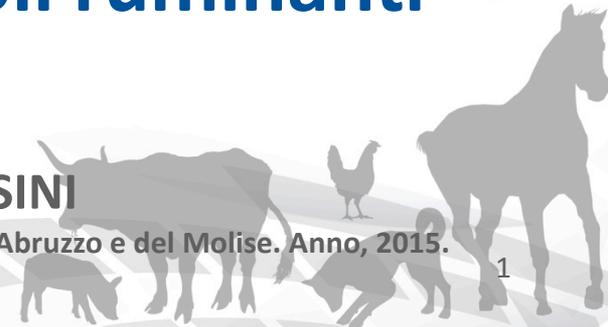
IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

# Sviluppo e controllo di efficacia di un vaccino inattivato per la Peste dei piccoli ruminanti (PPR)



FEDERICO RONCHI – GIANLUCA ORSINI

I risultati della ricerca corrente condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise. Anno, 2015.  
Teramo, 15 giugno 2016





***Progetto di ricerca corrente 2010 - MSRCTE 0110  
“Rete transnazionale per il rilievo precoce e la  
prevenzione della diffusione di malattie animali  
emergenti nel Bacino del Mediterraneo”***



- Promuovere lo sviluppo e il controllo di nuovi vaccini sia attenuati sia inattivati e la costituzione di una rete di laboratori produttori che, in caso di emergenza, sia in grado di fornire le dosi necessarie per intervenire in tempi rapidi.





# PARTNERSHIP

BIOPHARMA



IZSAM

MAROCCO

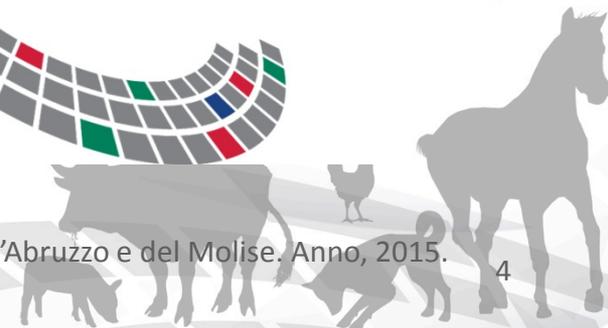
Reparto Vaccini Virali Sieri e Diagnostici

&

Reparto Diagnostica e Sorveglianza Malattie Virali Esotiche



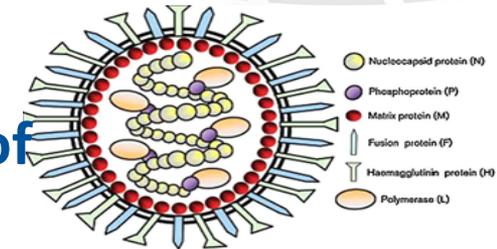
I risultati della ricerca corrente condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise. Anno, 2015.  
Teramo, 15 giugno 2016



# Peste des petits ruminants virus

## CLASSIFICAZIONE ICTV 2015

### International Committee on Taxonomy of Viruses



Order: <i>Mononegavirales</i>	(5 Families) < history >
Family: <i>Paramyxoviridae</i>	(2 Subfamilies) < history >
Subfamily: <i>Paramyxovirinae</i>	(7 Genera) < history >
Genus: <i>Aquaparamyxovirus</i>	(1 Species) < history >
Genus: <i>Avulavirus</i>	(9 Species) < history >
Genus: <i>Ferlavirus</i>	(1 Species) < history >
Genus: <i>Henipavirus</i>	(2 Species) < history >
Genus: <i>Morbillivirus</i>	(6 Species) < history >
Species: <i>Canine distemper virus</i>	< history >
Species: <i>Cetacean morbillivirus</i>	< history >
★ Species: <i>Measles virus</i>	< history >
Species: <i>Peste-des-petits-ruminants virus</i>	< history >
Species: <i>Phocine distemper virus</i>	< history >
Species: <i>Rinderpest virus</i>	< history >
Genus: <i>Respirovirus</i>	(5 Species) < history >
Genus: <i>Rubulavirus</i>	(7 Species) < history >

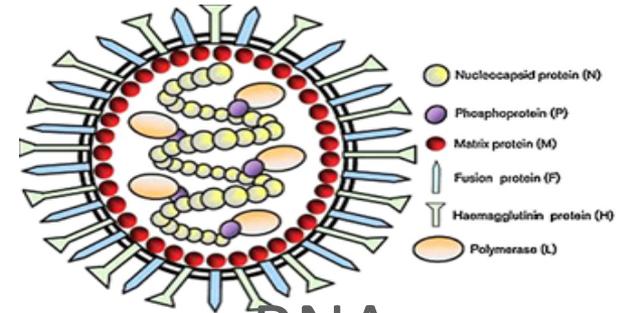
I risultati della ricerca corrente condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise. Anno, 2015.

Teramo, 15 giugno 2016

# Virus PPR utilizzato per la produzione della sospensione virale

## Morbillivirus:

- Virus provvisti di envelope con genoma a RNA non segmentato.
- Due glicoproteine H e F che mediano il legame ai recettori e il processo di fusione alle membrane
- Attualmente sono conosciuti 4 LINEAGES.
- Nello specifico è stato usato virus PPR appartenente al lineage IV.

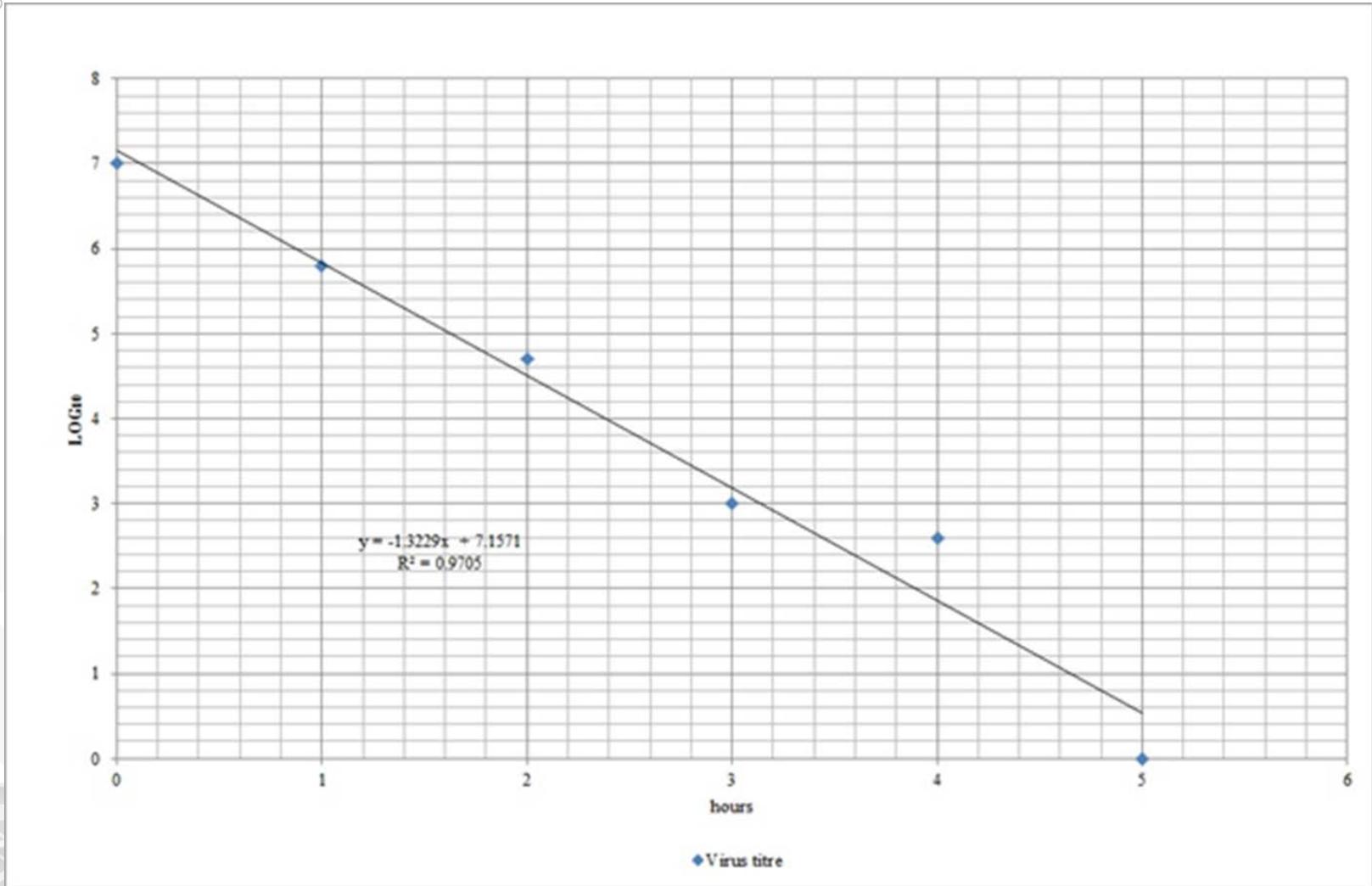


# Produzione Sospensione Virale

- Substrato cellulare VerodogSLAMtag:  
linea cellulare continua contenente il recettore cellulare per i morbillivirus.
- Coinfezione in bottiglie rotanti, 60.000 cel/cm<sup>2</sup> e 0.01 Multiplicity of Infection (MOI) utilizzando un ceppo di campo di PPR lineage IV ceppo Marocco M/08.



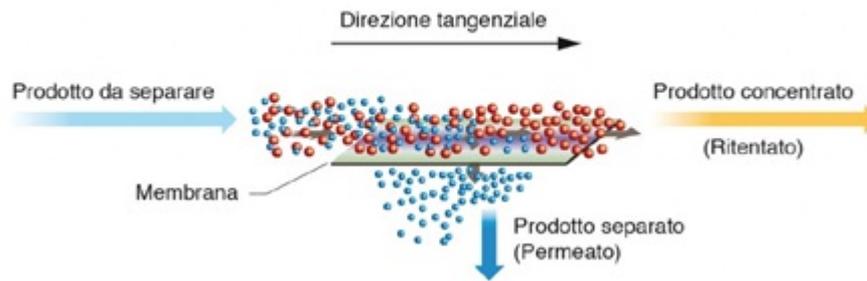
# Inattivazione Sospensione Virale BEI 1mM



# Concentrazione/purificazione sospensione virale inattivata

Sistema flusso tangenziale con cassette a taglio molecolare 300 KD

- RITENUTO 10X
- PERMEATO



# Controllo processo di concentrazione

Well	Sample	Ct	Quantity	Qty Mean	Qty StdDev	Campione	
1	PPR1	20	2,25E+05	2,06E+05	1,63E+04	Surnatante PPR dopo centrifugazione	A
2	PPR1	20	2,00E+05	2,06E+05	1,63E+04		
3	PPR1	20	1,94E+05	2,06E+05	1,63E+04		
4	PPR 2	16	4,42E+06	4,41E+06	3,31E+05	"Estratto" da Pellet risospeso in PBS	B
5	PPR 2	15	4,74E+06	4,41E+06	3,31E+05		
6	PPR 2	16	4,08E+06	4,41E+06	3,31E+05		
7	PPR 3	19	3,66E+05	3,44E+05	1,93E+04	Surn. PPR centrifugato + "Estratto" da Pellet t.q.	A+B
8	PPR 3	19	3,37E+05	3,44E+05	1,93E+04		
9	PPR 3	19	3,29E+05	3,44E+05	1,93E+04		
10	PPR 4	16	3,13E+06	3,14E+06	3,48E+05	Surn. PPR centrifugato + "Estratto" da Pellet t.q. Concentrato 10x	A+B <b>CONCENTRATO 10x</b>
11	PPR 4	16	2,80E+06	3,14E+06	3,48E+05		
12	PPR 4	16	3,50E+06	3,14E+06	3,48E+05		
13	PPR 5	33	9,29E+00	9,14E+00	3,82E+00	Permeato	P
14	PPR 5	34	5,25E+00	9,14E+00	3,82E+00		
15	PPR 5	33	1,29E+01	9,14E+00	3,82E+00		

# Lotti di vaccino prodotti

- 
- La sospensione virale inattivata e concentrata è stata suddivisa in 6 aliquote
  - 3 aliquote sono state emulsionate ai tre adiuvanti
  - 3 aliquote sono state diluite 1:10 in PBS pH 7,2 e quindi emulsionate ai tre adiuvanti scelti.
  - Sono stati prodotti quindi 6 lotti di vaccino PPR inattivato.



- 
- MONTANIDE ISA 71 (SEPPIC<sup>®</sup>)  
Emulsione acqua in oli minerali
  - AFSA 1 (Vaxine<sup>®</sup>) con delta inulina
  - AFSA 2 (Vaxine<sup>®</sup>) con delta inulina + altro immunostimolante



## Immune Response of Rats to Peste Des Petits Ruminant (PPR) Vaccination

M.C.O. Ezeibe<sup>1\*</sup>, J.I. Eze<sup>1</sup>, N.M. Ukomadu<sup>3</sup>, O.S. Chukwu<sup>1</sup>, I.C. Eze<sup>2</sup>,  
O.N. Okoroafor<sup>1</sup>, J.A.C. Ugonabo<sup>2</sup>, A.A. Ngene<sup>1</sup>, M.E. Sanda<sup>1</sup>, O. Ijabo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine

<sup>2</sup>Department of Microbiology

<sup>3</sup>Department of Veterinary Parasitology and Entomology

University of Nigeria  
Nsukka, Nigeria

(Received October 02, 2009; accepted January 24, 2010)

### Abstract

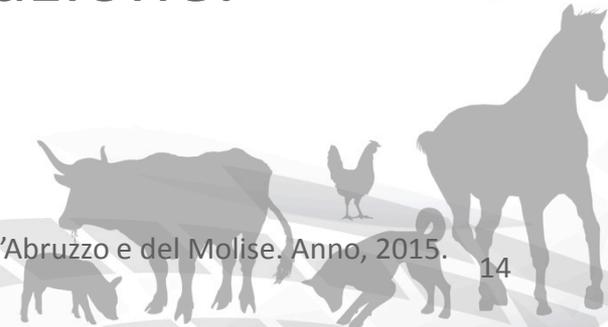
Ezeibe, M.C.O., Eze, J.I., Ukomadu, N.M., Chukwu, O.S., Eze, I.C., Okoroafor, O.N., Ugonabo, J.A.C., Ngene, A.A., Sanda, M.E. and Ijabo, O. 2010. Immune response of rats to Peste des Petits Ruminant (PPR) vaccination. *J. Appl. Anim. Res.*, 37: 239-240.

*Rats were used as animal models to study immune response to vaccination with peste des petits ruminants (PPR) monospecific vaccine. One group (10 rats) was vaccinated with PPR vaccine (Nigeria 75/1). The second group (10 rats) served as unvaccinated control. Two weeks post vaccination, haemagglutination-inhibition (HI) test was done. The vaccinated group had higher HI titre of 6617±653 suggesting that the rats could be used for assessment of immune response to PPR vaccine.*

Key words: PPR vaccine, haemagglutination-inhibition test, small ruminants.

# Costituzione dei gruppi di animali e vaccinazione

- 
- Sono stati costituiti 7 gruppi di animali, ciascuno costituito da 5 ratti.
  - Ogni animale ha ricevuto una dose pari a 0,5 mL di prodotto (vaccino o placebo) per via sottocutanea.
  - Una dose di richiamo è stata somministrata a 36 gg dopo la prima somministrazione.



# Gruppi di animali e tipologia di vaccino inoculato

Gruppo di animali	ADIUVANTI	ANTIGENE
A	<i>Soluzione fisiologica</i>	//
B	ISA 71 VG	Concentrato 10x
C	ISA 71 VG	Diluito
D	AFSA 1	Concentrato 10x
E	AFSA 1	Diluito
F	AFSA 2	Concentrato 10x
G	AFSA 2	Diluito



- 
- Nei giorni 0, 11, 36, 49 e 63 sono stati eseguiti prelievi di sangue dalla vena caudale dei ratti previa anestesia locale con crema a base di Prilocaina e Lidocaina.
  - I campioni di siero sono stati quindi saggiati in c-ELISA (in doppio)



# KIT ELISA ID VET

## ID Screen® PPR Competition



E' STATO OSSERVATO UN COEFFICIENTE DI CORRELAZIONE ( $r$ ) PARI A 0,94 TRA I TITOLI OTTENUTI UTILIZZANDO I DUE TEST (ELISA e SN)

### ***Bibliografia:***

Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the Peste des Petits Ruminants virus using a recombinant nucleoprotein.

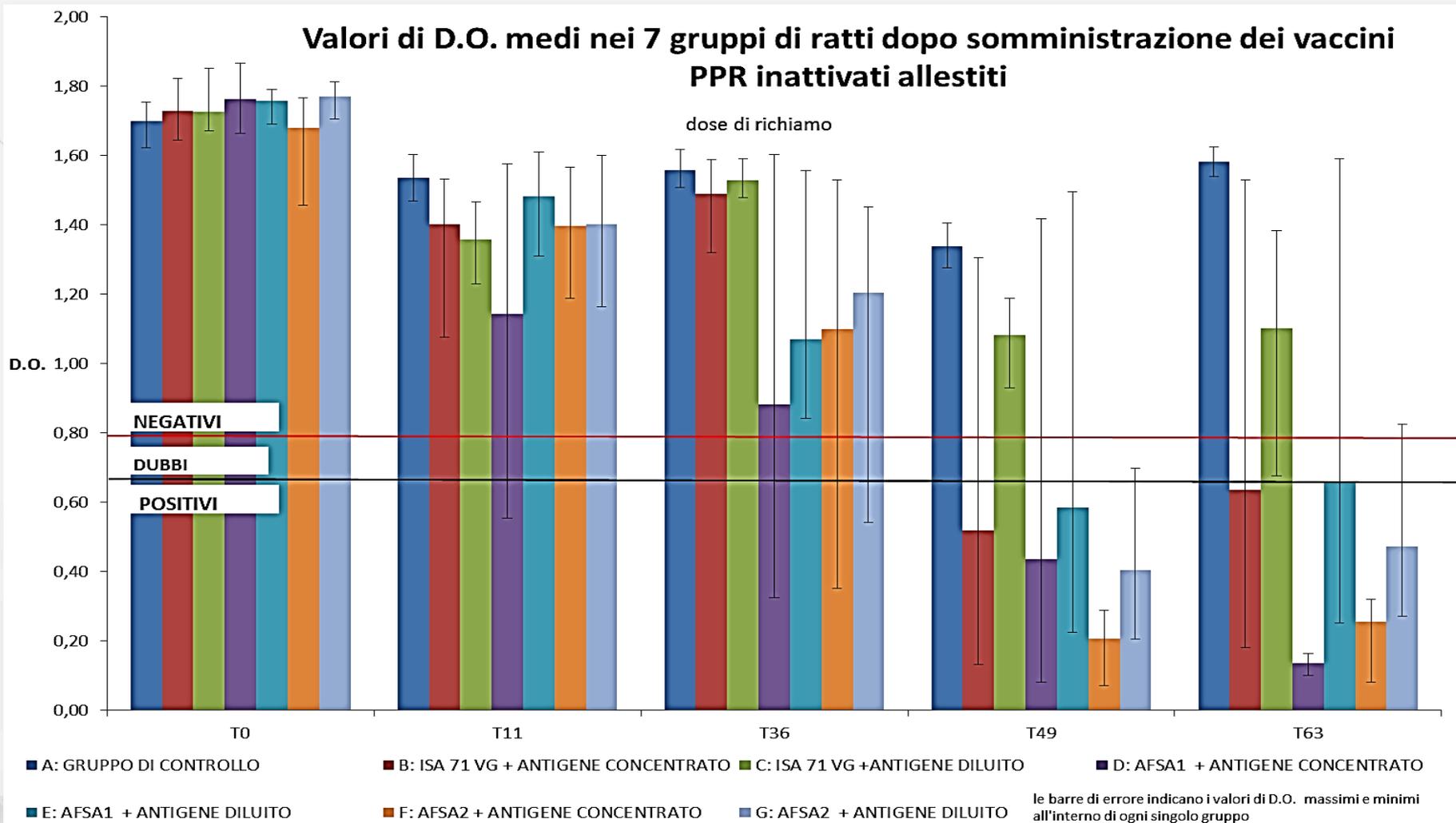
Libeau G, Préhaud C, Lancelot R, Colas F, Guerre L, Bishop DH, Diall  
1995 Jan;58(1):50-5.

i.



GRUPPI RATTI	FORMULAZIONI VACCINALI	ANTIGENE	T0	T11	T36	T49	T63
	ADIUVANTI		pos/tot testati	pos/tot testati	pos/tot testati	pos/tot testati	pos/tot testati
<u>A</u>	Soluzione fisiologica	//	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<u>B</u>	ISA 71 VG	Concentrato	0/4	0/5	0/4	3/4	3/5
<u>C</u>	ISA 71 VG	Diluito	0/5	0/5	0/5	0/4	0/5
<u>D</u>	AFSA 1	Concentrato	0/5	1/4	1/4	3/4	3/3
<u>E</u>	AFSA 1	Diluito	0/5	0/5	0/4	3/4	3/4
<u>F</u>	AFSA 2	Concentrato	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5
<u>G</u>	AFSA 2	Diluito	0/5	0/5	1/5	4/5	3/4

## Valori di D.O. medi nei 7 gruppi di ratti dopo somministrazione dei vaccini PPR inattivati allestiti



# Scelta della formulazione vaccinale

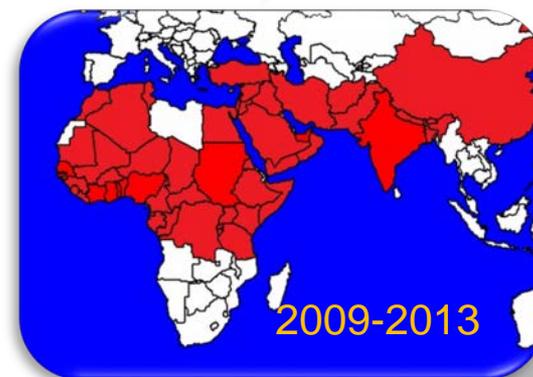
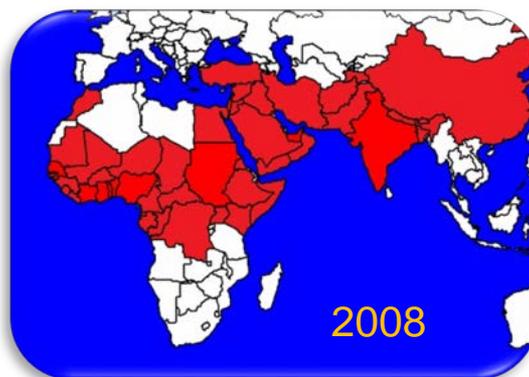
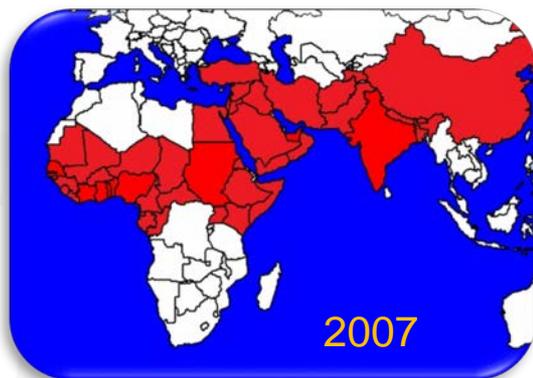
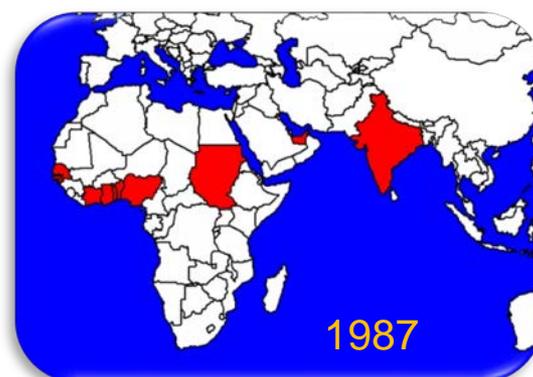
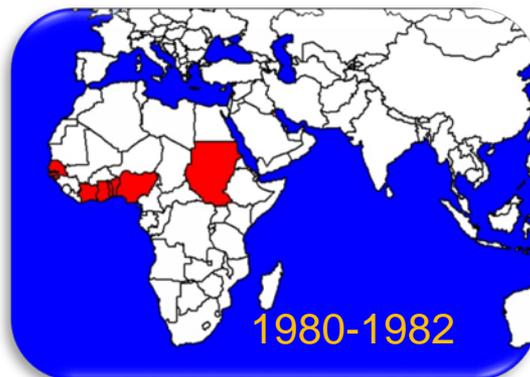
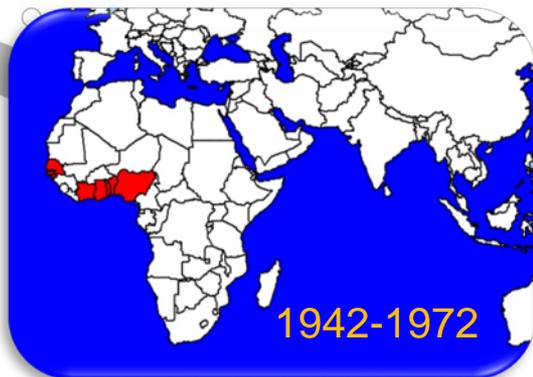
- La formulazione vaccinale contenente l'antigene PPR purificato e concentrato 10 X, adiuvata con AFSA2 è stata quindi selezionata per effettuare le prove di efficacia su capre.



- 
- La PPR è considerata una delle malattie ovi-caprine a rischio di introduzione nell'Europa occidentale con pesante impatto economico negli allevamenti.
  - Elevata **mortalità** (superiore al 80%). La **morbilità** è molto elevata (> 90%).
  - La PPR è inclusa tra le **malattie con obbligo di denuncia** da parte dell'**OIE** (Terrestrial Animal Health Code, Chapter 1.2).

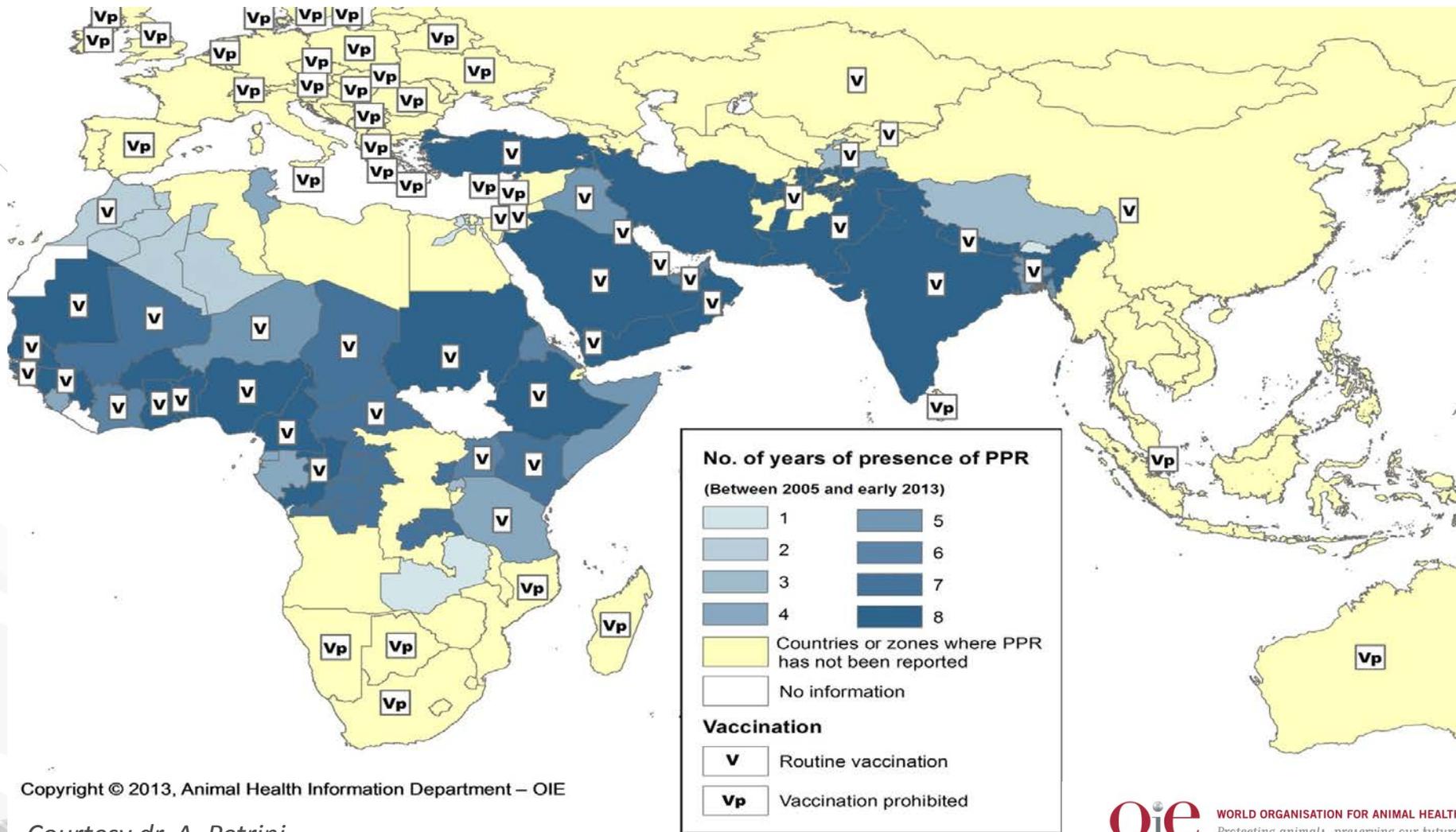


# Evoluzione della distribuzione



*Courtesy dr. A. Petrini*

# Strategie di vaccinazione



Copyright © 2013, Animal Health Information Department – OIE

Courtesy dr. A. Petrini



## Vaccini attenuati

**Nigeria/75** (lineage 1) da capra, attenuato  
passaggi seriali su cellule VERO.

**Sungri/96** (lineage 4) isolato da una capra  
nella regione del Sungri in India nel 1994.

**Arasur/87** e **Coimbatore/97** (lineage 4) isolati  
rispettivamente da una pecora e da una capra.  
Attenuati con passaggi seriali su cellule VERO.



# Tipologie vaccini



## VACCINI ATTENUATI:

### PRO:

- Costi
- Efficacia (risposta umorale/cellulo-mediata e durata immunità)



## VACCINI INATTIVATI:

### PRO:

- Sicurezza** (no rischi rivirulentazione ed eliminazione nell'ambiente)
- Maggiore stabilità



Lo scopo di questo studio è valutare l'efficacia del vaccino inattivato IZSAM-Biopharma, mediante l'inoculazione sperimentale di un ceppo patogeno di PPRV nella capra

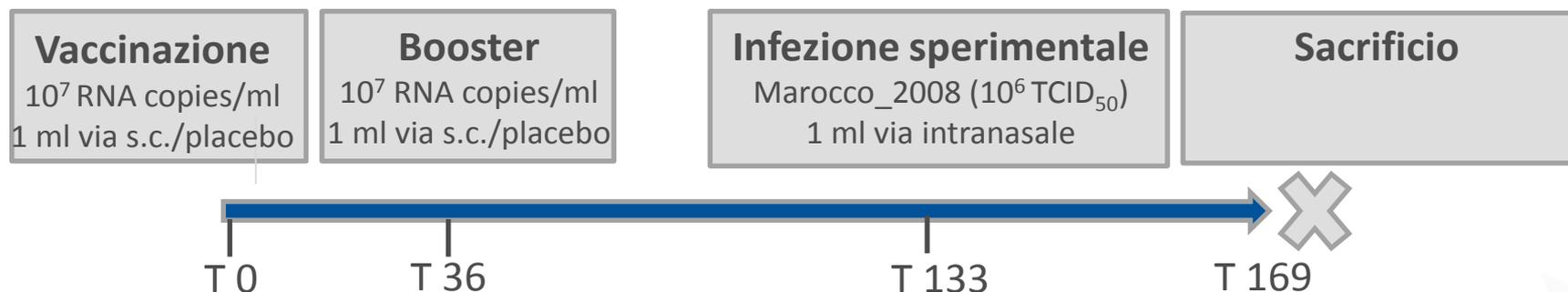


# Protocollo sperimentale

- 
- **7 capre razza tibetana** (4 vaccinate e 3 controlli non-vaccinati, a contatto)
  - Ceppo PPRV **Marocco\_2008**
  - Stabilimento utilizzatore sede centrale BSL3 (Sistema BioBubble)



# Protocollo sperimentale



## Risposta immunitaria



cELISA e SN

## Viremia ed escrezione virale



RT-qPCR

Es. clinico e t.rettale

## Sintomatologia clinica





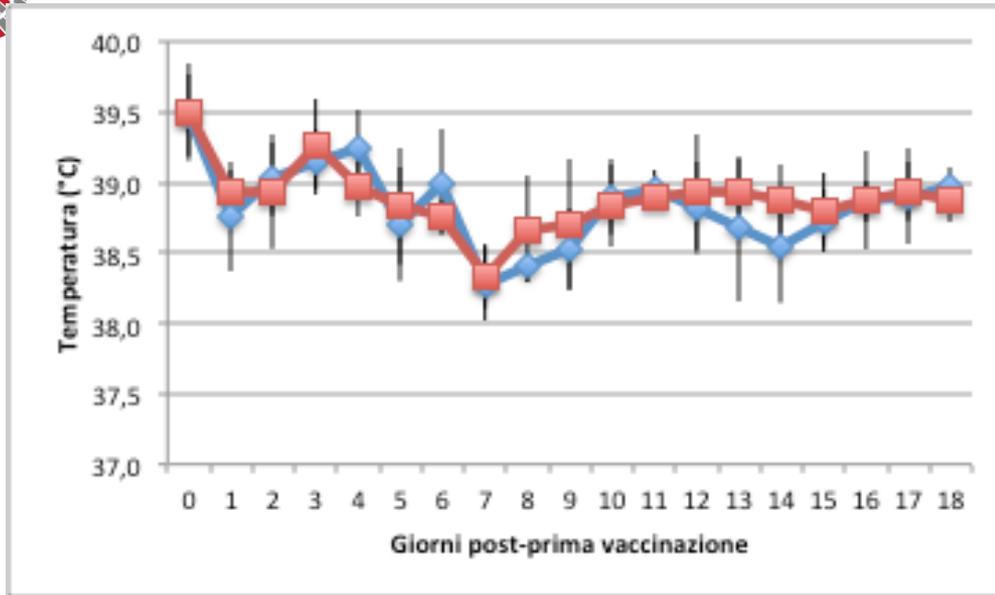
## PRIMA DOSE ( $T_0$ )

- 1 ml sottocute vaccino/placebo, piatto interno coscia sinistra

## SECONDA DOSE ( $T_{36}$ )

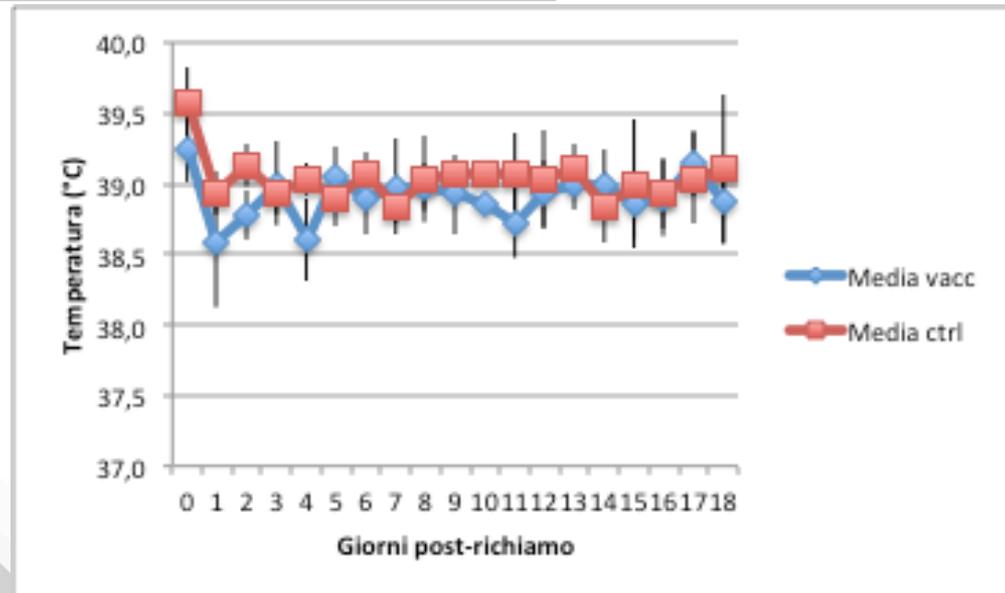
- 1 ml sottocute vaccino/placebo, piatto interno coscia destra

# Fase vaccinale (temperatura)

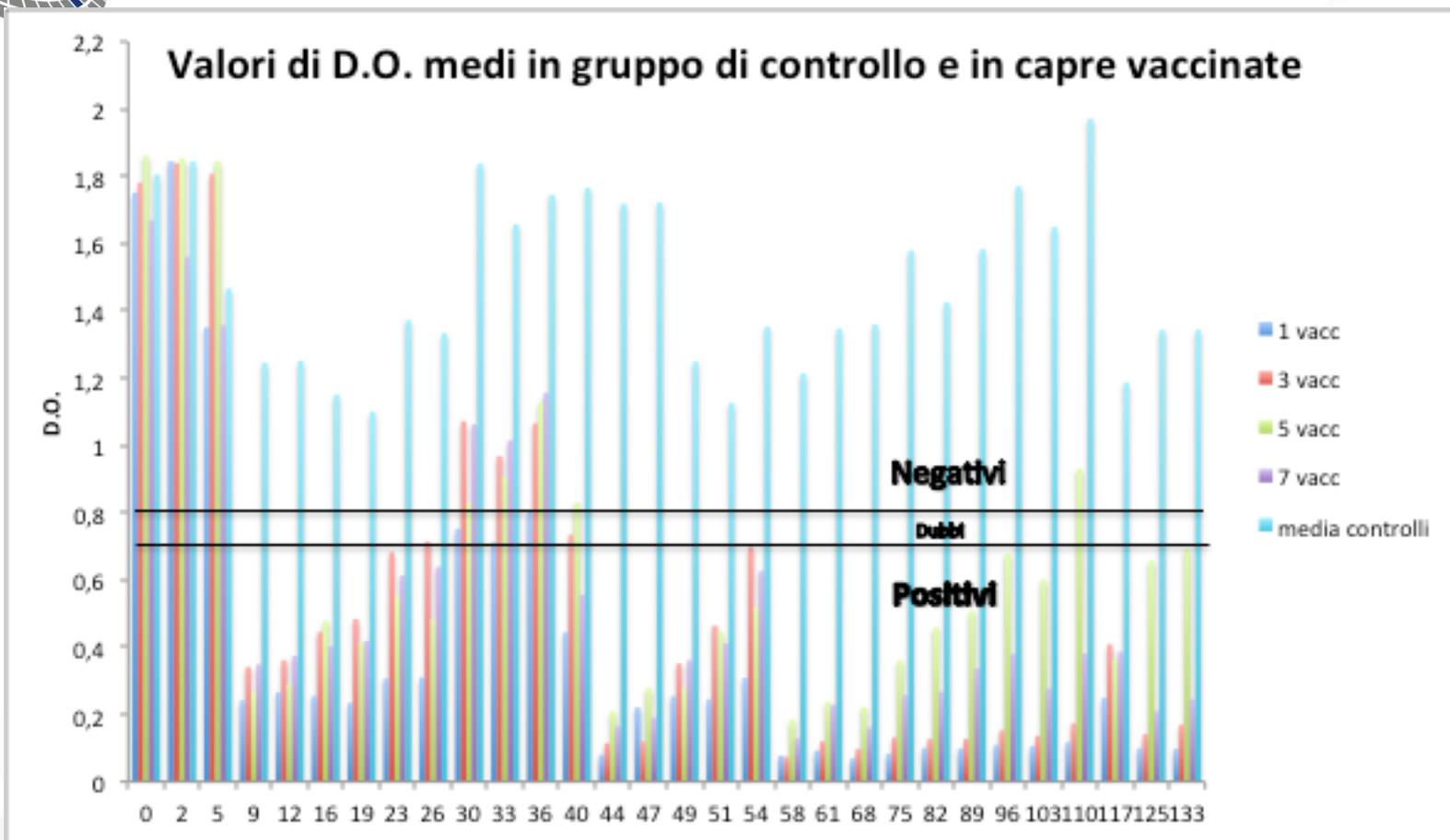


← Prima dose

Seconda dose →



# Fase vaccinale (sierologia)

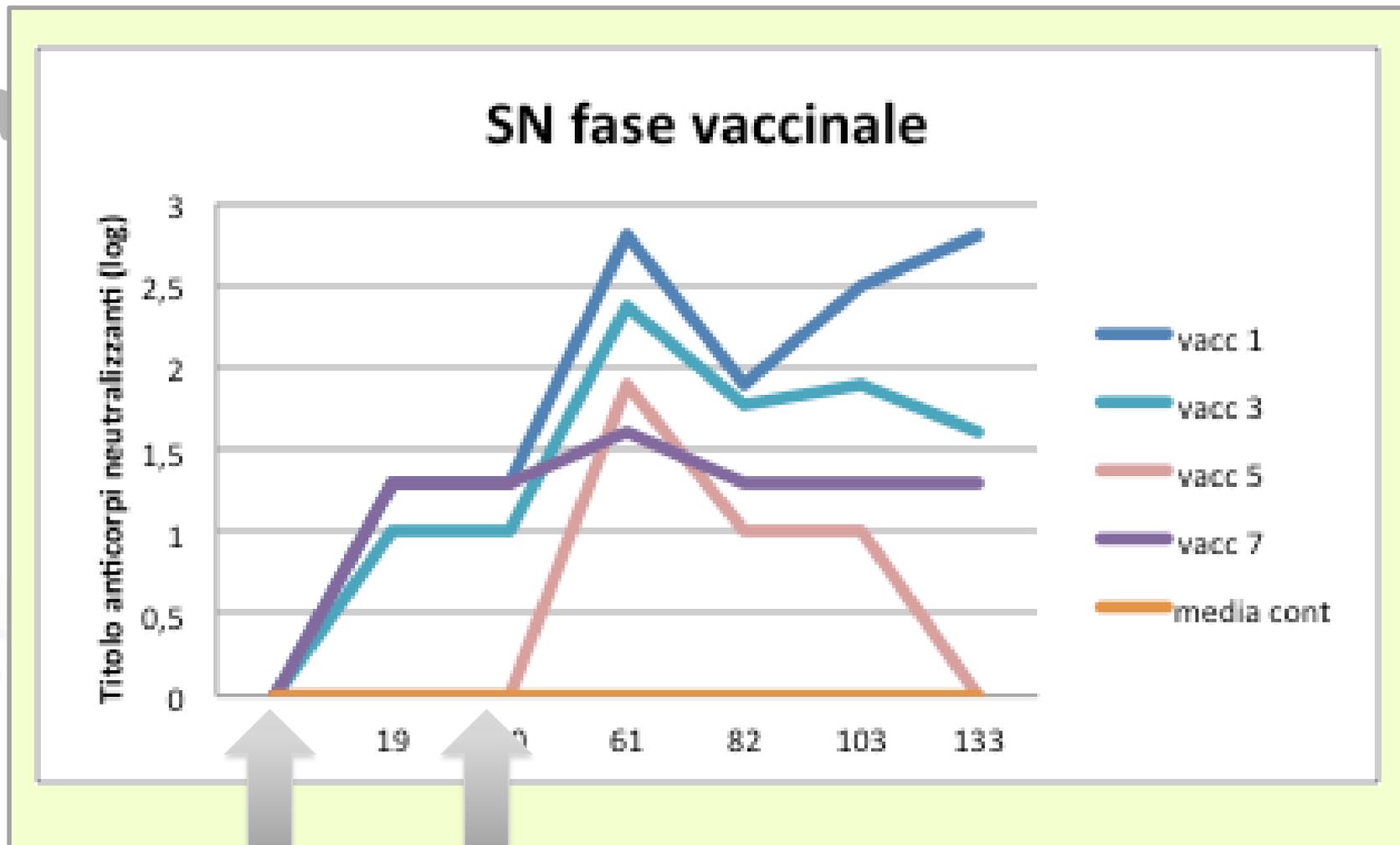


1° dose

2° dose

I campioni sono stati analizzati mediante ELISA comp. (ID Screen® PPR Competition ELISA kit)

# Fase vaccinale (sierologia)



1°  
dose

2°  
dose

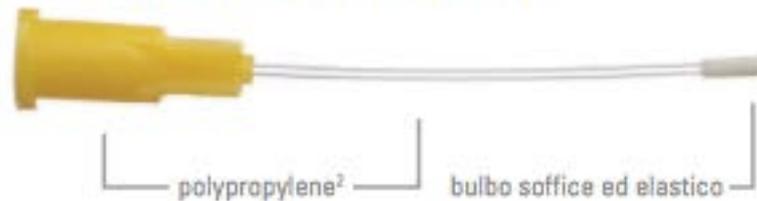
I campioni sono stati analizzati mediante Siero neutralizzazione



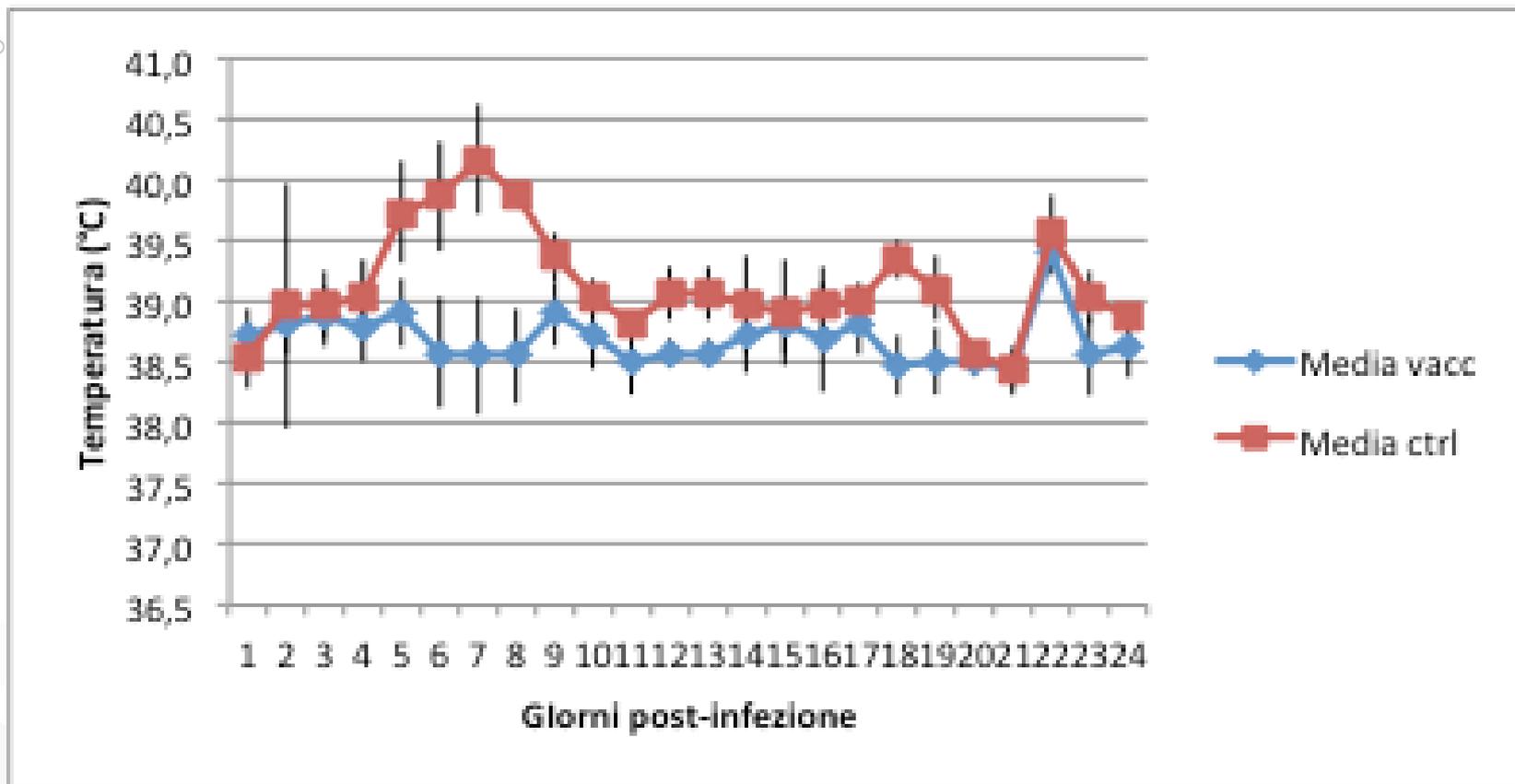
## INFEZIONE ( $T_{133}$ )

- 1 ml sospensione virale  $10^6$  TCID<sub>50</sub>, instillazione endo-nasale mediante siringa e sondino per dosaggio orale per roditori, lubrificato con crema anestetica.

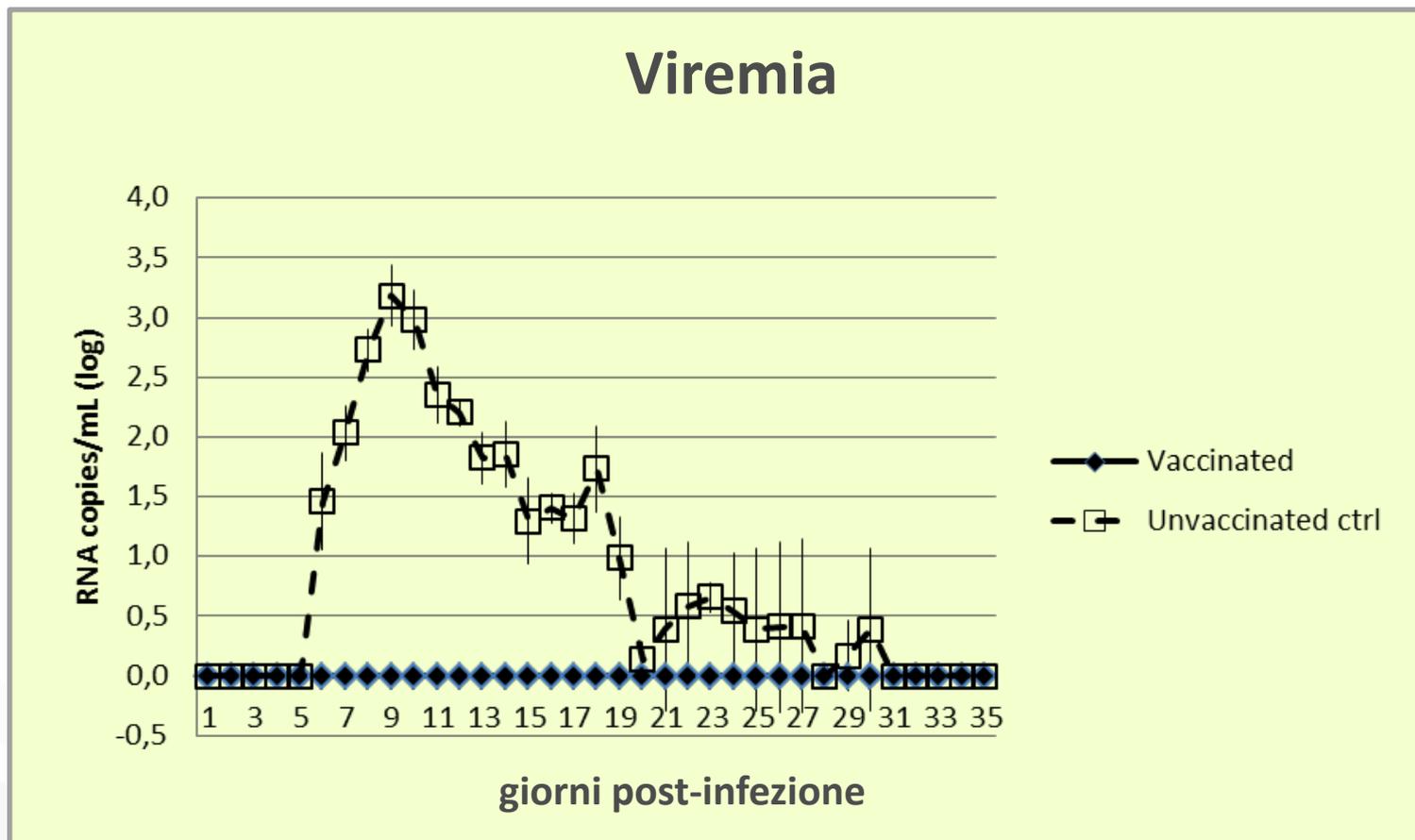
Sondini di dosaggio Polipropilene



# Fase challenge (temperatura)

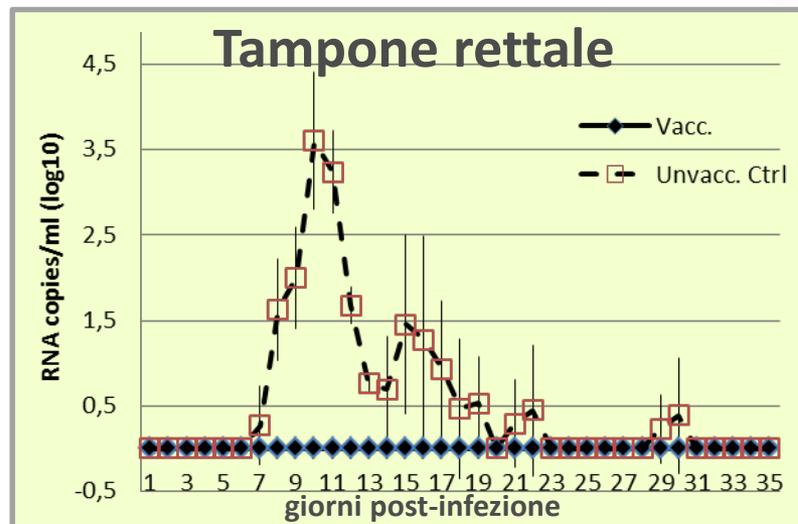
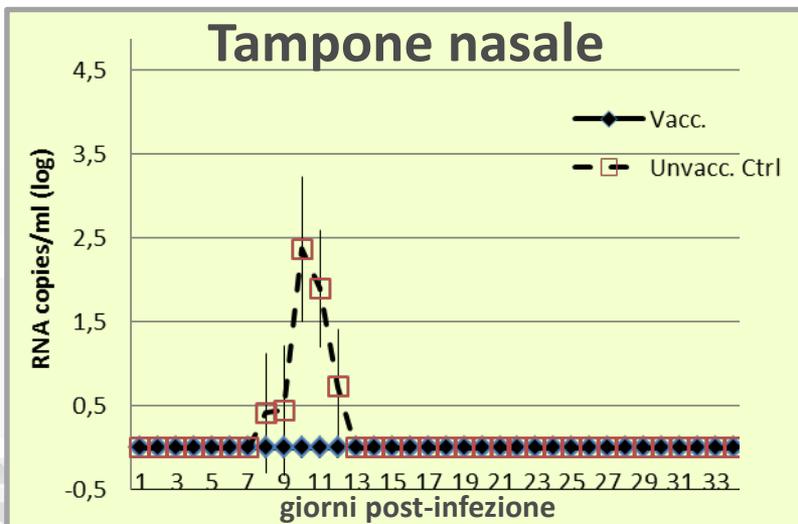
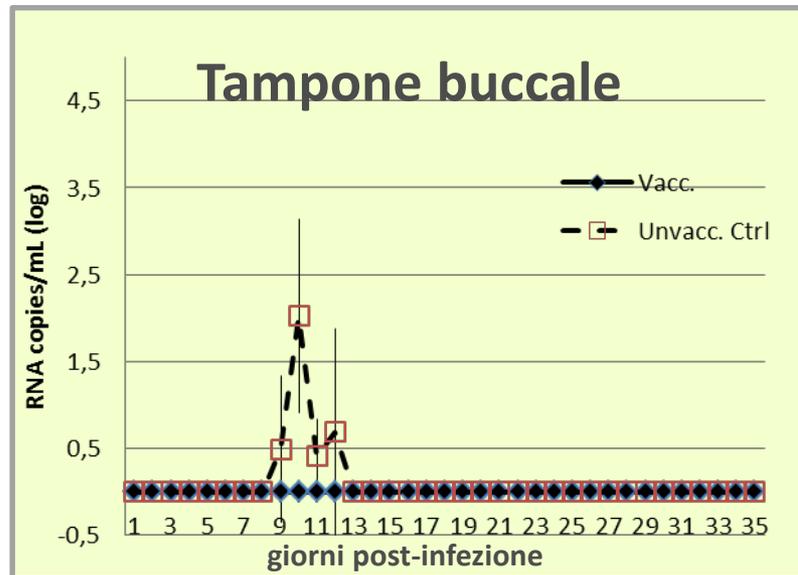
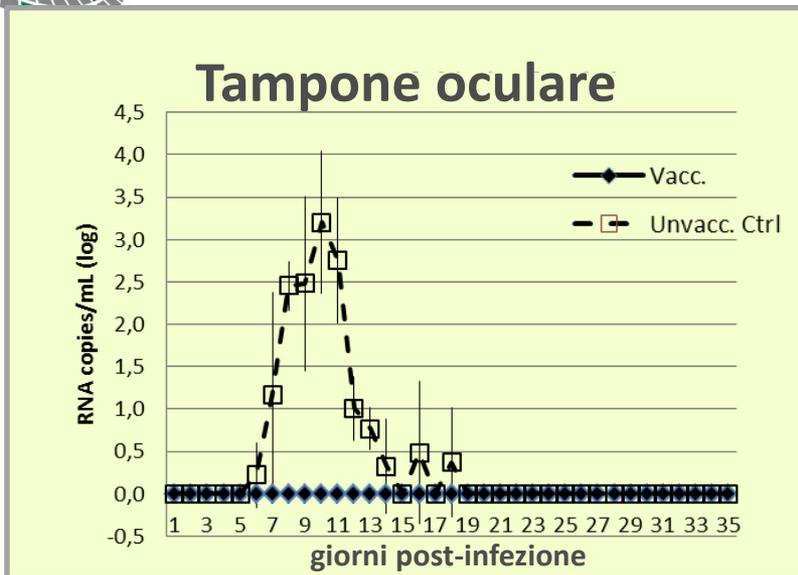


# Fase challenge (viremia)



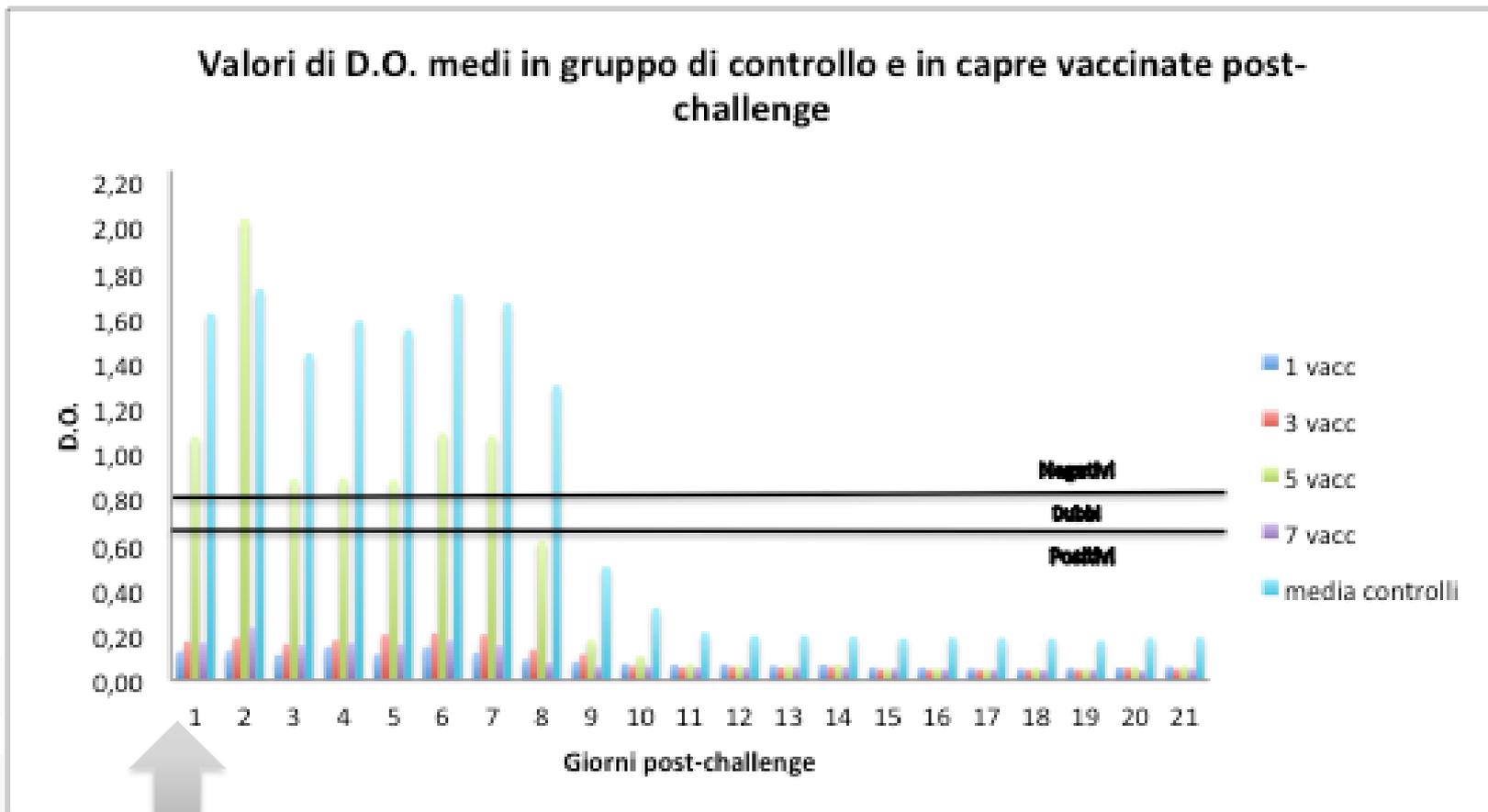
I campioni sono stati analizzati mediante RT-qPCR (Polci et al., 2013)

# Fase challenge (escrez. vir.)



I campioni sono stati analizzati mediante RT-qPCR (Polci et al., 2013)

# Fase challenge (sierologia)



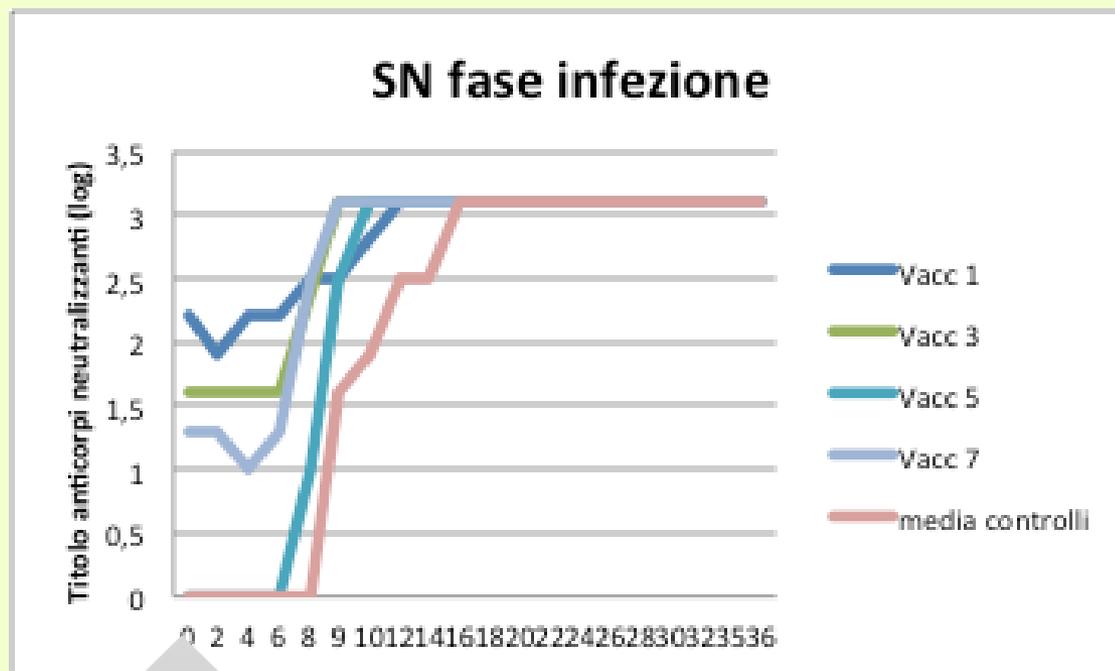
Infezione

I campioni sono stati analizzati mediante ELISA comp.

(ID Screen® PPR Competition ELISA kit)



# Fase challenge (sierologia)



Infezione

I campioni sono stati analizzati mediante Siero neutralizzazione

(OIE Terrestrial Manual 2013, chapter 2.7.11)





I. I dati confermano l'utilità del ratto come modello predittivo dell'immunogenicità anche di vaccini inattivati PPR, come già riportato per gli attenuati, con evidente risparmio di risorse.

II. La doppia somministrazione del vaccino stimola una risposta anticorpale nel 100% degli animali vaccinati senza manifestare istolesività.

III. Gli anticorpi vaccinali sono ancora rilevabili dopo oltre 4 mesi dall'inoculazione del vaccino nel 75% dei soggetti.



IV. La vaccinazione ha conferito protezione contro l'infezione sperimentale (assenza di febbre, viremia e eliminazione virale) anche in assenza di titoli rilevabili al momento del challenge (cellulo-mediata?).

V. Il vaccino inattivato IZSAM-Biopharma è risultato essere efficace e merita di essere ulteriormente valutato in più ampi studi di campo.



Transboundary and Emerging Diseases

SHORT COMMUNICATION

## Evaluation of Humoral Response and Protective Efficacy of an Inactivated Vaccine Against Peste des Petits Ruminants Virus in Goats

G. M. Cosseddu<sup>1</sup>, A. Polci<sup>1</sup>, C. Pinoni<sup>1</sup>, A. Capobianco Dondona<sup>1</sup>, F. Iapaolo<sup>1</sup>, G. Orsini<sup>1</sup>, F. Izzo<sup>1</sup>, G. Bortone<sup>1</sup>, F. G. Ronchi<sup>1</sup>, M. Di Ventura<sup>1</sup>, M. El Harrak<sup>2</sup> and F. Monaco<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo, Italy  
<sup>2</sup> Biopharma, Rabat-Akkari, Morocco



### Preliminary results on innocuity and efficacy of an inactivated PPR vaccine

Ronchi Gaetano Federico<sup>1</sup>, Monaco Federica<sup>1</sup>, El Harrak Mehdi<sup>2</sup>, Loutfi Chafiq<sup>2</sup>, Orsini Gianluca<sup>1</sup>, Capista Sara<sup>1</sup>, Bortone Grazia<sup>1</sup>, Iorio Mariangela<sup>1</sup>, Pinoni Chiara<sup>1</sup>, Pini Attilio<sup>1</sup>, Di Ventura Mauro<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo, Italy; <sup>2</sup> Biopharma Laboratory, Rabat, Morocco

**Introduction**  
Peste des Petits ruminants (PPR) is a highly contagious viral disease of sheep and goats characterized by pyrexia, mucopurulent nasal and ocular discharge, necrotizing and erosive stomatitis, enteritis and pneumonia (1). The virus belongs to the family *Paramyxoviridae* and it represents a threat to livestock production in many countries (2). In recent years outbreaks of PPR have occurred in the European Turkey and in the North African countries (3). In a non-endemic area, mortality and morbidity may vary depending upon population susceptibility, in severe cases it may be up to 90-100% (4). Concurrent bacterial, viral or parasitic infections may aggravate the condition. Four different live attenuated vaccines are commercially available (5), their use in a non-endemic region such as Europe could be not accepted by Veterinary Authorities and farmers.

**Materials and methods**  
**Virus strain**  
The used virus for vaccine production originates from the Moroccan strain V101, isolated from goats which succumbed to the disease during the 2008 outbreak (6). The virus at 10<sup>7.5</sup> passages on Vero cells was submitted to the quality and infectivity control tests: - virus identity - viral purity - virus titer - safety for bacterial, fungal and mycoplasma.  
**Cells**  
Vero cells, controlled for bacterial, fungal, mycoplasma and viral contaminants were inoculated using DMEM growth medium.  
**Virus purification and concentration**  
The inactivated virus suspension was concentrated/purified 1:10 through tangential flow filtration using Millipore cassette (7).  
**Vaccine formulation**  
Three aliquots of the virus suspension were tested, the first ten times concentrated, the second brought to the original volume, both were adjuvanted with three different products (SA 77, kindly provided by Zoopp<sup>®</sup>, AFSA1 and AFSA2 (8) kindly provided by Nyalba Biopharma, Verona - Australia). The virus preparations were stored at

**Abstract**  
Peste des Petits ruminants (PPR) also belongs to the family *Paramyxoviridae* and it represents a threat to livestock production. In recent years outbreaks of PPR have occurred in the European Turkey and in the North African countries in the Mediterranean basin. In endemic areas prevention is accomplished using a live attenuated vaccine. However, the use of such vaccine in a non-endemic region as Europe could be not accepted by Veterinary Authorities and farmers. In this study, we reported the preliminary results on the safety and immunogenicity of an inactivated PPR vaccine. The virus suspension, obtained by tangential flow filtration, was concentrated and inactivated with SA 77. After inactivation, the suspension was reconstituted and purified through tangential flow filtration. The vaccine (different in antigen concentration and adjuvants used: SA 77, Zoopp<sup>®</sup> provided by Zoopp, AFSA1 and AFSA2 kindly provided by Nyalba Biopharma) was submitted to quality and infectivity control tests. The vaccine was then tested on Vero cells, controlled for bacterial, fungal and mycoplasma contamination. From the results in *in vitro*, the concentrated vaccine formulated with PPR was shown to be a 10<sup>7.5</sup> passages. The vaccine was tested on Vero cells, with both of the products. Three goats were kept in control. No adverse reactions were observed. Identical virus control test of negative results. The concentration was assessed with both SA 77 and an other manufacturer. The infectious activity was quantified at 10<sup>7.5</sup> and increased further throughout the experiment (SA 77, Zoopp<sup>®</sup> difference in optical density (OD) value between non-inactivated and inactivated vaccine was 10<sup>7.5</sup> and 10<sup>7.5</sup> respectively. The vaccine was tested on Vero cells and on sheep. PPR vaccinated animals showed a serological antibody response in all experiments. The control and the SA 77 was shown to be a convenient and useful tool for a preliminary assessment of the innocuity of PPR inactivated vaccine. The inactivated vaccine could be suitable as a vaccine alternative to the use of attenuated vaccine in PPR non-endemic regions in non-endemic areas.

ARTICLE AHEAD OF PRINT

## Preliminary results on innocuity and immunogenicity of an inactivated vaccine against the Peste des petits ruminants

Gaetano Federico Ronchi<sup>1</sup>\*, Federica Monaco<sup>1</sup>, Mehdi El Harrak<sup>2</sup>, Loutfi Chafiq<sup>2</sup>, Sara Capista<sup>1</sup>, Grazia Bortone<sup>1</sup>, Gianluca Orsini<sup>1</sup>, Chiara Pinoni<sup>1</sup>, Mariangela Iorio<sup>1</sup>, Federica Iapaolo<sup>1</sup>, Attilio Pini<sup>1</sup> & Mauro Di Ventura<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo, Italy  
<sup>2</sup> Biopharma Laboratory, Rabat, Morocco.

\* Corresponding author at: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo, Italy. Tel.: +39 0861 332410, e-mail: tronchi@izs.it.

Veterinaria Italiana 2016, xx(x), xxx-xxx. doi: 10.12834/VetIt.396.1876.2  
Accepted: 17.02.2016 | Available on line: xxx.x.2016



## Personale dipendente e a contratto dei Reparti:

- Vaccini virali, sieri e diagnostici
- Diagnostica e Sorveglianza Malattie Virali Esotiche
- Tecnico Unità Stagna: Vincenzo D'Innocenzo
- Biopharma Marocco
- Ministero Salute