

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Sviluppo di un vaccino inattivato contro la Lumpy Skin Disease

Sara Capista, Lilia Testa

Reparto Produzione Vaccini Virali e
presidi diagnostici

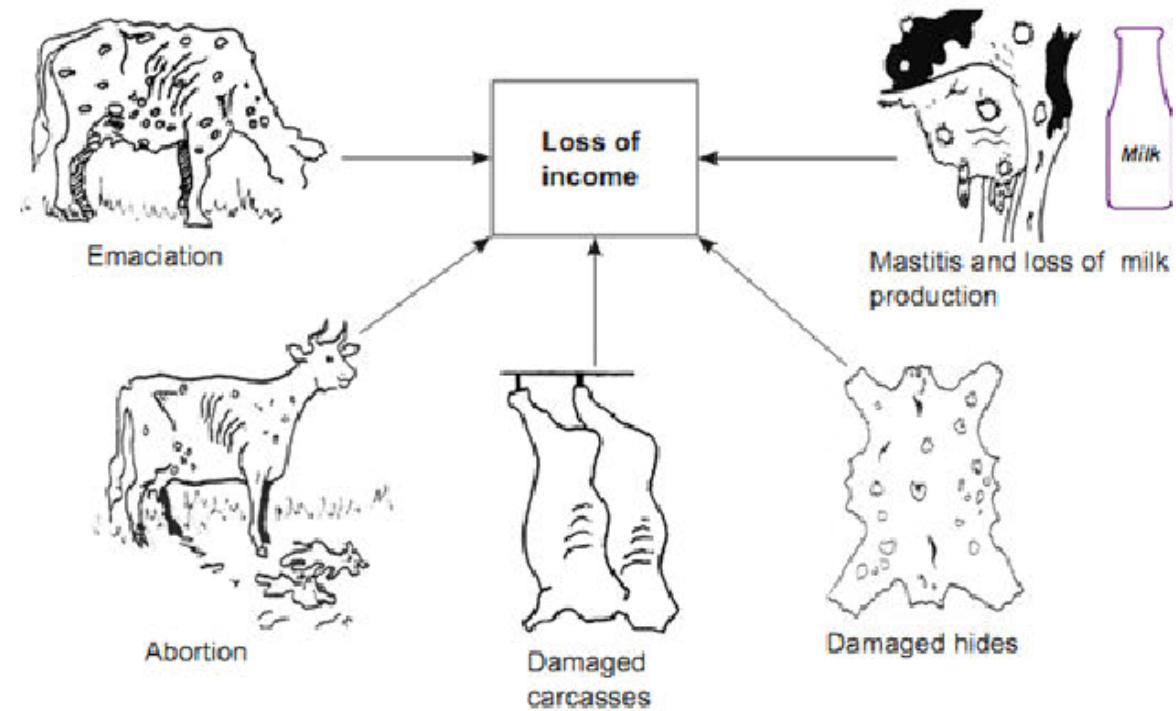
15 Giugno 2022

Lumpy Skin Disease Virus (LSDV)

- **Appartenenza:** famiglia *Poxviridae*, genere *Copripoxvirus*
- **Specie bersaglio:** bovini
- **Sintomi:** febbre, comparsa di noduli nell'epidermide e nel derma, linfadeniti. Spesso si associano anche depressione, anoressia, salivazione eccessiva, secrezioni oculo nasali e dimagrimento

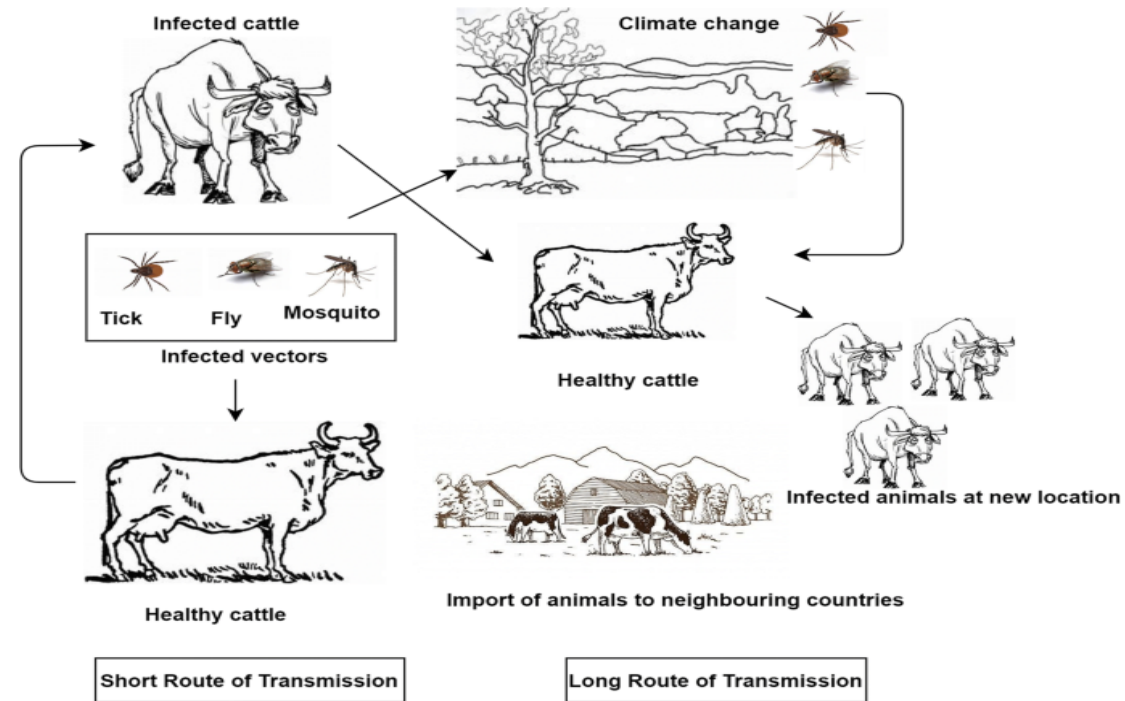


- **Effetti:** calo di produzione latte, aborti, infertilità e perdita di qualità delle pelli degli animali colpiti



- **Trasmissione:** mediante insetti ematofagi (che utilizzano gli artropodi come vettore meccanico)

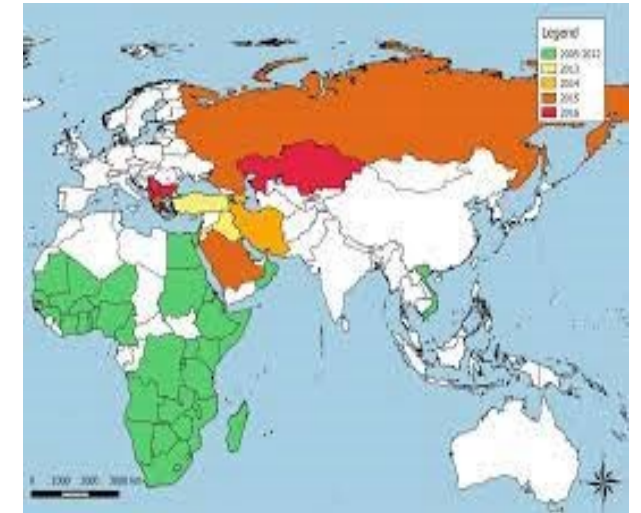
Attualmente non è conosciuto un vettore biologico



- **Distribuzione sul territorio:** molti paesi africani, dal Medio Oriente verso l'Europa sud orientale (dal 2012), in alcuni stati dell'Europa (Grecia, Bulgaria, Serbia, Albania e Montenegro, nel 2015)
- **Contenimento:** divieto di movimentazione degli animali, abbattimento degli animali infetti e vaccinazione
- **Presidi immunizzanti disponibili:** vaccini vivi attenuati

Controindicazioni:

- possibilità di rivirulentazione
- reazioni avverse simili alla malattia ma più lievi



IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Scopo del progetto:

sviluppare un vaccino inattivato nei confronti di LSD che sia

- sicuro
- efficace
- che permetta di identificare gli animali vaccinati (KLH)

Obiettivo:

- verificare, in vacche a diversi stadi di lattazione, che il vaccino non modifichi le caratteristiche quali e quantitative del latte prodotto
- possibilità di utilizzare il modello animale cavia per la valutazione dell'immunogenicità del vaccino in alternativa al bovino

Produzione del vaccino inattivato contro LSD

Selezione linee cellulari:

- **VERO:** linea cellulare epitelica renale derivata da una scimmia verde africana. Vero prende il nome da una derivazione del rognone verde - Verda Reno.
- **McCoy:** linea cellulare fibroblastica che ha avuto origine dal liquido sinoviale nell'articolazione del ginocchio di un paziente affetto da artrite degenerativa.
- **BHK21 in sospensione:** linea cellulare di fibroblastica derivata dai reni di criceto (baby hamster kidneys) adattata alla crescita in sospensione
- **MDBK:** linea cellulare epiteliale derivata dal tessuto renale di un manzo adulto (Madin-Darby Bovine Kidney)



Tra le linee cellulari continue saggiate è stata selezionata quella MDBK che ha prodotto, nelle prove di infezione, titoli virali maggiori rispetto alle altre



- **Linea cellulare Primaria di Testicolo di agnello (T.A.):** prodotta a partire da testicoli di un agnello di 3 mesi di età (Reparto di Vaccini Virali e presidi diagnostici IZSA&M)

Infezione: MOI (Molteplicità di infezione) selezionato pari a 0,1

Produzione formulazioni vaccinali:

Produzione di monostrati cellulari MDBK e Testicolo di Agnello a confluenza del 90%



Infezione per adsorbimento con W.S. LSD (MOI di 0,1) per 2h a 37°C

Aggiunta di terreno e incubazione a 37°C per 7gg (raggiungimento ECP 90/100%)

Raccolta delle sospensioni e centrifugazione a 1942G per 30'

Surnatante raccolto e posta in frigo a +4°C.

Pellet risospeso in PBS, congelato a -80°C per 24h, scongelato e nuovamente centrifugato



Le sospensioni virali ottenute da SURNATANTE e da PELLETT sono state quindi riunite e sottoposte ai controlli previsti dalla Farmacopea Europea

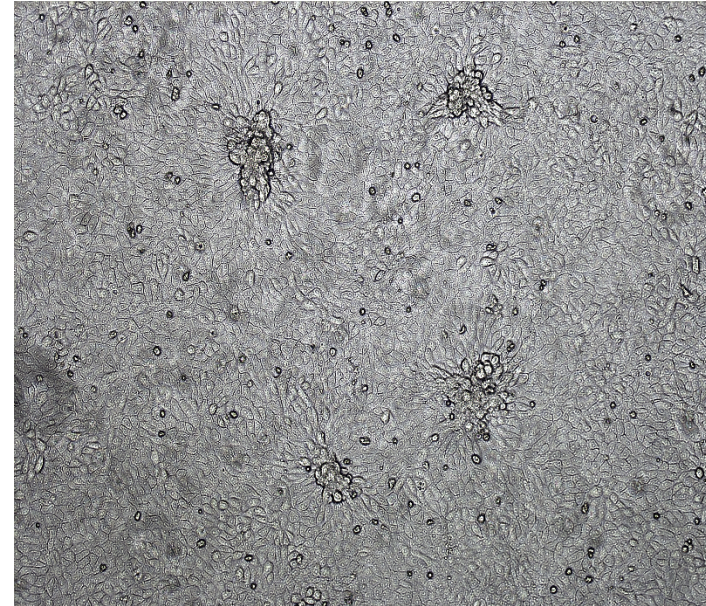
IZS

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



Controllo cellule MDBK

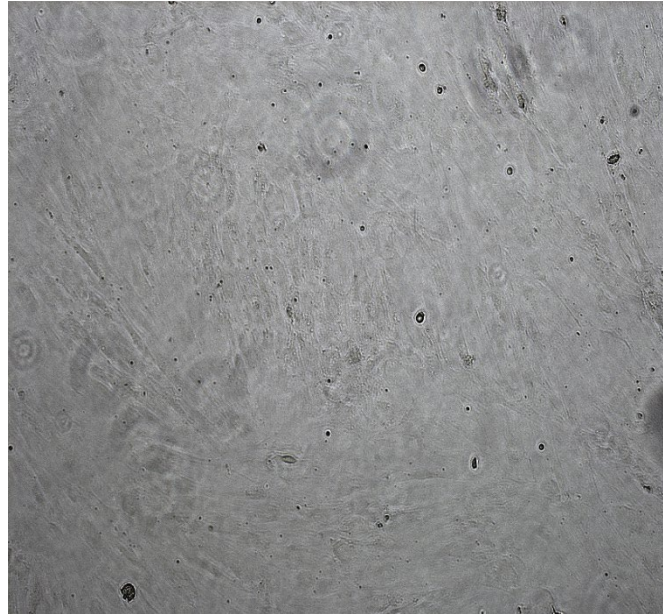


MDBK 4 giorni P.I.

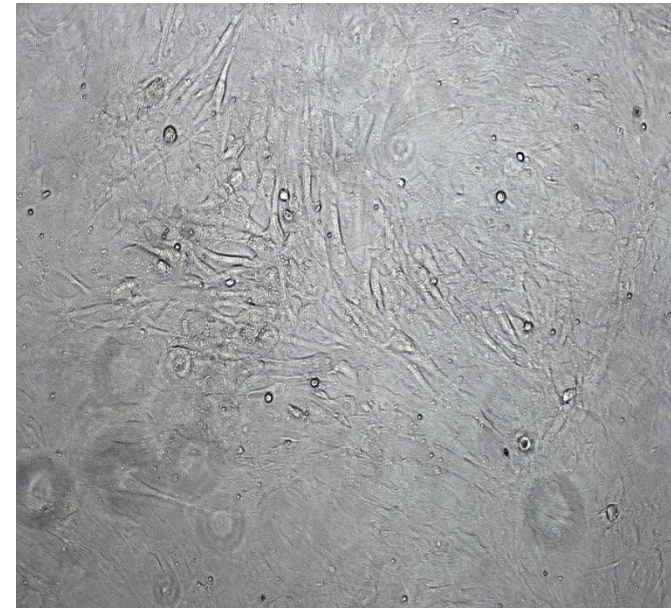
IZS

TERAMO

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



Controllo cellule T.A.



T. A. 4 giorni P.I.

Inattivazione:

Sospensione virale da MDBK
Titolo iniziale 10^{6,1} TCD₅₀/ml



Sospensione virale da T.A.
Titolo iniziale 10^{5,6} TCD₅₀/ml



- Inattivazione con BEI (aminoethyl ethylene imine) 5 mM a 37° per 26h
- Stop dell'inattivazione con soluzione di sodio Tiosolfato 1M (2%V/V)
- Concentrazione/purificazione con flusso tangenziale. Cassette da 300KD (10X)

Nuovo ciclo di inattivazione e controlli finali



Aliquota da MDBK
senza KLH

Aliquota da MDBK
con KLH (120µg/ml)

Aliquota da T.A.
senza KLH

Aliquota da T.A. con
KLH (120µg/ml)

KLH: Proteina esogena (SIGMA H8283-500mg)

- Aggiunta di adiuvante Montanide Gel in ragione del 10% V/V: 25°C per 24h al buio
- Emulsione dell'adiuvante e aggiunta di saponina (0,3 mg/ml) per 3 ore a 25°C



Produzione di un lotto di PLACEBO senza KLH



Produzione di un lotto di PLACEBO con KLH

Tabella 1: tipologie di vaccino prodotte e composizione

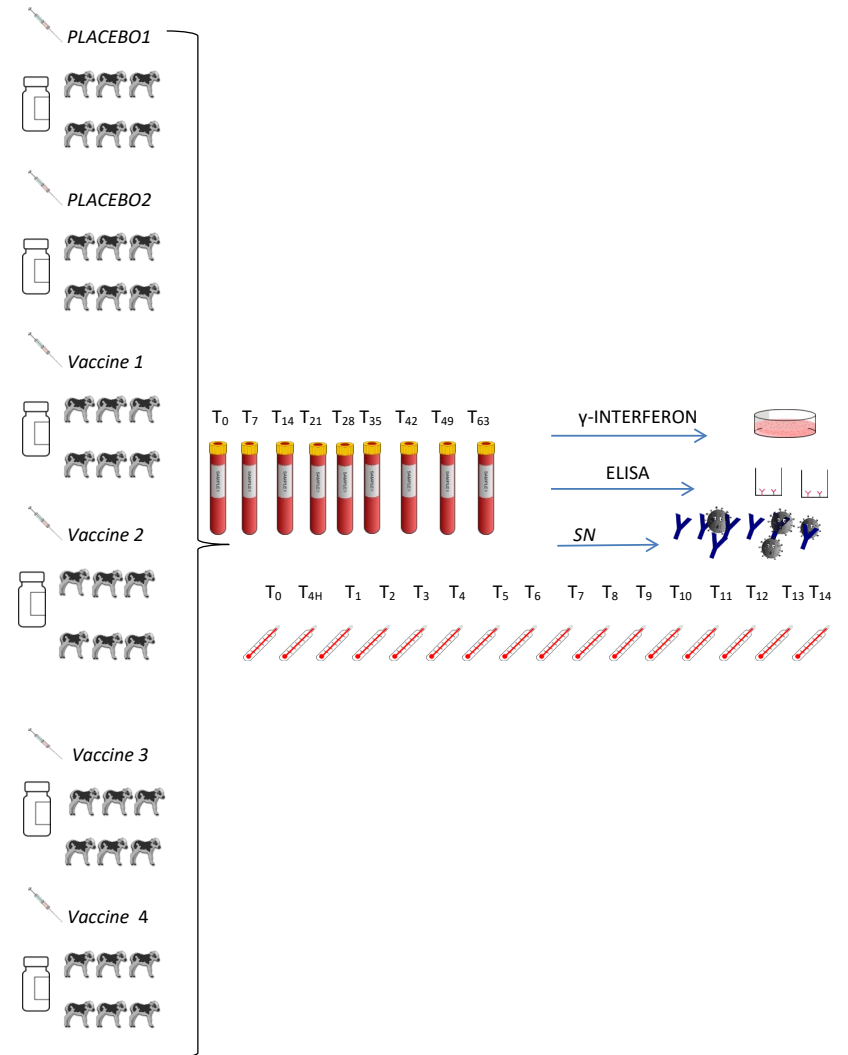
Virus	Substrato cellulare utilizzato	Proteina KLH	Adiuvante	Lotto vaccino
LSDV	Testicolo di agnello	Si		(VACCINO LOTTO 904)
LSDV	Testicolo di agnello	No	Montanide Gel	(VACCINO LOTTO 905)
LSDV	MDBK	Si	+ Saponina	(VACCINO LOTTO 906)
LSDV	MDBK	No		(VACCINO LOTTO 907)

Tabella 2: tipologie di placebo e composizione

	Substrato cellulare utilizzato	Proteina KLH	Adiuvante	Lotto vaccino
PBS	//	Si	Montanide Gel +	912
PBS	//	No	Saponina	913

Costituzione dei gruppi sperimentali

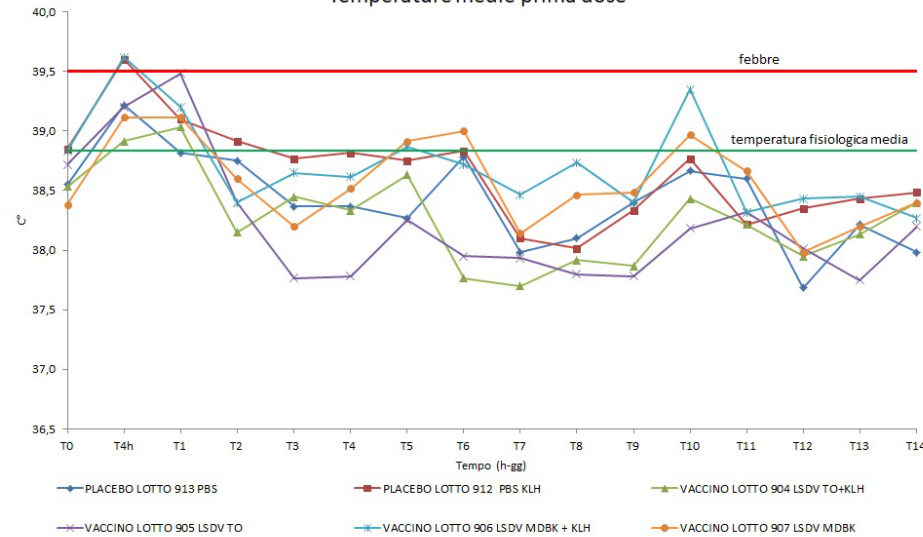
Prodotto inoculato	Dose/ via inoculazione	Numero Animale	Razza	Sesso	MESI
LOTTO 912 PLACEBO + KLH	2ml/i.m.	1	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	2	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	3	Frisona	M	5
	2ml/i.m.	4	Frisona	M	6
	2ml/i.m.	5	Frisona	M	6
	2ml/i.m.	6	Frisona	M	7
LOTTO 913 PLACEBO	2ml/i.m.	7	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	8	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	9	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	10	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	11	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	12	Frisona	M	6
LOTTO 904 VACCINO LSDV T.A. KLH	2ml/i.m.	13	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	14	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	15	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	16	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	17	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	18	Frisona	M	5
LOTTO 905 VACCINO LSD T.A.	2ml/i.m.	19	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	20	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	21	Frisona	M	6
	2ml/i.m.	22	Frisona	M	4
	2ml/i.m.	23	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	24	Frisona	M	4
LOTTO 906 VACCINO LSD MDBK + KLH	2ml/i.m.	25	Frisona	M	5
	2ml/i.m.	26	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	27	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	28	Frisona	M	8
	2ml/i.m.	29	Frisona	M	6
	2ml/i.m.	30	Frisona	M	6
LOTTO 907 VACCINO LSD MDBK	2ml/i.m.	31	Frisona	M	7
	2ml/i.m.	32	Frisona	M	6
	2ml/i.m.	33	Frisona	M	6
	2ml/i.m.	34	Frisona	M	6
	2ml/i.m.	35	Frisona	M	5
	2ml/i.m.	36	Frisona	M	6



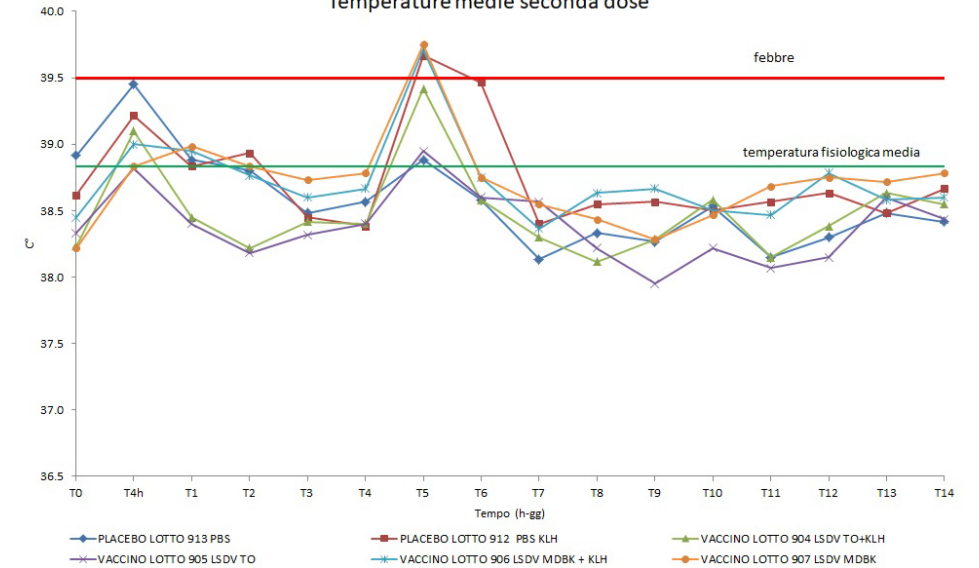
Sicurezza ed immunogenicità sui vitelli

Temperature

Prova di immunogenicità e sicurezza
Temperature medie prima dose



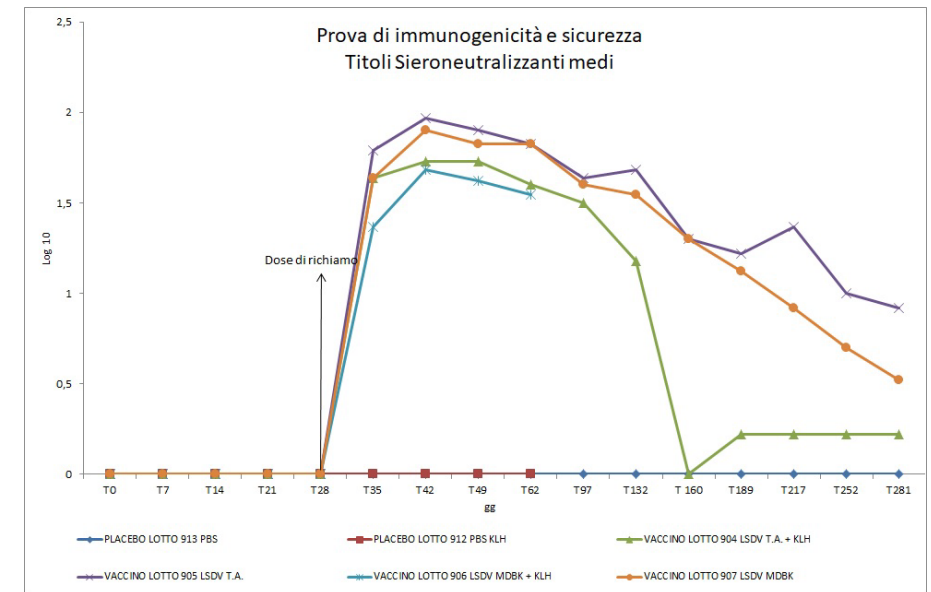
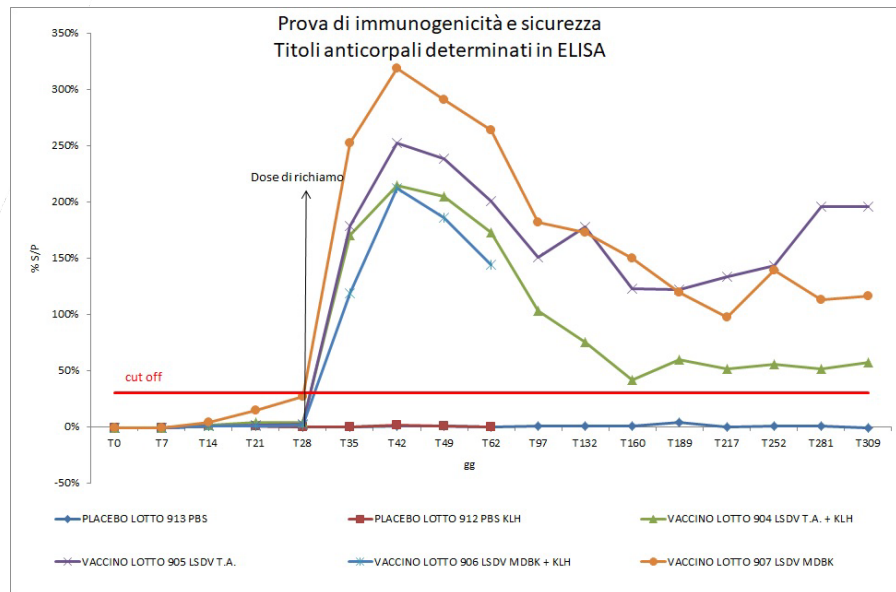
Prova di immunogenicità e sicurezza
Temperature medie seconda dose



Sicurezza ed immunogenicità sui vitelli

Risposta immunitaria: ELISA LSD e SN

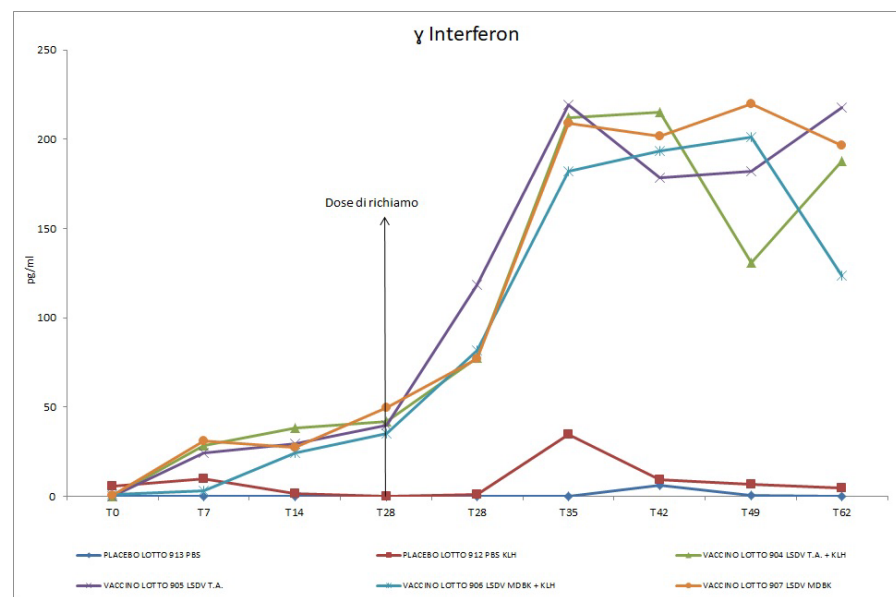
è stata evidenziata a partire dal T28 in ELISA e T53 in SN, entrambe dopo la somministrazione della dose di richiamo



Sicurezza ed immunogenicità sui vitelli

Risposta immunitaria: γ -interferon

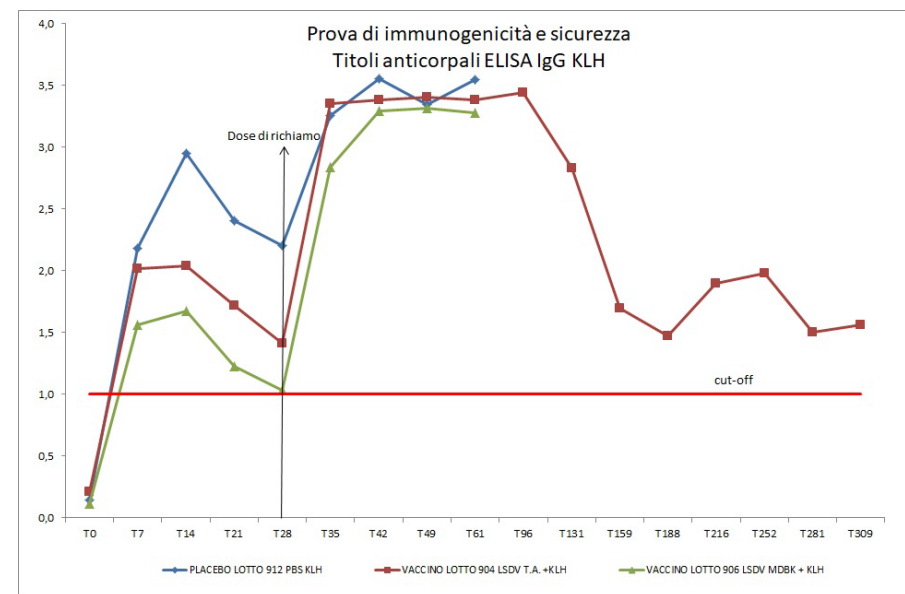
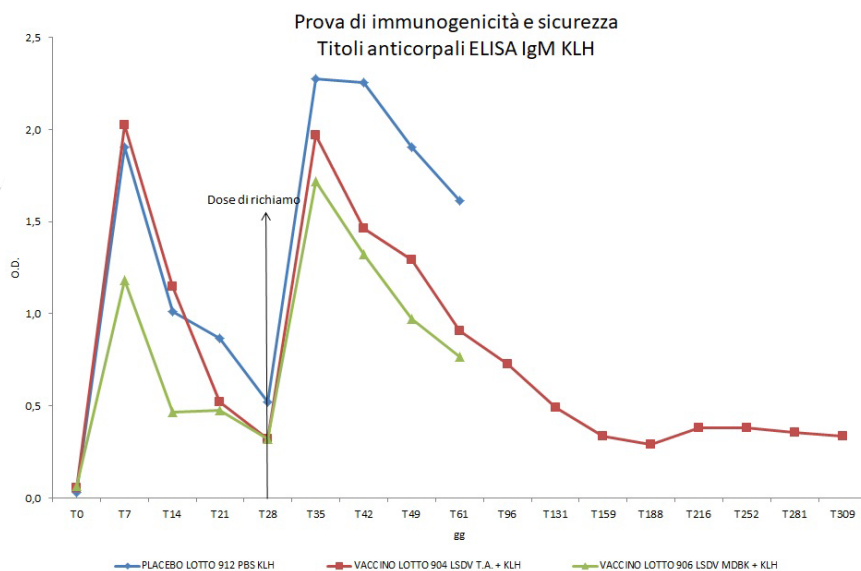
è stata evidenziata prima della somministrazione della dose di richiamo



Sicurezza ed immunogenicità sui vitelli

Risposta immunitaria: ELISA KLH IgM-IgG

è stata evidenziata precocemente già al 7° giorno dopo somministrazione della prima dose



Selezione gruppi da sottoporre a challenge

Le differenze nei parametri monitorati in termini di immunogenicità, tra i vari vaccini, pur essendo apprezzabili non erano statisticamente significative ($p < 0.05$)




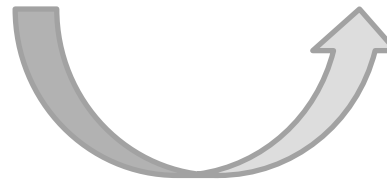
VACCINO LSD MDBK + KLH e PLACEBO KLH

La formulazione vaccinale è stata selezionata in quanto faciliterebbe i processi di industrializzazione del vaccino e permetterebbe l'identificazione degli animali vaccinati

Efficacia sui vitelli

Challenge: 12 vitelli

- infezione sperimentale con virus di campo avente titolo pari a $10^{6,62}$ TCID₅₀/ml
- 4 inoculazioni intradermiche da 0,5 ml ed 1 intravenosa da 5 ml
7 ml virus/capo 
- Controllo clinico giornaliero e valutazione dello score clinico
- Rilievo della temperatura corporea per 36 giorni consecutivi
- Prelievi di sangue a cadenza stabilita fino al T55
- Con la stessa cadenza fino al T38 sono stati effettuati tamponi nasali, buccali ed oculari



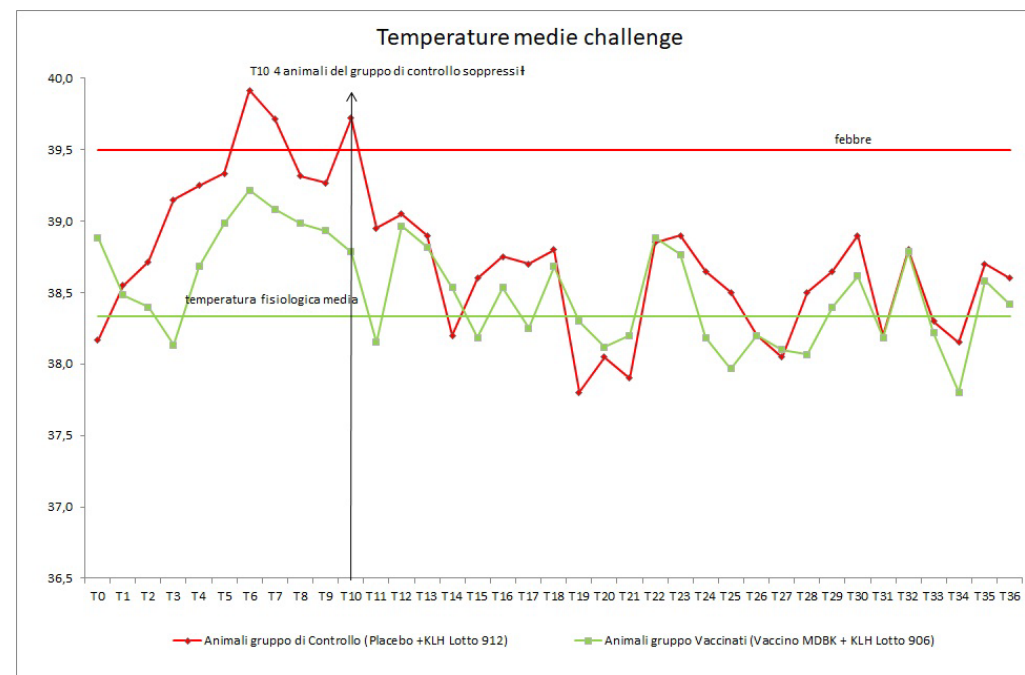
Efficacia sui vitelli

Challenge: temperature

Differenze tra i gruppi in studio già al T3 ($p < 0,05$)

T7

L'83% degli animali di controllo mostrava rialzo febbrile contro il 33% degli animali vaccinati



La somma ottenuta dai valori attribuiti per ciascun parametro determinava il punteggio totale di score clinico di ciascun animale. Il valore 13 è stato impostato come soglia

Efficacia sui vitelli

Challenge: SCORE CLINICO

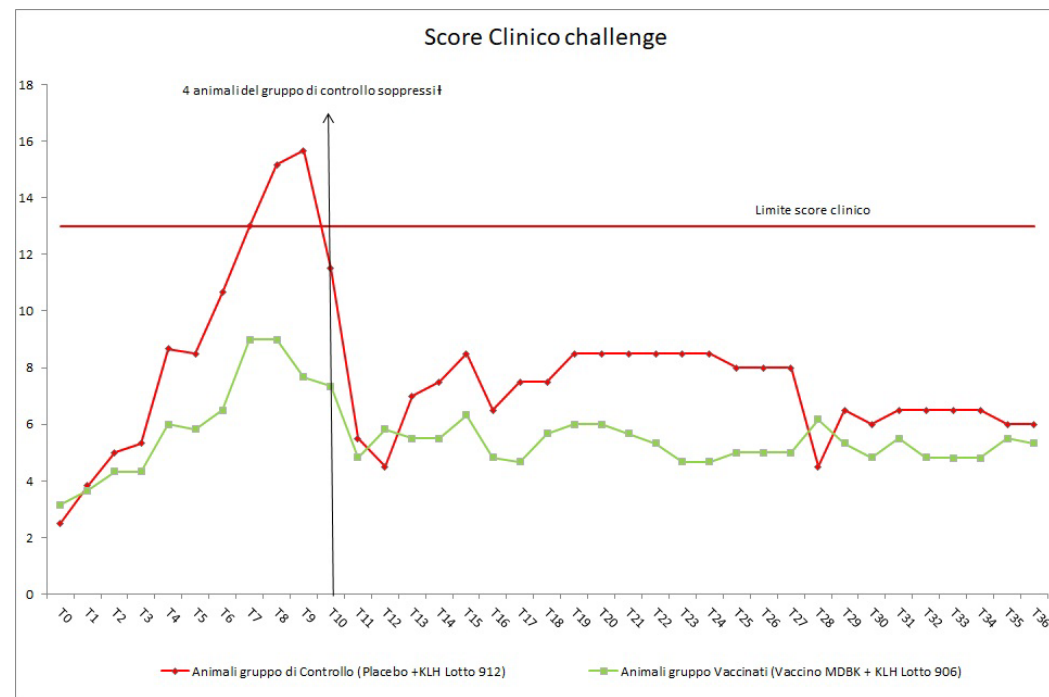
Macro-categorie	Aspetti sui quali concentrare l'attenzione nell'osservazione degli animali	Indicatori specifici da monitorare	Punteggio
Aspetto	Condizione fisica	Aumento/ calo ponderale	
	Stato del mantello e della cute	Piloerezione	
		Mantello arruffato	
		Perdita di pelo	
		Disidratazione	
		Lesioni della cute	
	Occhi	Infossati o spenti	
		Chiusi/socchiusi	
		Lesioni oculari	
	Bocca	Salivazione	
Lesioni			
Orecchie	Ruotate verso l'esterno e/o all'indietro		
	Respirazione	Tachipnea, iperpernea, dispnea	
Funzioni corporee	Assunzione di cibo/acqua	Aumentata/ridotta	
Comportamenti	Interazione sociale	Alterazione del comportamento normale: interazioni apprensive/aggressive, ansietà (fuga,	
		Comportamento ripetitivo/stereotipie	
	Comportamenti indesiderabili	Aggressività verso esseri umani o verso altri animali	
		Postura anormale	
	Postura e mobilità	Andatura anormale, claudicazione, mancanza di movimento/letargia/riluttanza a muoversi se stimolato	
		Movimenti non coordinati	
		Addome retratto, testa reclinata	
		Tremori	
	Altro	Crisi/convulsioni/spasmi	
		Vocalizzazioni	
Presenza e consistenza delle feci			
Ambiente	Ambiente di stabulazione, ivi compresi lettieri, elementi utilizzati per l'arricchimento ambientale	Presenza di sangue	
		Giaciglio bagnato/ sporco	
		Utilizzo o meno da parte degli animali dei materiali di arricchimento ambientale	

Efficacia sui vitelli

Challenge: SCORE CLINICO

Al T8 5 animali di controllo mostravano superamento del valore soglia

Al T10 abbattimento di 4 animali appartenenti al gruppo di controllo



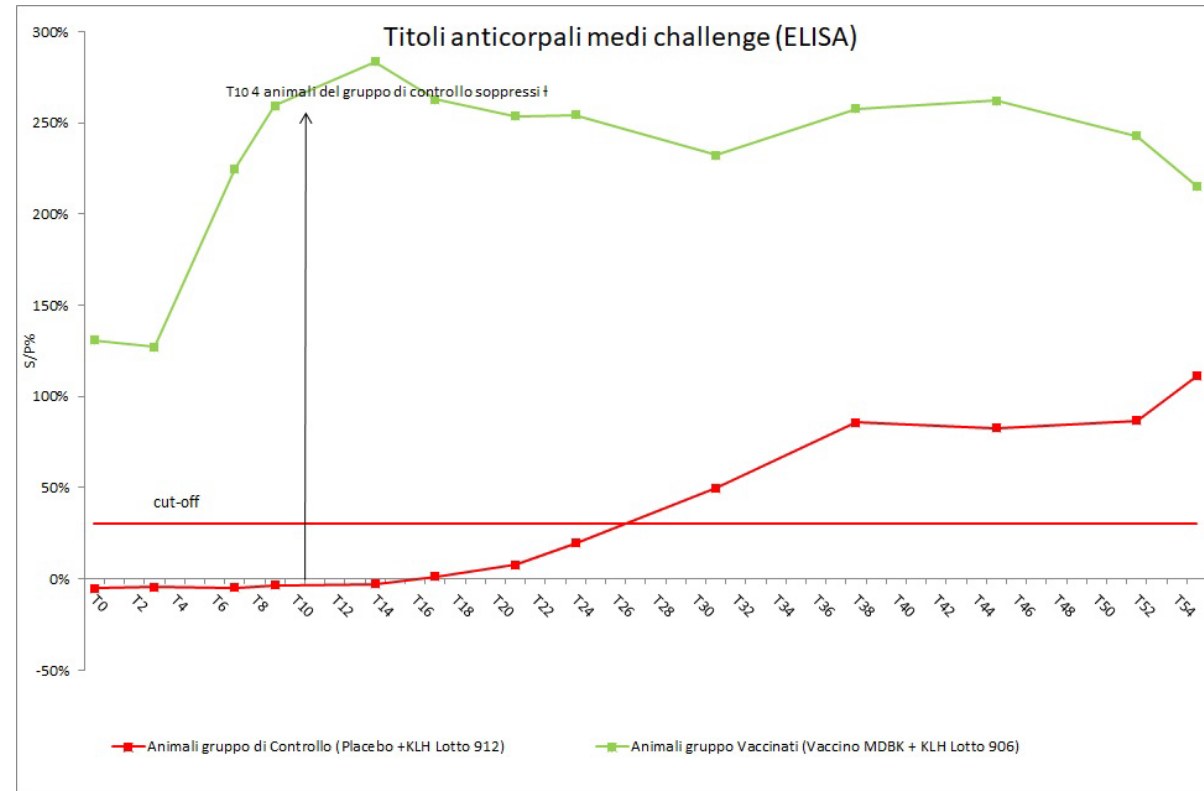
Efficacia sui vitelli

Analisi su sangue

- ELISA LSD (ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species IDVET) fino al T54
- Siero Neutralizzazione per LSDV fino al T55
- ELISA IgM per KLH (Bovine Anti KLH IgM ELISA Kit Alpha diagnostic International) fino al t52
- ELISA IgG per KLH (Bovine Anti KLH IgG ELISA Kit Alpha diagnostic International) fino al T52
- ELISA per γ -interferon su siero raccolto a seguito di stimolazione in vitro con antigene LSD (Bovine IFN- γ ELISABASIC Kit (HRP) Ditta MABTECH) fino al T38
- PCR per *capripoxvirus* fino al T38

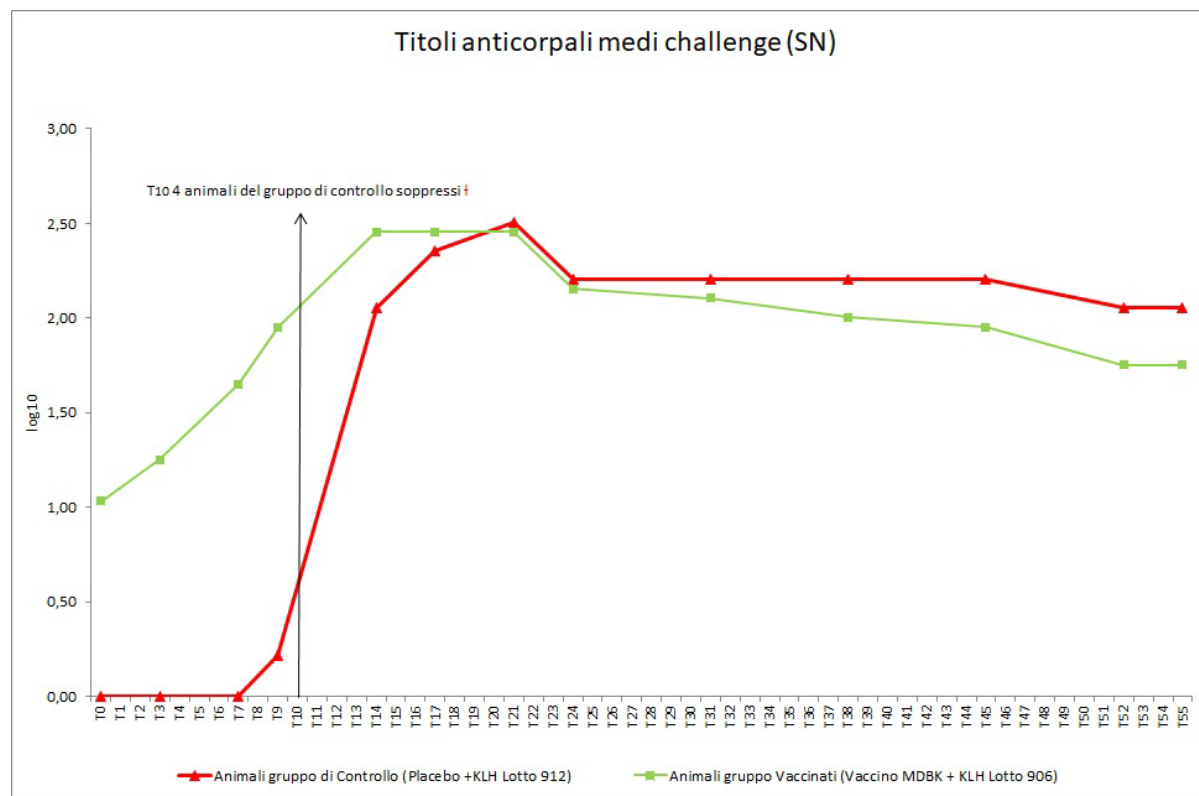
Efficacia sui vitelli

Challenge: ELISA



Efficacia sui vitelli

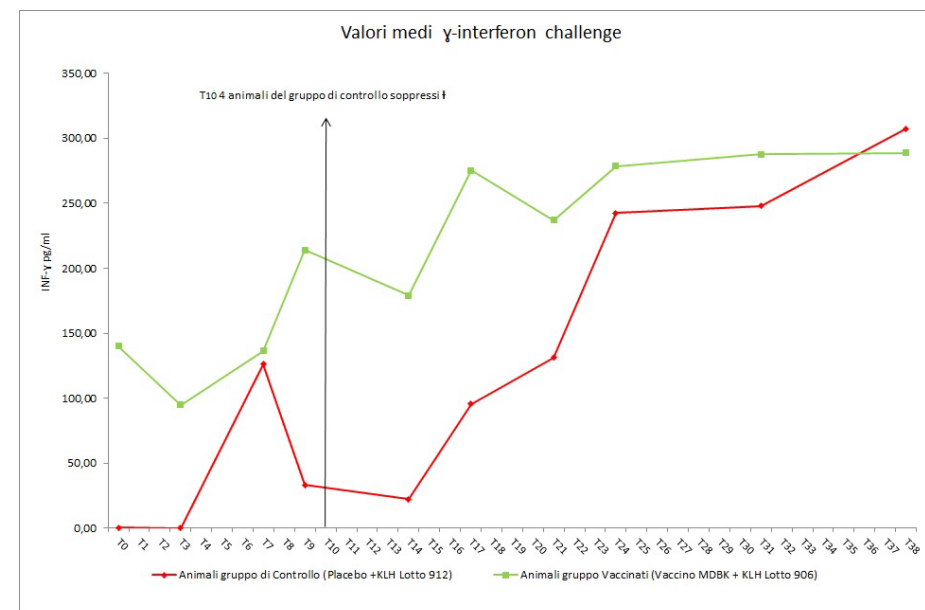
Challenge: SN



Efficacia sui vitelli

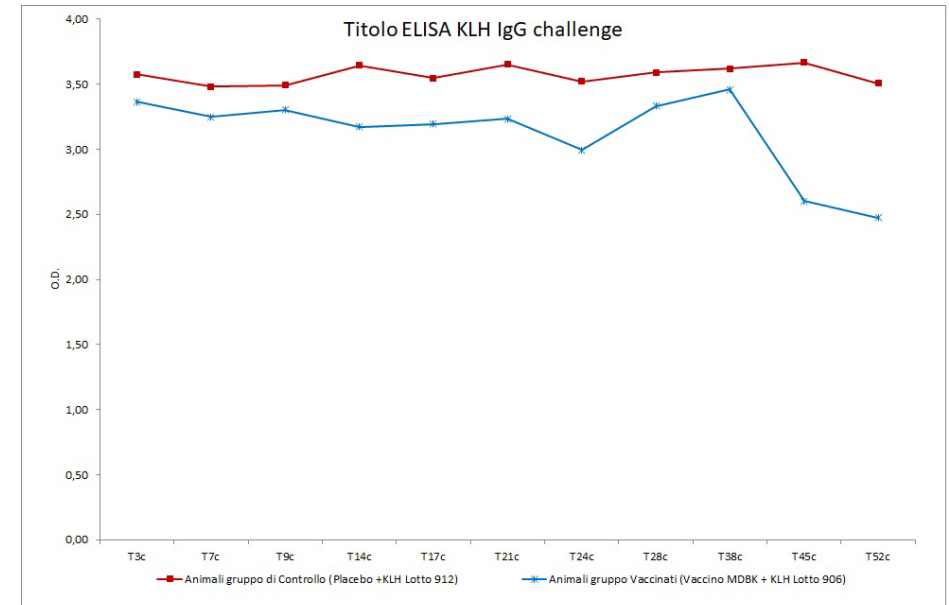
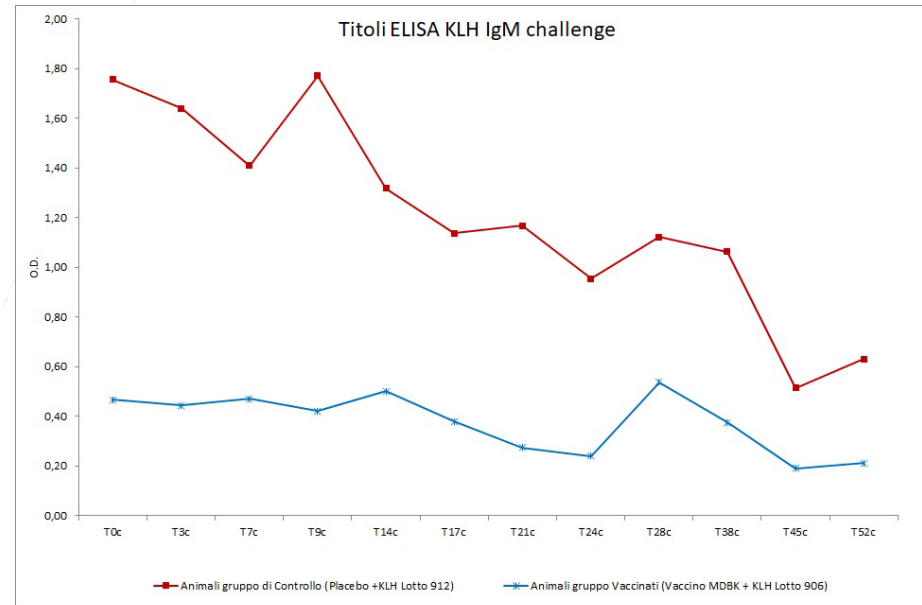
Challenge: γ -interferon

Differenze mostrate al
T0 perdurano fino al
T10



Efficacia sui vitelli

Challenge: IgM e IgG per KLH



Efficacia sui vitelli

Challenge: PCR su sangue e tamponi

PCR	Gruppo animali	TASSI POSITIVITA' TAMPONI
Sangue	Controllo (Placebo +KLH Lotto 913)	26,42%
	Vaccinati (Vaccino MDBK + KLH Lotto 906)	5,13%
Tamponi oculari	Controllo (Placebo +KLH Lotto 913)	28,89%
	Vaccinati (Vaccino MDBK + KLH Lotto 906)	23,75%
Tamponi buccali	Controllo (Placebo +KLH Lotto 913)	27,27%
	Vaccinati (Vaccino MDBK + KLH Lotto 906)	20,00%
Tamponi Nasali	Controllo (Placebo +KLH Lotto 913)	40,00%
	Vaccinati (Vaccino MDBK + KLH Lotto 906)	16,25%

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Effetti sulla lattazione e immunogenicità nelle vacche

Gruppo	Dose/ via inoculazione	Numero Animale	Razza	Sesso	Età (anni)
Gruppo animali vaccinati LOTTO 906 VACCINO LSD MDBK + KLH	2ml/i.m.	1	Frisona	F	5,2
	2ml/i.m.	2	Frisona	F	5,4
	2ml/i.m.	3	Frisona	F	6,8
	2ml/i.m.	4	Frisona	F	2,7
	2ml/i.m.	5	Frisona	F	3,2
	2ml/i.m.	6	Frisona	F	3,9
	2ml/i.m.	7	Frisona	F	4,1
	2ml/i.m.	8	Frisona	F	4,0
	2ml/i.m.	9	Frisona	F	3,5
	2ml/i.m.	10	Frisona	F	11,6
Gruppo animali di controllo	2ml/i.m.	11	Frisona	F	3,0
	2ml/i.m.	12	Frisona	F	4,9
	2ml/i.m.	13	Frisona	F	5,7
	2ml/i.m.	14	Frisona	F	5,7
	2ml/i.m.	15	Frisona	F	6,3
	2ml/i.m.	16	Frisona	F	4,1
	2ml/i.m.	17	Frisona	F	7,0
	2ml/i.m.	18	Frisona	F	5,9
	2ml/i.m.	19	Frisona	F	3,6
	2ml/i.m.	20	Frisona	F	6,0

IZS

T E R A M O

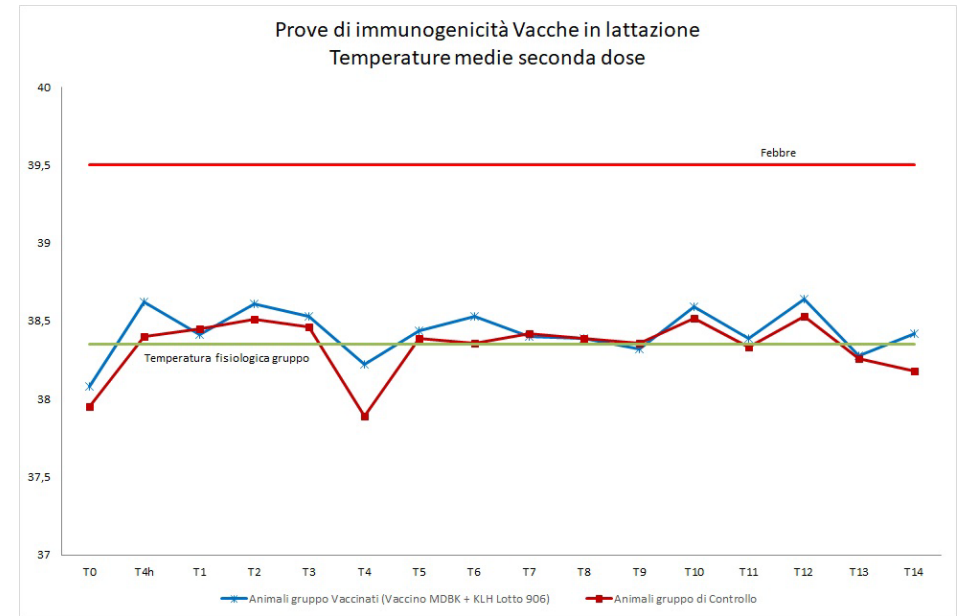
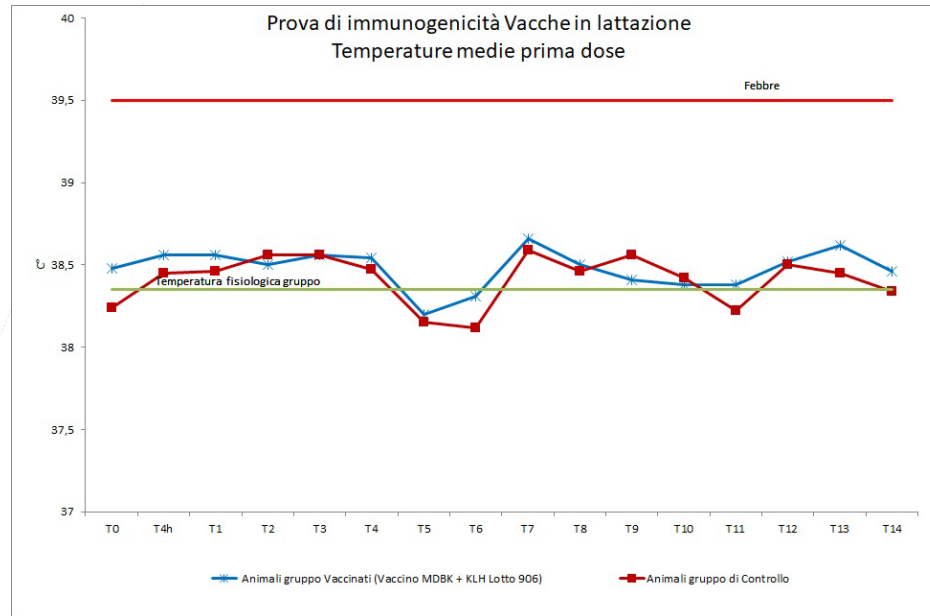
ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Effetti sulla lattazione e immunogenicità nelle vacche

- Controllo clinico giornaliero
- Rilievo della temperatura corporea al $T_0 - T_0 + 4h - e$ per 14 giorni consecutivi
- Misurazione della quantità di latte prodotta nella mungitura pomeridiana per 14 giorni consecutivi alle somministrazioni
- Settimanalmente prelievi di latte per le analisi chimico-fisiche
- Prelievi di sangue settimanali per lo studio della risposta anticorpale in ELISA ed SN

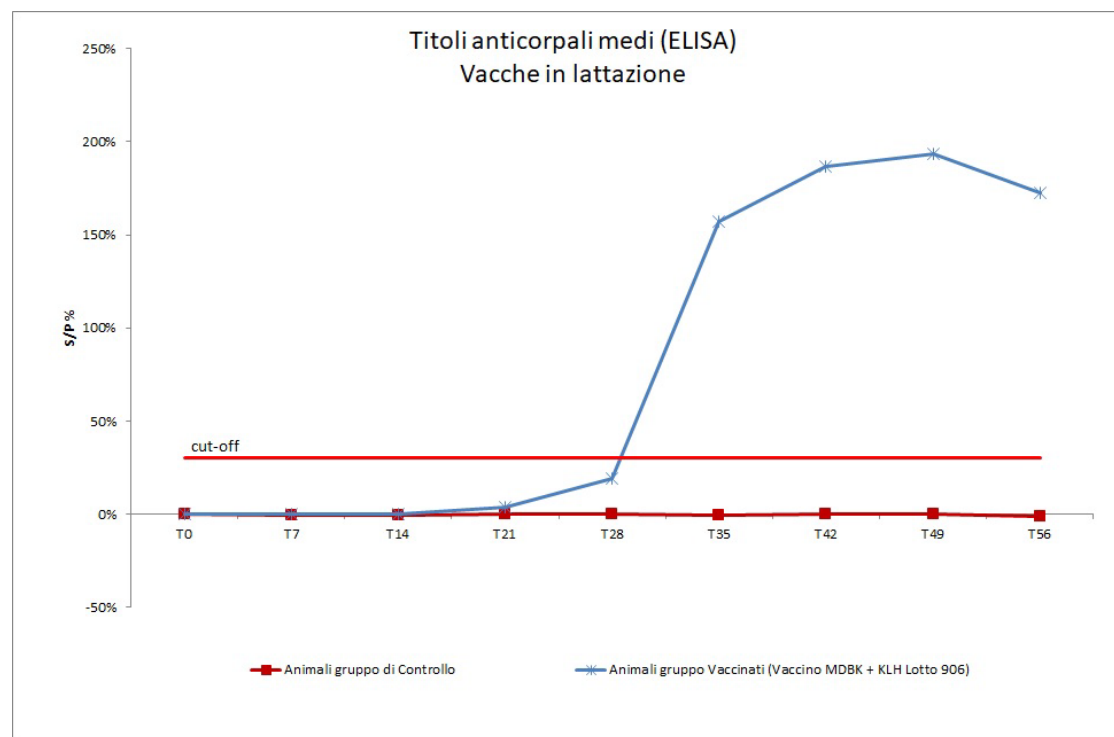
Effetti sulla lattazione e immunogenicità nelle vacche

- Nessun rialzo della temperatura corporea durante tutto lo studio
- Nessuna reazione locale e/o generali



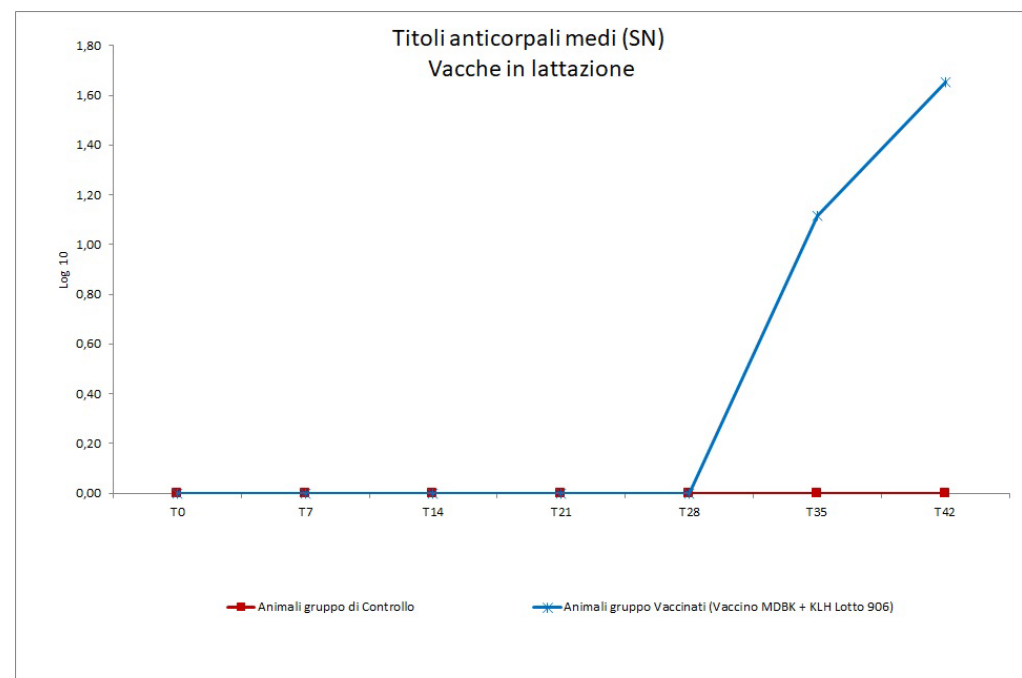
Effetti sulla lattazione e immunogenicità nelle vacche

- ELISA: andamento dei titoli anticorpali mostrava il 100% di positività a partire dal T35 fino al T52



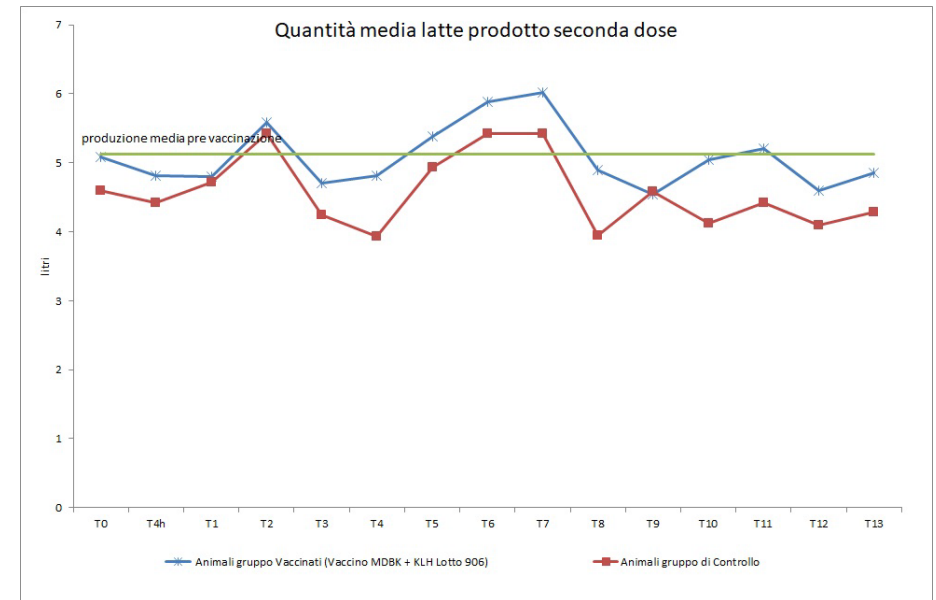
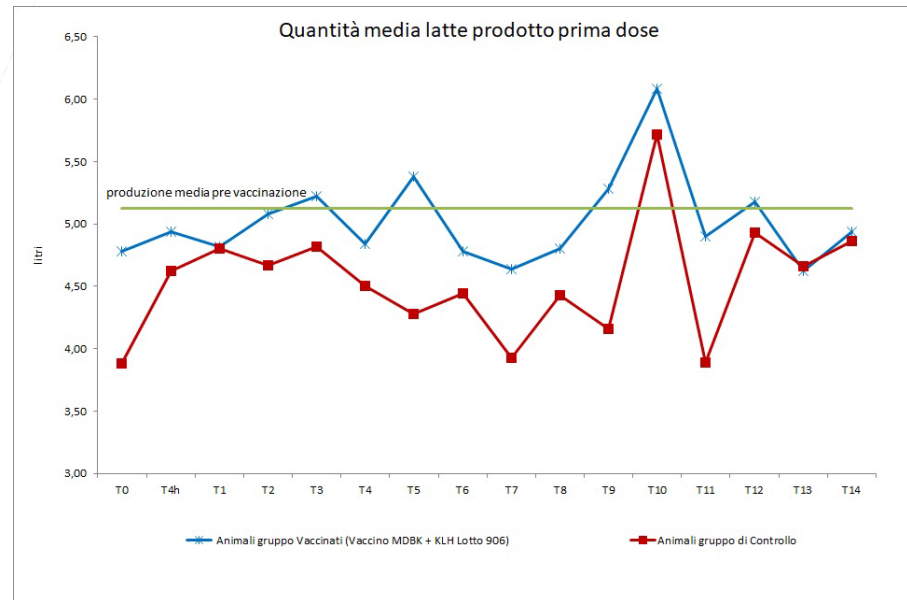
Effetti sulla lattazione e immunogenicità nelle vacche

- I titoli sieroneutralizzanti al T35 e T42 erano presenti nel 90% degli animali con valori che oscillavano da 1:10 a 1:80



Effetti sulla lattazione e immunogenicità nelle vacche

- I parametri chimico fisici controllati a cadenza settimanale (caseina, cellule somatiche, lipidi, proteine, residuo secco magro) non hanno fatto segnalare nessuna variazione
- La quantità media di latte misurata non mostra variazioni statisticamente significative



Immunogenicità su cavia

Tabella 7: gruppi cavia inoculate per prova immunogenicità.

Vaccine	Dose/ via inoculazione	Numero animale	Cavia/Razza	Peso	Sesso
LSDV inattivato MDBK+ GEL + SAP+ KLH LOTTO 906	0,5 ml/i.m.	1	Dunkin Hartley	400g	M
	0,5 ml/i.m.	2	Dunkin Hartley	400g	M
	0,5 ml/i.m.	3	Dunkin Hartley	400g	M
	0,5 ml/i.m.	4	Dunkin Hartley	400g	M
	0,5 ml/i.m.	5	Dunkin Hartley	400g	F
	0,5 ml/i.m.	6	Dunkin Hartley	400g	F
	0,5 ml/i.m.	7	Dunkin Hartley	400g	F
	0,5 ml/i.m.	8	Dunkin Hartley	400g	F
PLACEBO	0,5 ml/i.m.	9	Dunkin Hartley	400g	M
	0,5 ml/i.m.	10	Dunkin Hartley	400g	M
	0,5 ml/i.m.	11	Dunkin Hartley	400g	M
	0,5 ml/i.m.	12	Dunkin Hartley	400g	M
	0,5 ml/i.m.	13	Dunkin Hartley	400g	F
	0,5 ml/i.m.	14	Dunkin Hartley	400g	F
	0,5 ml/i.m.	15	Dunkin Hartley	400g	F
	0,5 ml/i.m.	16	Dunkin Hartley	400g	F

IZS

T E R A M O

/

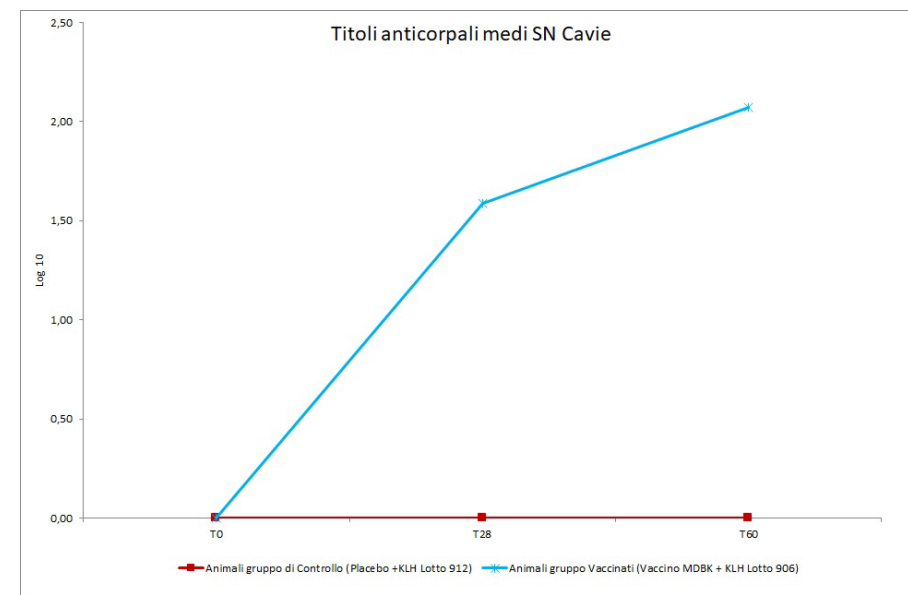
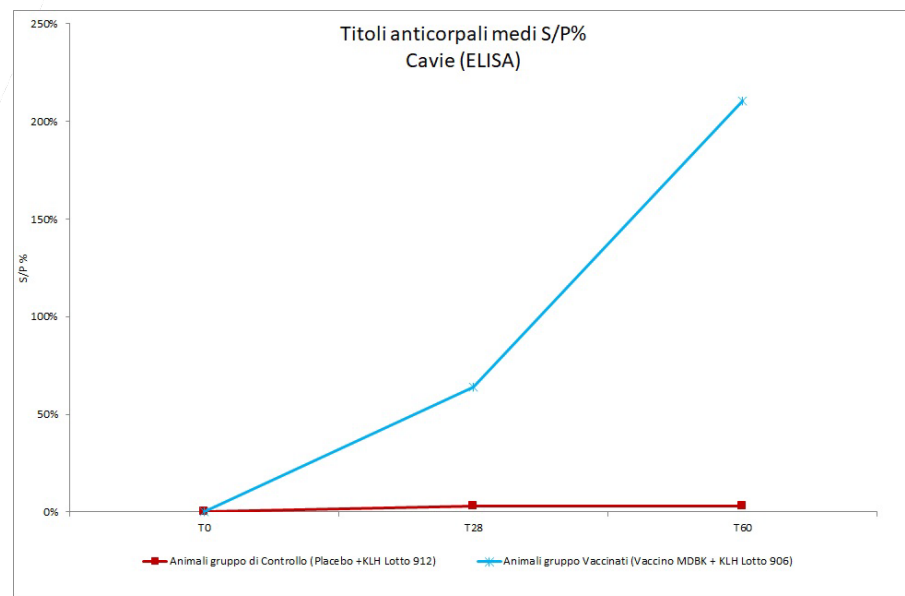
ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Immunogenicità su cavia

Prelievi di sangue al T0-T28 e T60
per lo studio della risposta
anticorpale in ELISA ed SN

Immunogenicità su cavia

- L'andamento dei titoli anticorpali ha evidenziato una sierconversione in ELISA LSD e SN pari all'87% a partire da T28
- Al T60, data ultimo prelievo, tutti gli animali avevano sierconvertito



Discussione

- Il vaccino inattivato per LSDV è sicuro e protegge dagli effetti severi provocati dall'infezione sperimentale
- Tutte le formulazioni vaccinali prodotte hanno dimostrato la capacità di stimolare la risposta anticorpale
- Si è osservata inoltre, una risposta di tipo cellulo-mediata con precoci livelli di γ -interferon
- La proteina KLH si è dimostrata essere una valida soluzione per identificare gli animali vaccinati
- Il vaccino inattivato per LSDV non ha effetti negativi sulla lattazione, né in termini di produttività, né per quanto riguarda i parametri chimico-fisici del latte
- Le cavie sembrano essere un buon modello predittivo

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Diagnostica e sorveglianza malattie esotiche

Dott.ssa Chiara Pinoni
Dott.ssa Fabrizia Valleriani
Dott.ssa Elisabetta di Felice

Immunologia e Sierologia

Dott. Flavio Sacchini
Dott.ssa Mirella Luciani
Dott.ssa Chiara Di pancrazio

Scienze statistiche e GIS

Dott. Romolo Salini

Ringraziamenti

Allevamento e sperimentazione animale

Dott. Nicola Ferri
Dott.ssa Emanuela Rossi
Dott. Michele Podaliri Vulpiani
Sig. Massimiliano Caporale
Sig. Dorianò Ferrari
Sig. Gianpaolo Foschini

Produzione vaccini batterici e presidi diagnostici

Dott.ssa Francesca Profeta

Diagnostica specialistica

Dott. Giovanni Di Teodoro