

# IZS

T E R A M O

/

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

# Sviluppo di una piattaforma per la produzione di un vaccino chimerico contro l'African Horse Sickness

Parte I

Dott.ssa Mariangela Iorio  
Produzione Vaccini Virali e Presidi Diagnostici

Teramo, 15 giugno 2022

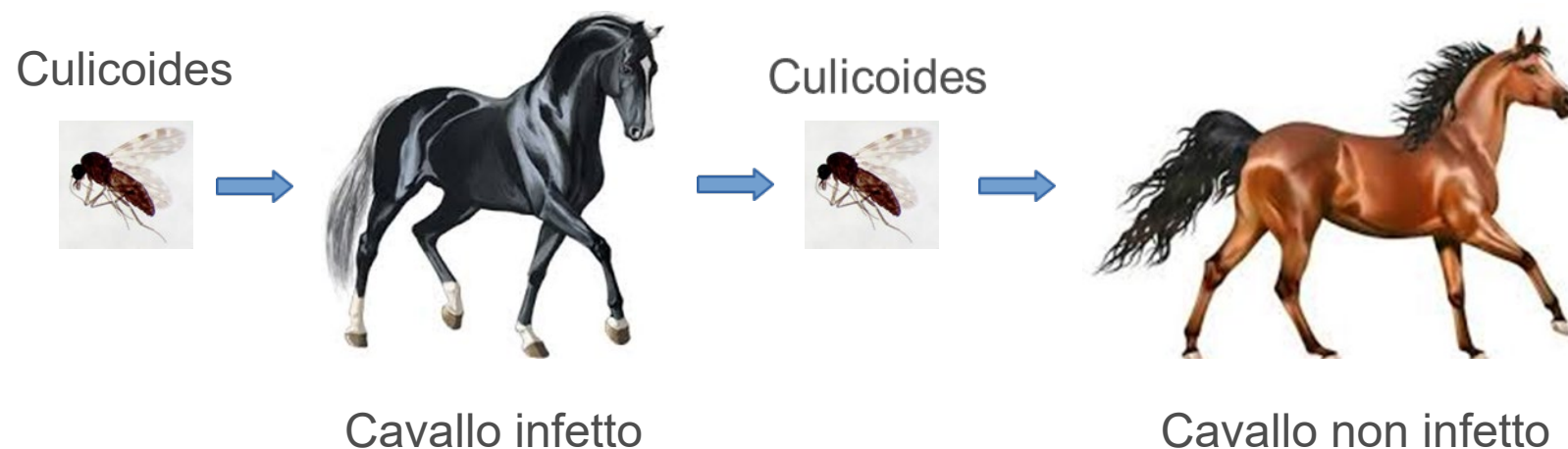
## African horse sickness

- L'agente eziologico della African Horse Sickness (AHS) è un virus appartenente al genere *Orbivirus*, famiglia *Reoviridae* e se ne conoscono 9 sierotipi.
- Endemica in Africa sub-Sahariana; epidemie periodiche in India, Pakistan; Spagna e Portogallo (1988-1991)
- Impatto economico notevole, dovuto all'elevata mortalità (>90%) e alle limitazioni nel commercio; ingenti danni economici all'industria equestre



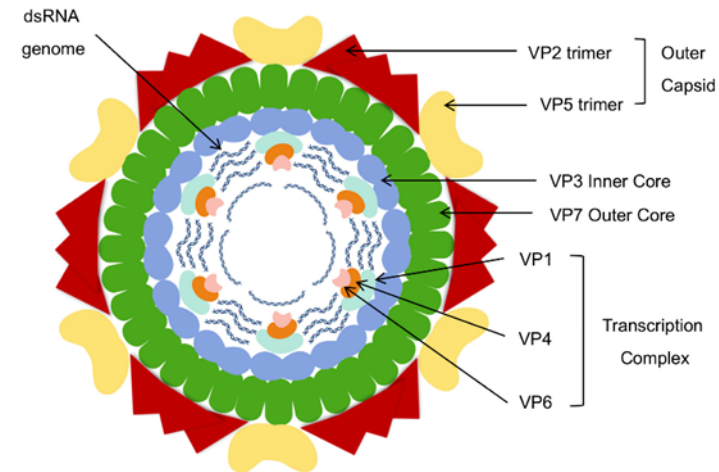
## Trasmissione

- AHSV è trasmesso dalla puntura di artropodi ematofagi del genere Culicoides (C. imicola e C. bolinitos)
- L'habitat dei vettori competenti risulta in continua espansione, a causa dei cambiamenti climatici
- Aumento del rischio di ingresso del virus in zone AHS- free (Europa)



## Virus

- AHSV possiede un genoma segmentato a doppio filamento di RNA
- 7 proteine strutturali (VP1-7) e and 5 non-strutturali (NS1, NS2, NS3, NS3A and NS4)
- Il capsid esterno è formato da trimeri di VP2 e VP5.
- VP2 è la proteina più variabile tra i vari sierotipi e contiene i determinanti antigenici che stimolano la risposta anticorpale sierotipo-specifica



## Profilassi

- Vaccinazione: mezzo più efficace per eradicare malattie da vettore
- Vaccini vivi attenuati (“Live-Attenuated Vaccines”, LAVs) gli unici autorizzati al commercio, ma esclusivamente in Africa (uso sconsigliato in Paesi AHSV-free)
- Rischi LAV: Virulenza residua, riassortimento genetico con altri ceppi AHSV e reversione alla virulenza
- Vaccini sperimentali: inattivati, a DNA, a subunità, a vettore ricombinante...



## Obiettivi del Progetto



Sviluppo di un sistema di *reverse genetics* (RG) per la manipolazione genetica di AHSV



Sviluppo, mediante RG, di una piattaforma vaccinale da utilizzare per produrre vaccini chimerici inattivati



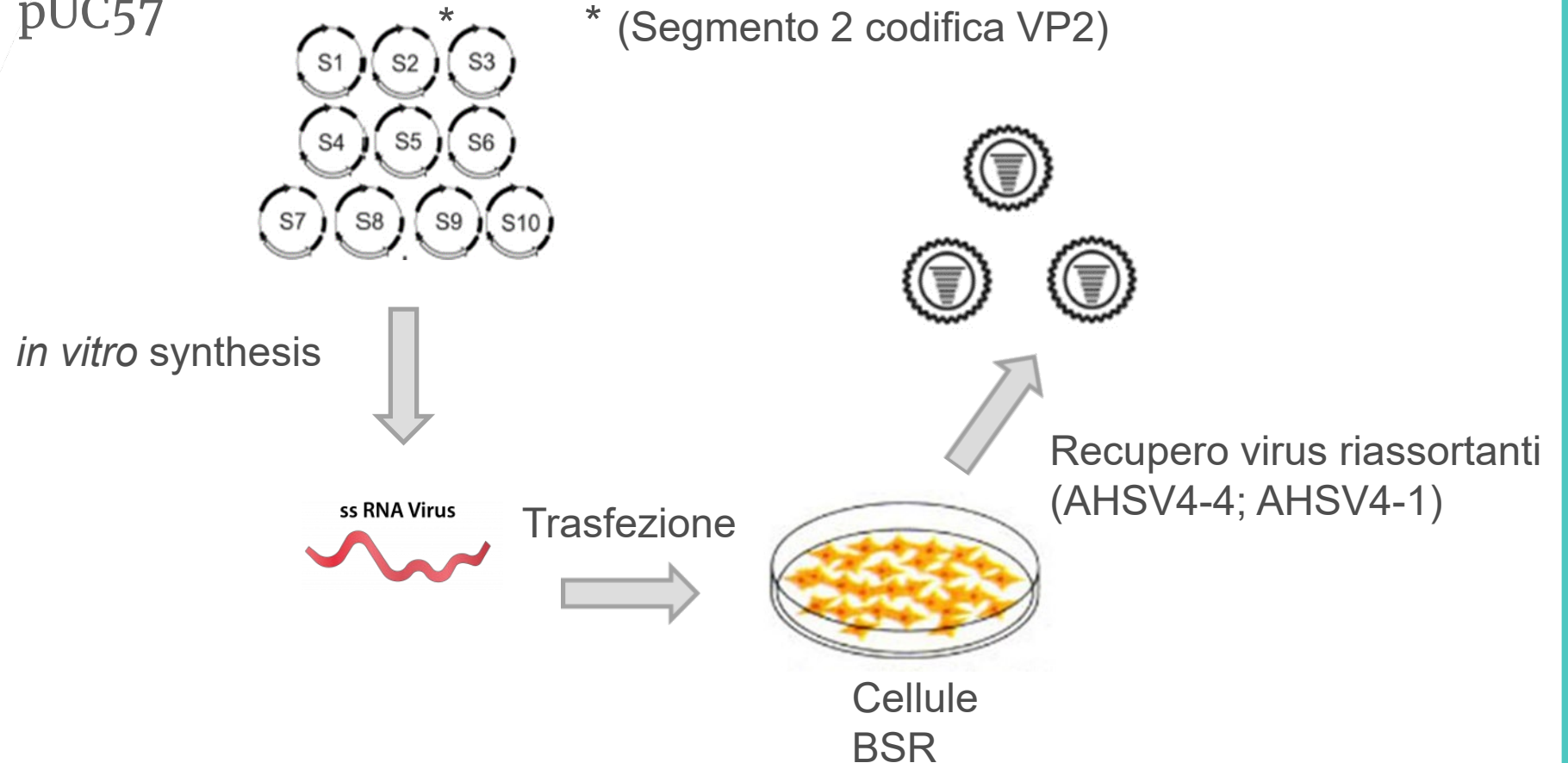
Sperimentazione su un modello animale (cavia)



Studio della sicurezza ed immunogenicità sull'ospite naturale della malattia (cavallo), mediante c-ELISA e sieroneutralizzazione

## Produzione chimera mediante RG

- Estrazione RNA virale (AHSV-4) > RT-PCR > clonaggio in pUC57



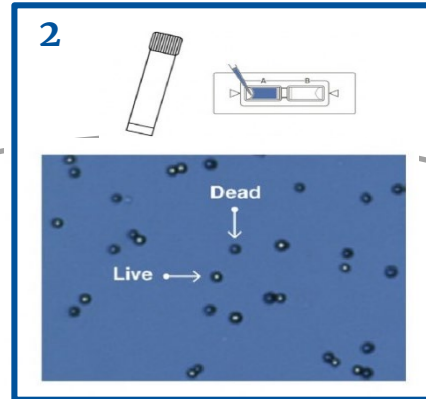


## Produzione vaccini

Infezione



Valutazione  
vitalità  
cellulare

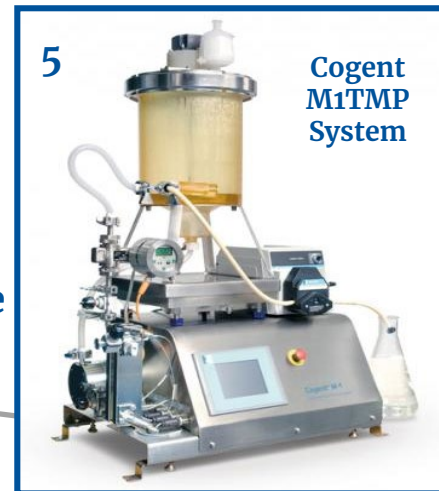


Raccolta surnatante



Emulsione con adiuvanti

Sterilizzazione



Filtrazione e concentrazione



Inattivazione con BEI 5  
mM 37°C per 24 h



# IZS

TERAMO

/

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

# **Sviluppo di una piattaforma per la produzione di un vaccino chimerico contro l' African Horse Sickness**

**Parte II**

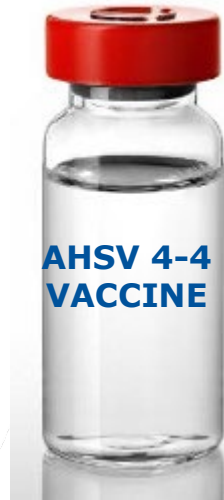
**Dott.ssa Sara Traini**

**Produzione Vaccini Virali e Presidi Diagnostici**

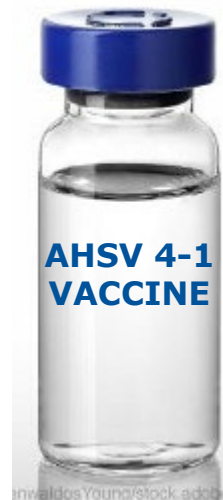
**I risultati della ricerca corrente condotta dall'IZS. Anno 2021.  
Teramo 15 Giugno 2022**

## FORMULAZIONE VACCINI

### Vaccini chimerici

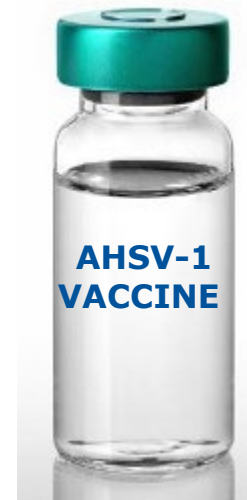


**AHSV 4-4  
VACCINE**



**AHSV 4-1  
VACCINE**

### Vaccino classico



**AHSV-1  
VACCINE**



**PLACEBO**

**AHSV 4-4  
5 mM BEI +  
10% Montanide Gel +  
0,3 mg/ml di saponina**

**AHSV 4-1  
5 mM BEI +  
10% Montanide Gel +  
0,3 mg/ml di saponina**

**AHSV-1+  
5 mM BEI +  
10% Montanide Gel +  
0,3 mg/ml di saponina**

**PBS +  
10% Montanide Gel +  
0,3 mg/ml di saponina**

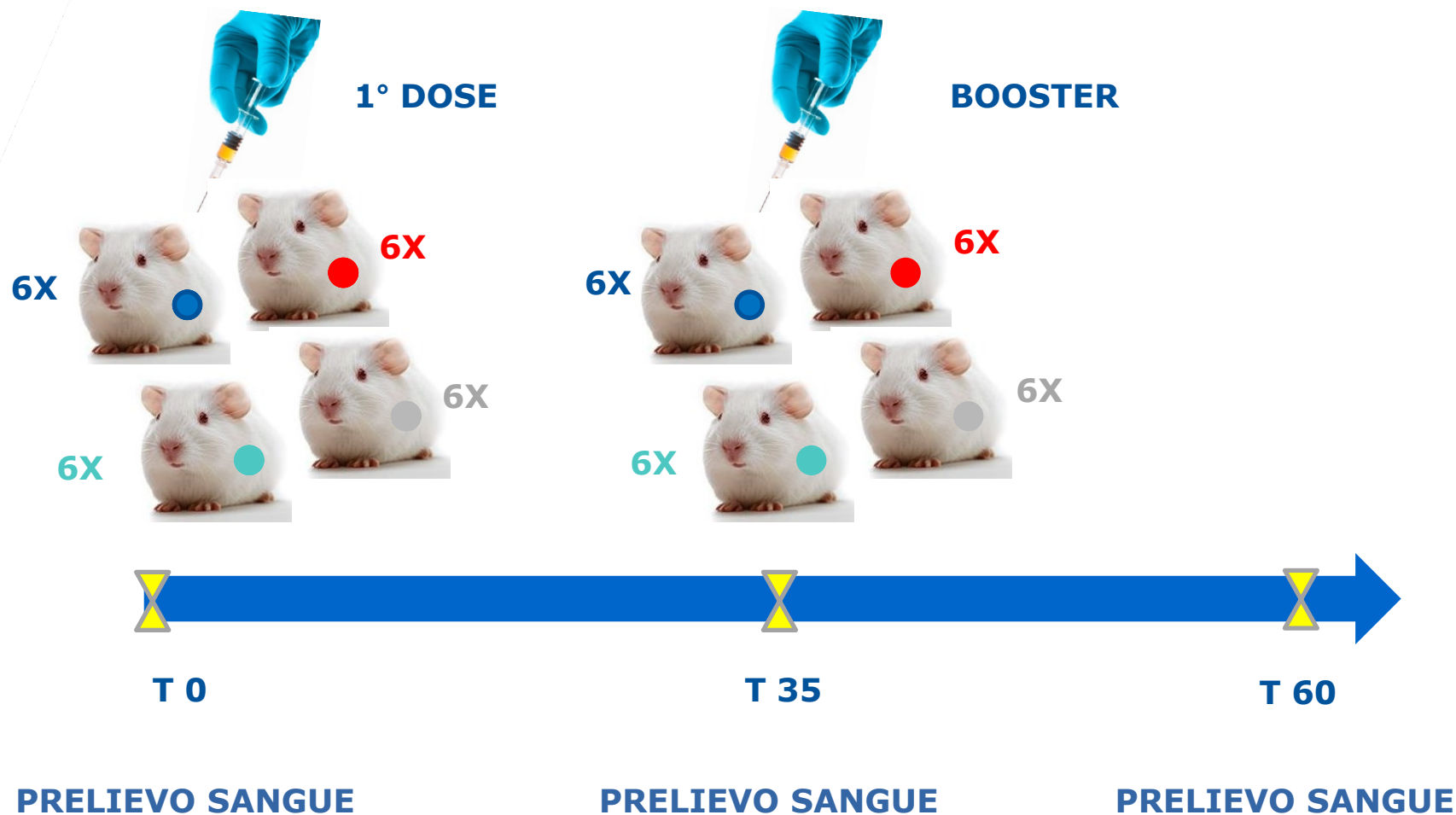
Tutti i vaccini prodotti sono stati formulati con la stessa quantità di antigene virale affinché fossero paragonabili tra loro nello studio dell'effetto immunogeno.

# IZS

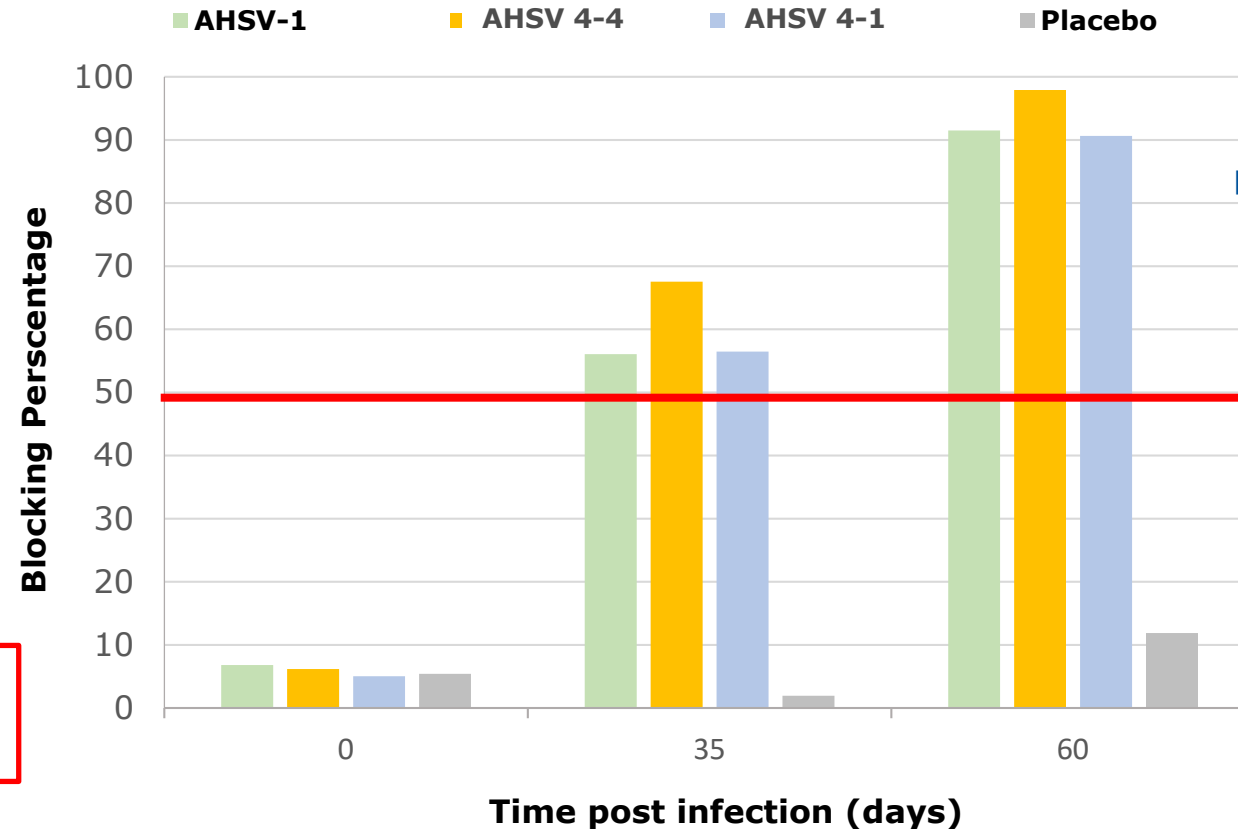
TERAMO

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

## IMMUNOGENICITA' SU MODELLO SPERIMENTALE



### ELISA Guinea Pigs sera



**C-ELISA**  
**Kit commerciale Ingezim**  
**AHSV Compac Plus**  
**(Ingenasa, Spagna)**  
 Rileva gli anticorpi  
 rivolti verso la  
 proteina strutturale VP7 di AHSV

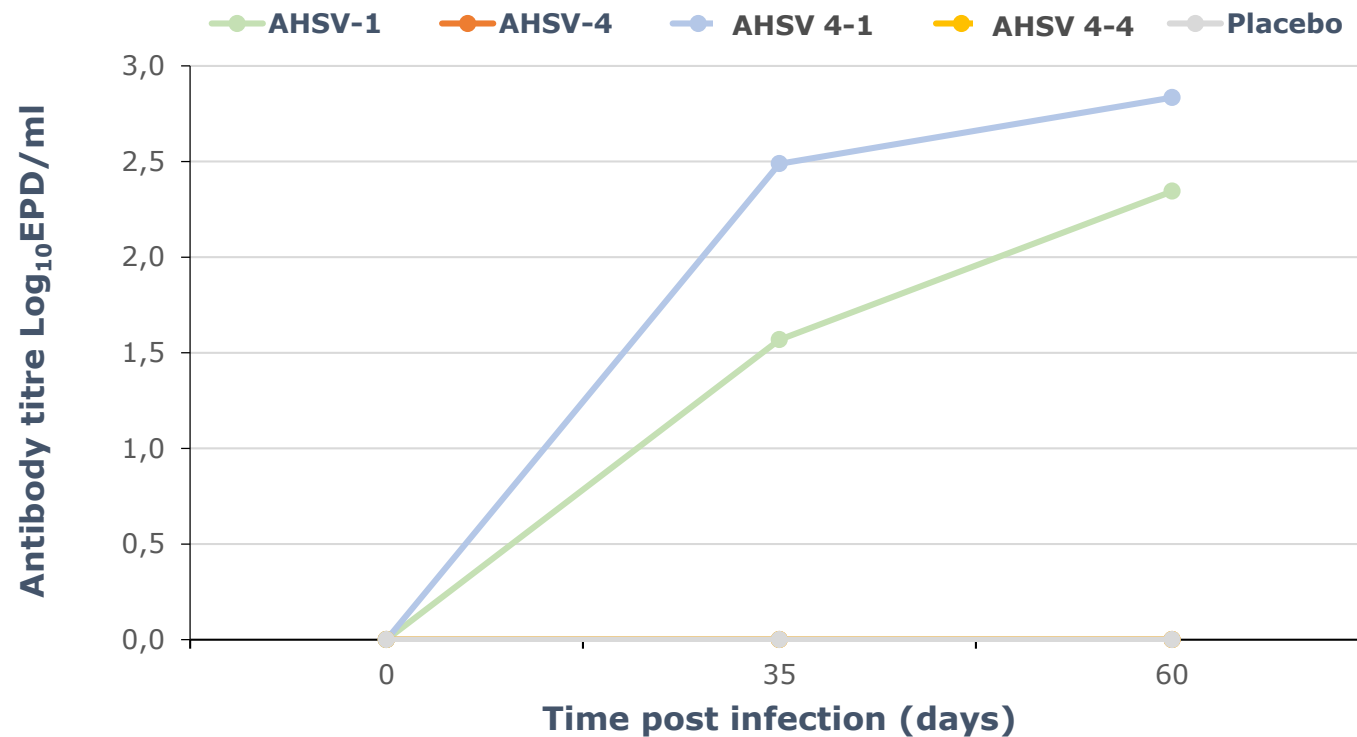
$$BP = \frac{(Abs\ contr-) - (Abs\ campione)}{(Abs\ contr-) - (Abs\ c+)} \times 100$$

Tutti i vaccini inducono una risposta anticorpale significativa dopo la 1° somministrazione.  
 La risposta anticorpale aumenta dopo il booster  
 ed è paragonabile per le tre formulazioni.

## RISULTATI SN CAVIE

Sono stati saggiati tutti i sieri verso i virus omologhi ed eterologhi utilizzati nella sperimentazione

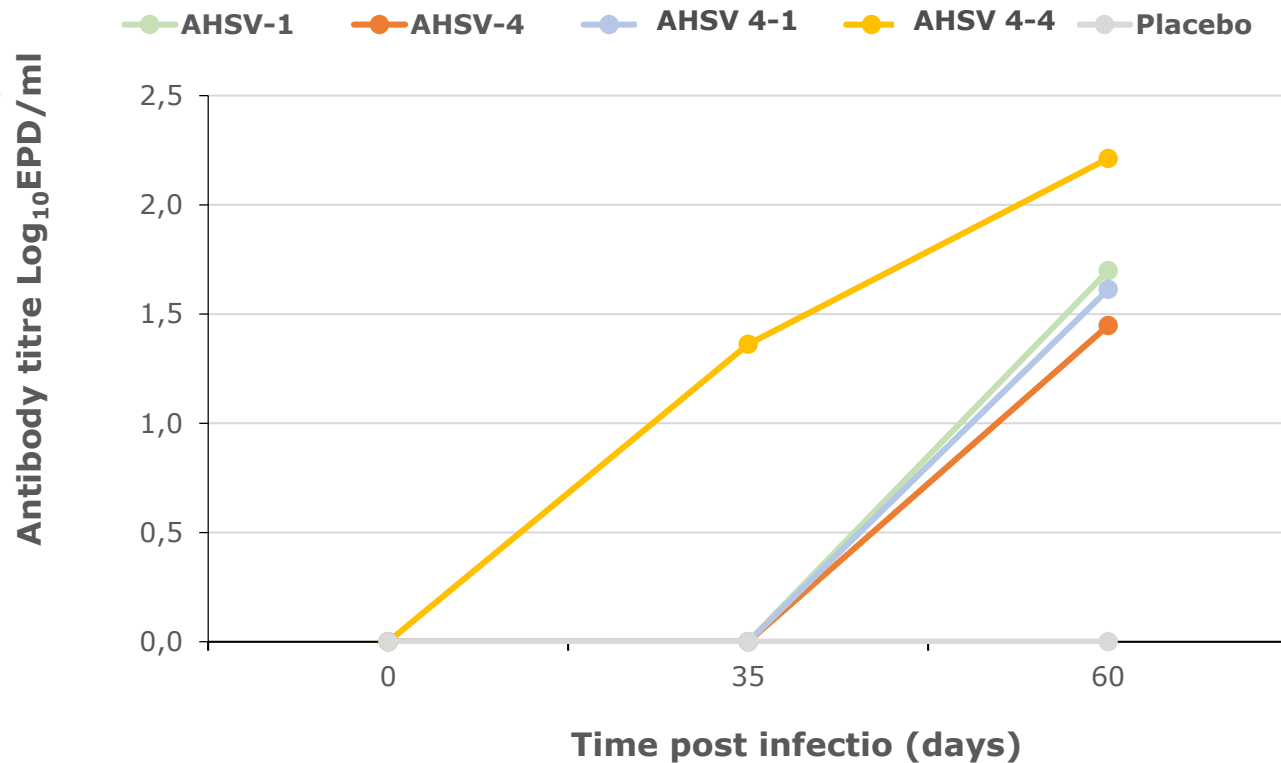
Guinea Pigs AHSV-1 Sera Neutralization titres



I sieri delle cavie inoculate con vaccino AHSV-1 neutralizzano il virus omologo AHSV-1 e il virus ricombinante AHSV 4-1

# RISULTATI SN CAVIE

## Guinea Pigs AHSV 4-4 Sera Neutralization titres



I sieri delle cavie inoculate con vaccino AHSV 4-4 neutralizzano il virus omologo AHSV 4-4 già dopo la prima dose e il virus AHSV-4 di riferimento dopo la dose booster. Dopo tale dose i sieri neutralizzano anche i virus AHSV 4-1 e AHSV1.

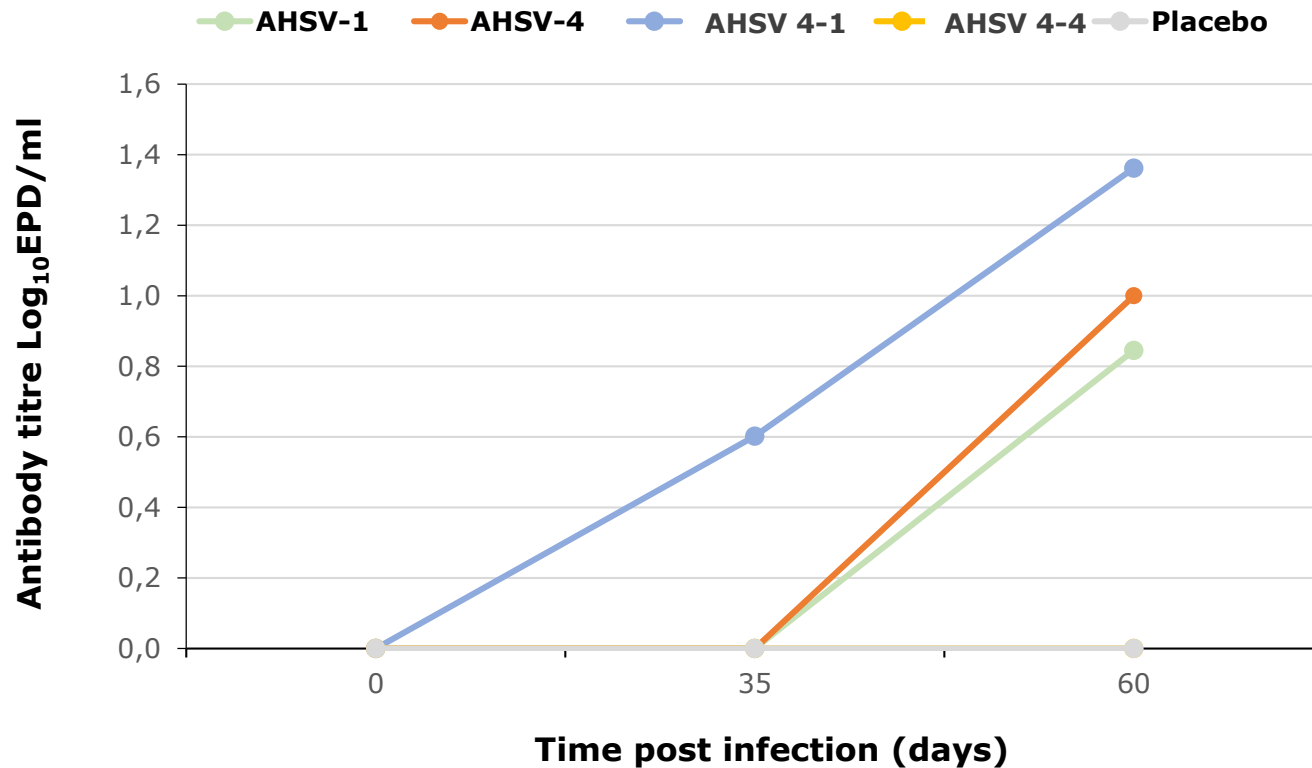
# IZS

TERAMO

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

# RISULTATI SN CAVIE

## Guinea pigs AHSV 4-1 Sera Neutralization titres



I sieri delle cavie inoculate con vaccino AHSV 4-1 neutralizzano il virus omologo AHSV 4-1 già dopo la 1° dose e neutralizzano il virus AHSV-1 di riferimento dopo la dose booster. Dopo tale dose i sieri neutralizzano anche il virus AHSV-4.

# IZS

TERAMO

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

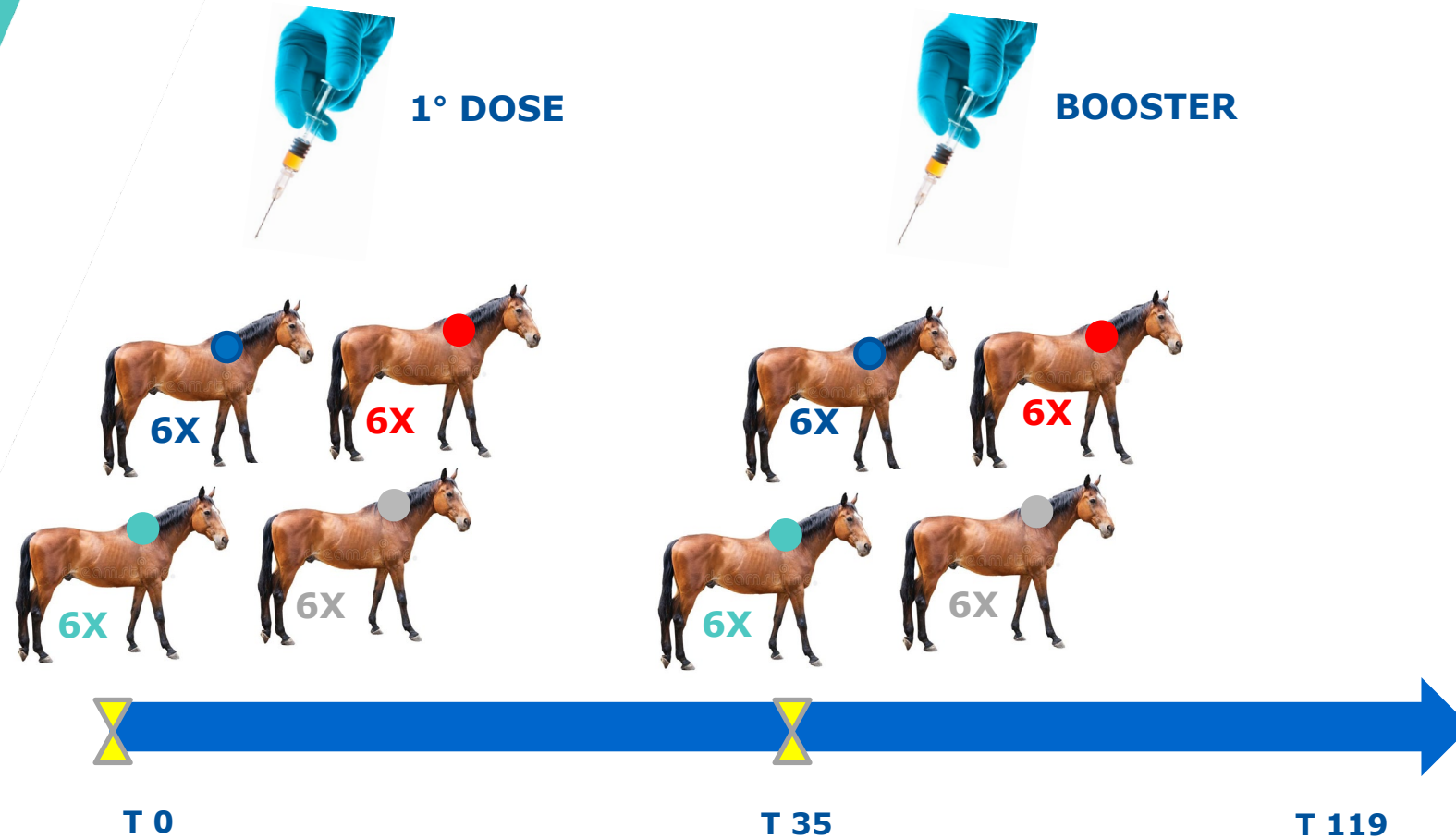


# IMMUNOGENICITA' NEI CAVALLI

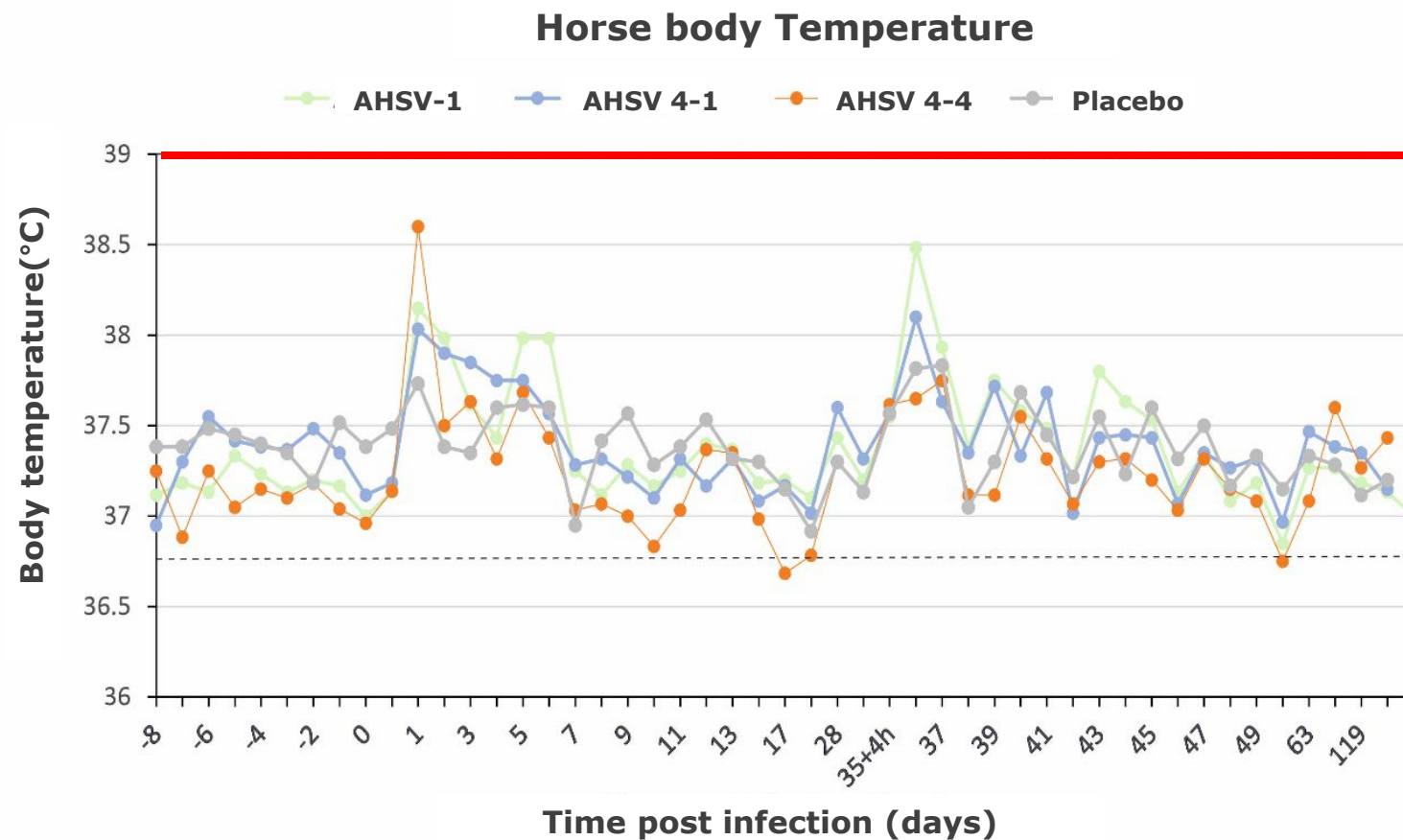
# IZS

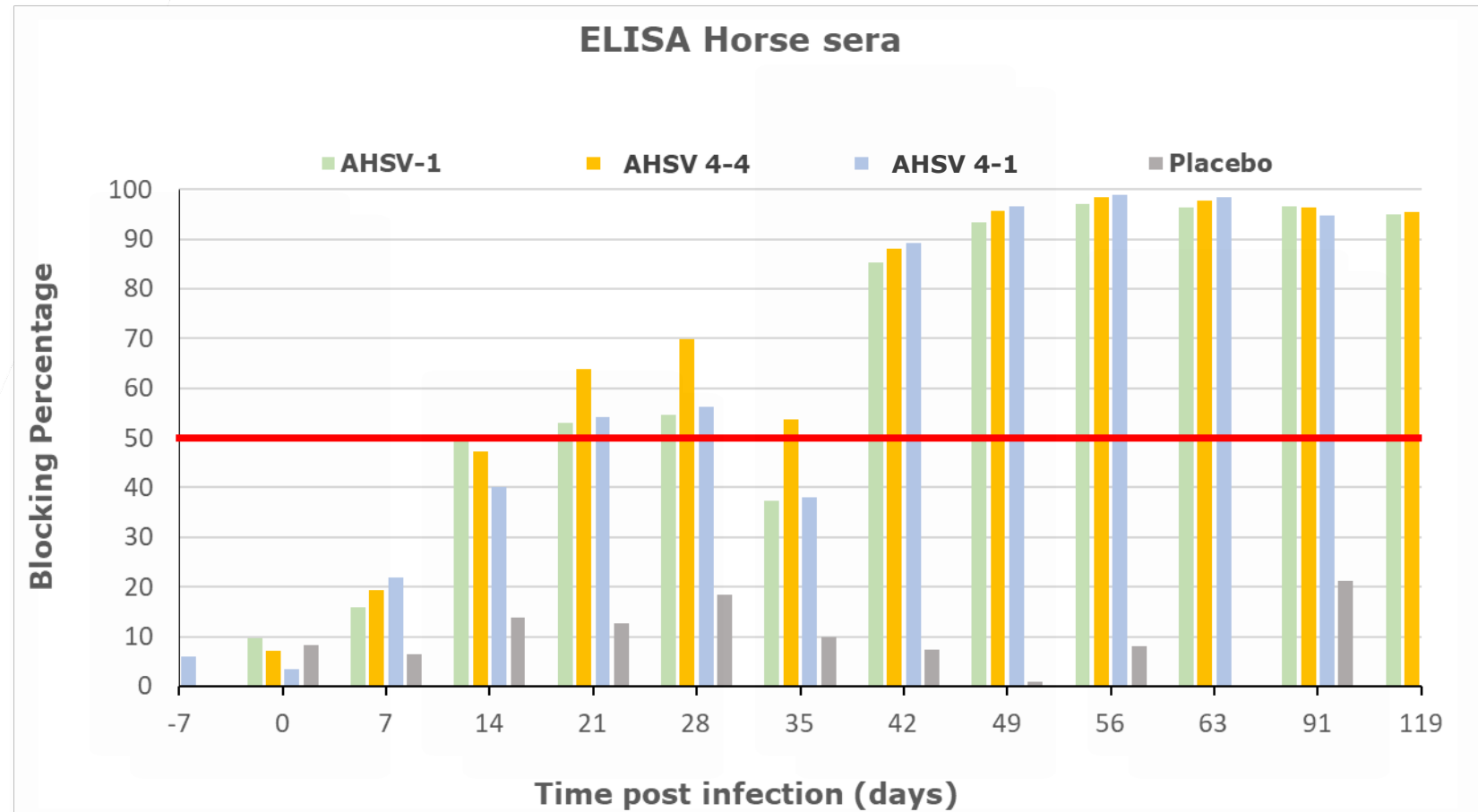
T E R A M O

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



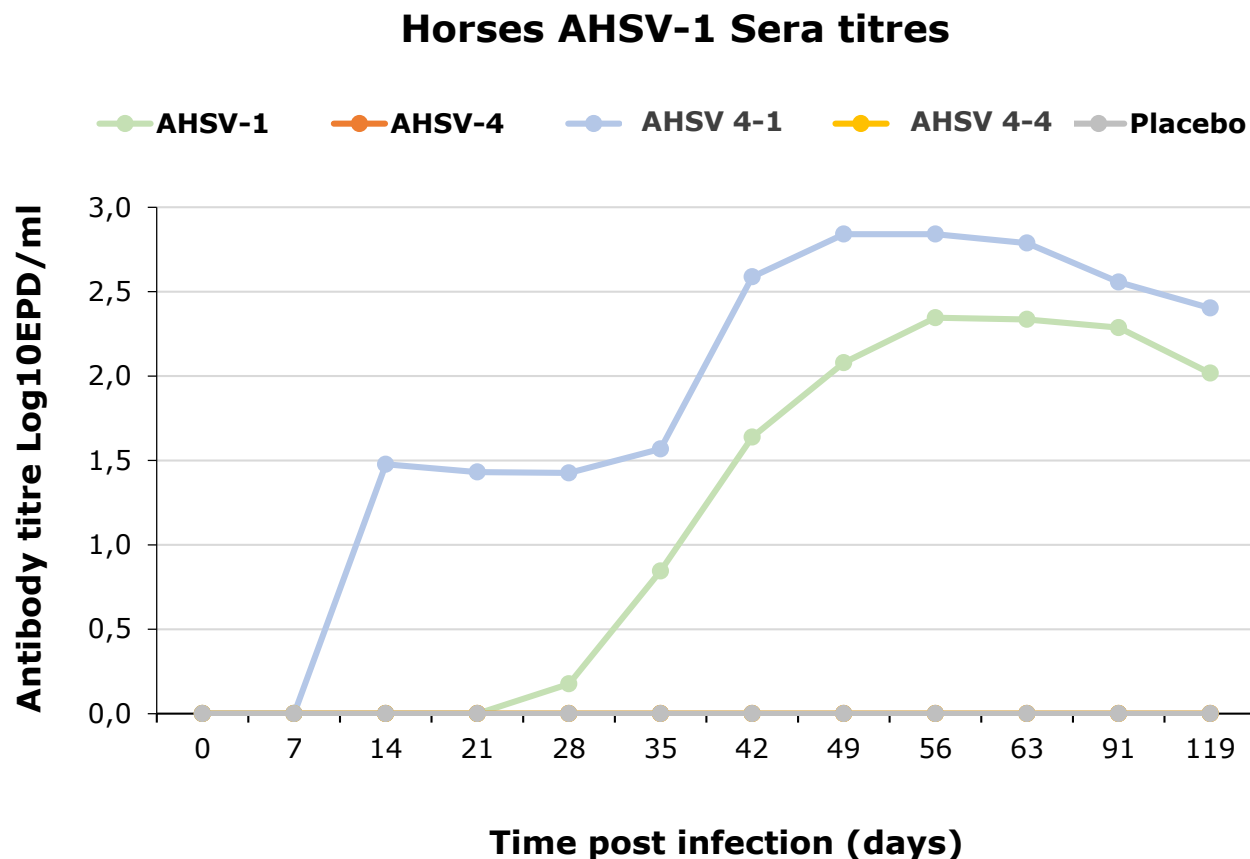
**PRELIEVI DI SANGUE SETTIMANALI FINO A DUE MESI  
POI MENSILI FINO A 4 MESI DAL T0**





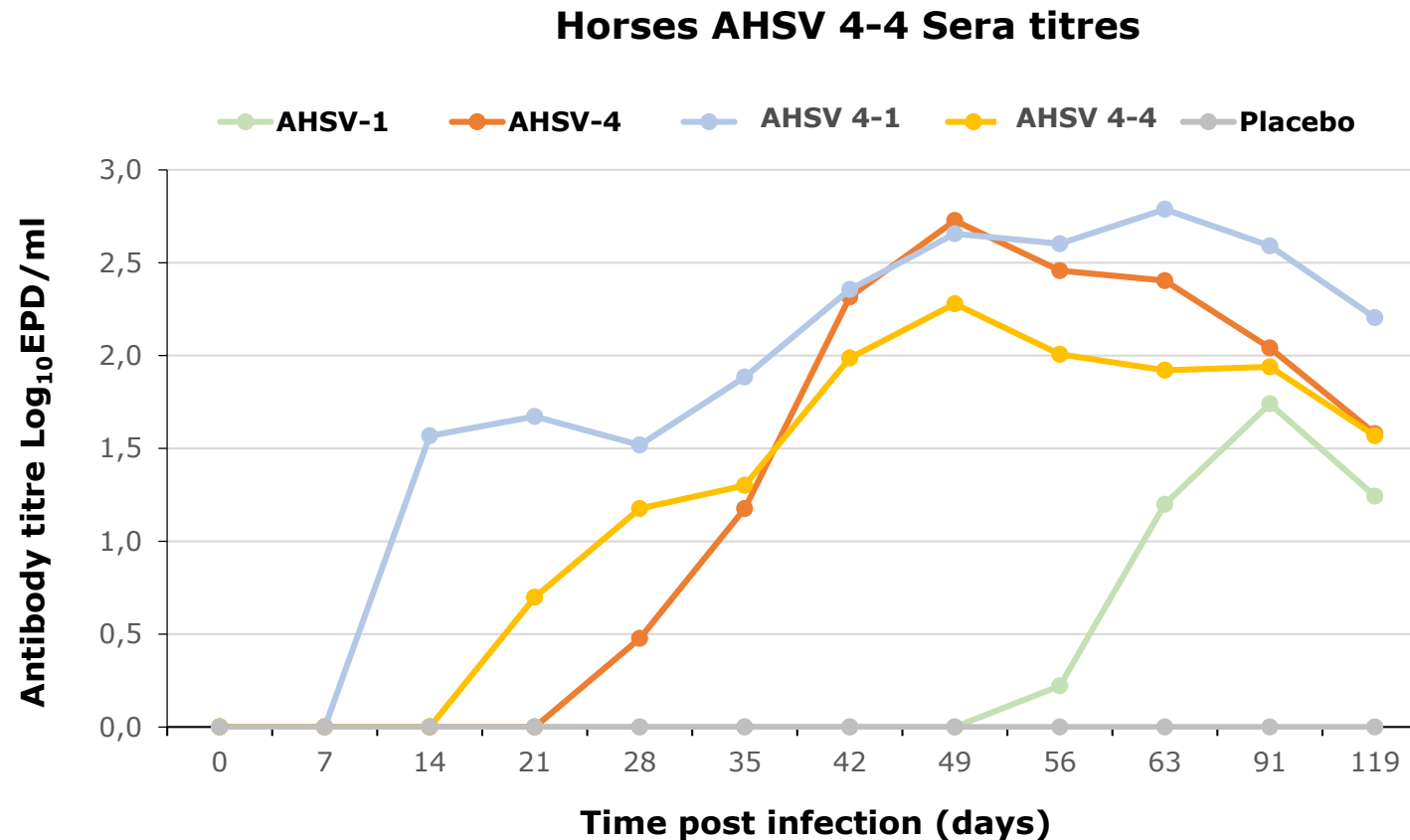
Tutti i vaccini inducono una risposta anticorpale significativa già dopo la 1° dose ma in maniera più marcata dopo la dose booster.

La risposta anticorpale è paragonabile per le tre formulazioni.



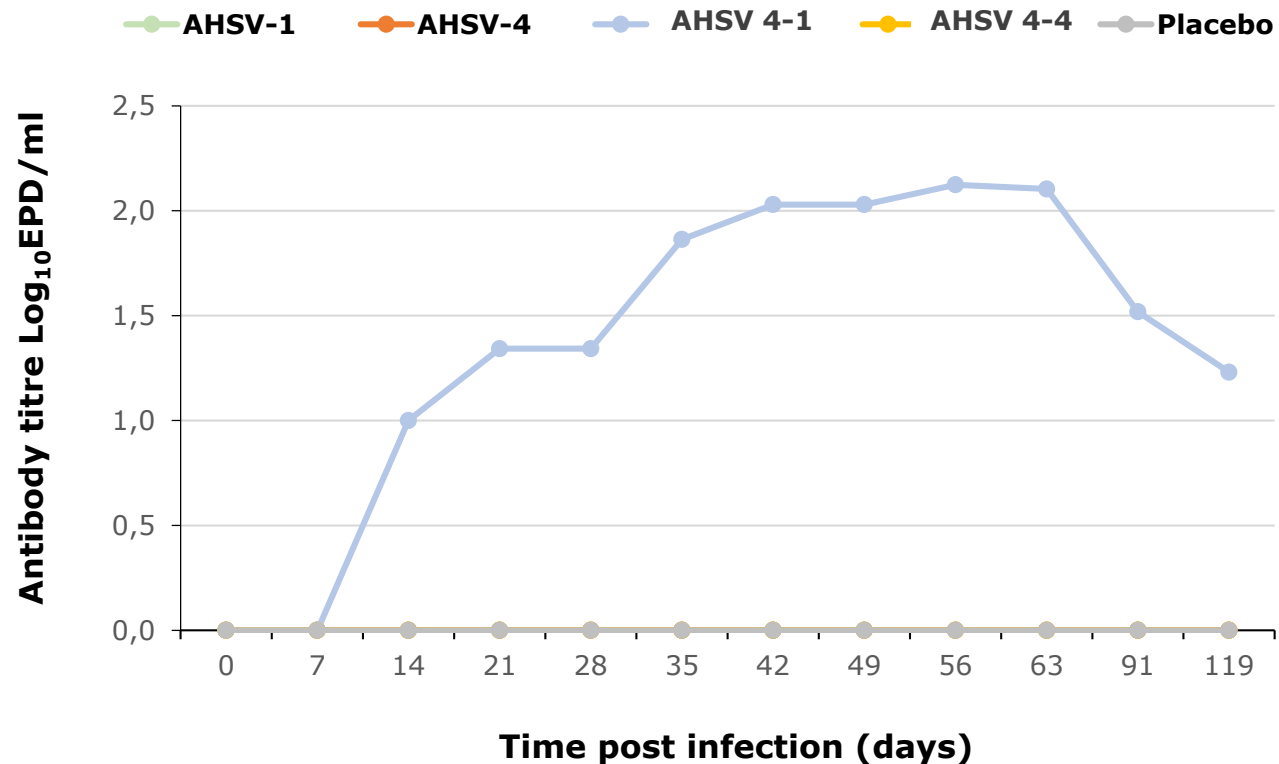
I sieri dei cavalli inoculati con vaccino AHSV-1  
neutralizzano il virus omologo AHSV-1  
e il virus ricombinante AHSV 4-1 già dopo la 1° somministrazione

## RISULTATI SN CAVALLI



I sieri dei cavalli inoculati con vaccino AHSV 4-4 neutralizzano il virus omologo AHSV 4-4 e il virus AHSV-4 di riferimento dopo la prima dose. Dopo tale dose i sieri neutralizzano anche il virus AHSV 4-1 già alla prima somministrazione e il virus AHSV-1 dopo la dose booster

### Horses AHSV 4-1 Sera titres



I sieri dei cavalli inoculati con vaccino AHSV 4-1 neutralizzano solo il virus omologo AHSV 4-1 ma non il virus AHSV-1 di riferimento

- I vaccini prodotti si sono dimostrati ben tollerati sia dalle cavie che dai cavalli
- Il vaccino AHSV-1 conferma le capacità immunogene mostrate in precedenza
- Tutti i vaccini inducono una reazione immunitaria in c-ELISA e in SN
- Il vaccino AHSV 4-1 neutralizza il virus omologo ma non neutralizza il virus di riferimento. Ingombro sterico VP2 eterologa? Necessità di introdurre anche VP5 eterologa?
- Il vaccino AHSV 4-4 neutralizza il virus omologo ma anche i virus eterologhi utilizzati nella sperimentazione. Fenomeno interessante: potrebbe far pensare ad una cross-protezione vaccinale?
- La piattaforma vaccinale come strategia di produzione agile di vaccini: una piattaforma validata riduce di molto i tempi per l'autorizzazione all'immissione in commercio del nuovo vaccino.



# RINGRAZIAMENTI

# IZS

T E R A M O

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

## IZSA&M - Teramo

### **Produzione Vaccini Virali e Presidi Diagnostici:**

Dott. Mauro Di Ventura,  
Dott.ssa Maria Teresa Mercante,  
Dott. Marco Caporale  
Dott. Gaetano Federico Ronchi  
Sig. Cristiano Palucci,  
Sig.ra Daniela Antonucci,  
Dott.ssa Anna Serroni,  
Dott.ssa Sara Capista,  
Dott.ssa Sara Traini,  
Dott.ssa Mariangela Iorio,  
Dott. Ivano Di Matteo

### **Produzione Vaccini Batterici:**

Dott.ssa Francesca Profeta

### **Virologia e Colture Cellulari:**

Dott.ssa Barbara Bonfini  
Dott. Massimo Spedicato

### **Biologia Molecolare e Tecnologie Omiche:**

Dott.ssa Luigina Di Gialleonardo

### **Allevamento e Sperimentazione Animale:**

Dott. Nicola Ferri  
Dott.ssa Emanuela Rossi

### **MRC-Uni of Glasgow Centre for Virus Research:**

Prof. Massimo Palmarini, Dott.ssa Vanessa Herder

# Grazie per l'attenzione