Vaccino inattivato e adiuvato per il controllo delle infezioni da sierotipo 9 del virus della peste equina: valutazione dell'efficacia in cavallo e cavia

Rossella Lelli[1], Umberto Molini[2], Gaetano Federico Ronchi[2], Emanuela Rossi[2], Paola Franchi[2], Simonetta Ulisse[2], Gisella Armillotta[2], Sara Capista[2], Siegfried Khaiseb[3], Mauro Di Ventura[2], Attilio Pini[2]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia 'A. Mirri', Via Gino Marinuzzi, 3, 90129 Palermo, Italia*
[2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Campo Boario, 64100 Teramo, Italia*
pini@izs.it
[3] *Central Veterinary Laboratory, 24 Goethe Street, Windhoek, Namibia*

Parole chiave
Cavia,
Challenge,
Namibia,
Peste equina,
Risposta anticorpale,
Sierotipo 9 del virus della peste equina,
Vaccino inattivato.

Riassunto
La peste equina (PE) è una malattia virale non contagiosa dei solipedi trasmessa da insetti vettori appartenenti al genere *Culicoides*. La malattia è endemica in numerose regioni dell'Africa e passate esperienze hanno evidenziato come l'Italia sia un paese esposto alle malattie infettive emergenti, endemiche in Africa. Un'incursione del virus della PE unitamente alla presenza del vettore *Culicoides* potrebbero essere causa di una emergenza epidemica. Onderstepoort Biological Products (OBP) commercializza un vaccino vivo attenuato contenente 7 dei 9 sierotipi virali, i sierotipi 5 e 9 sono esclusi dal vaccino. L'uso di tali vaccini è controverso, pertanto, da diversi anni, vengono condotti studi su prodotti inattivati o ricombinanti. Poiché la ricerca sui vaccini PE è ostacolata dalla necessità di utilizzare il cavallo per la valutazione dell'immunogenicità, in un precedente esperimento è stata studiata la risposta sierologica ai sierotipi 5 e 9, in cavie e cavalli. Nelle due specie animali è stata osservata una risposta durevole e sovrapponibile. Nel presente studio sono state saggiate per un periodo di 12 mesi le risposte sierologiche ottenute in cavie e cavalli immunizzati con il vaccino inattivato formulato con il sierotipo 9. Le risposte sierologiche nelle due specie animali si sono confermate sovrapponibili. Al challenge dell'immunità i cavalli sono risultati protetti dall'infezione e dalla malattia.

Veterinaria Italiana 2013, **49** (1), 79-88

Introduzione

La peste equina (PE) è una malattia virale non contagiosa dei solipedi causata da nove sierotipi. Il virus appartiene al genere *Orbivirus*, famiglia Reoviridae. Approssimativamente 30 delle oltre 1.500 specie di *Culicoides* sono ritenute capaci di trasmettere gli *Orbivirus*. Il vettore più importante della PE è *Culicoides imicola*, una specie comune in Africa e Sud Est Asiatico (20). La mallattia è endemica in numerose regioni dell'Africa Sub Sahariana ma è stata anche registrata in Africa del Nord (1965), Spagna (1966 e 1987-1990) e Medio Oriente (1959, 1961 e 1989). La diffusione dei sierotipi 4 o 9 è stata causa di epidemie nella penisola Iberica e nel Medio Oriente. Dal 1975 la malattia ha fatto la sua comparsa anche in Africa occidentale: Nigeria, Senegal e Mauritania (11).

Gli eventi dell'ultimo decennio hanno dimostrato come l'Italia sia un paese a rischio di malattie emergenti endemiche in Africa e la presenza di vettori del genere *Culicoides* rende un'incursione del virus della PE un evento possibile. Vi è quindi necessità di avere prodotti immunizzanti innocui ed efficaci, rapidamente disponibili, unitamente a prodotti diagnostici sensibili e specifici. Il vaccino attenuato prodotto da OBP potrebbe essere disponibile in breve tempo. Il prodotto, comunemente utilizzato nelle regioni dove la malattia è endemica, contiene 7 dei 9 sierotipi ed è commercializzato in due formulazioni: trivalente, contenente i sierotipi 1, 3, 4, e quadrivalente, contenente i sierotipi 2, 6, 7 e 8. Le due preparazioni sono somministrate a distanza di 21 giorni l'una dall'altra. Il sierotipo 5 è stato escluso dalla formulazione nel 1990 in seguito a patogenicità residua riscontrata sul campo. Il sierotipo 9 non è incluso nel vaccino poiché era considerato epidemiologicamente non rilevante in Sud Africa.

Entrambi i sierotipi hanno, tuttavia, dominato nei focolai di PE occorsi dal 2006, soprattutto nella provincia Sud Africana del Capo Occidentale (18). In Namibia, il sierotipo 9 può essere isolato nella forma polmonare, cardiaca e blanda di malattia. Febbre,

edema della fossa sopraorbitale, difficoltà respiratorie, inappetenza e riluttanza al movimento sono sintomi comunemente osservati (Di Mattia T. e Scacchia M., 2008, comunicazione personale).

Tenendo in considerazione le obiezioni che riguardano l'uso di vaccini vivi attenuati, nel corso degli anni sono state oggetto di ricerca soluzioni alternative. La ricerca si è focalizzata sull'allestimento di vaccini inattivati e adiuvati (5, 9, 12, 13) e, più recentemente, sui vaccini ricombinanti (1, 4, 7, 8, 10, 17, 19). I risultati riportati in letteratura indicano che tali formulazioni sono capaci di proteggere i cavalli dalla PE ma il challenge è stato effettuato solo a un breve intervallo di tempo dall'immunizzazione a 76-98 giorni. I promettenti risultati ottenuti con i vaccini ricombinanti devono essere ancora confermati.

I limiti imposti dalla necessità di usare i cavalli per saggiare l'immunogenicità di vaccini per la PE sono stati di stimolo per valutare la possibilità di ricorrere alla cavia come modello predittivo di efficacia. In una recente pubblicazione è stato dimostrato come topi knock-out (IFNAR -/-), immunizzati con il vaccino modificato Ankara che esprime la proteina VP2 del sierotipo 4, possano essere un modello per la valutazione di efficacia del vaccino (2).

In un precedente esperimento (14) varie formulazioni di vaccini monovalenti inattivati e adiuvati, preparati con i sierotipi 5 e 9, sono state saggiate per verificare la loro capacità di indurre anticorpi neutralizzanti in cavia. Sulla base dei risultati ottenuti, una delle formulazioni prodotte con il sierotipo 9 è stata inoculata in tre cavalli. Sieroconversione perdurante per oltre 10 mesi dall'immunizzazione è stata registrata in entrambe le specie. I risultati sembrano dimostrare l'utilità della cavia come modello predittivo per evidenziare le proprietà antigeniche dei vaccini inattivati.

Al fine di confermare l'efficacia del vaccino e la validità della cavia come modello è stato deciso di condurre il challenge dell'immunità su cavallo. L'esperimento riportato è stato condotto con l'approvazione dei Servizi Veterinari Namibiani in un'area esente da circolazione virale. Il challenge dell'immunità è stato condotto a 109 e 365 giorni dalla vaccinazione in una stalla a prova di insetto. Nel periodo precedente al challenge sono state studiate l'innocuità del prodotto e l'andamento della risposta anticorpale. La temperature corporea, i segni clinici e la viremia sono stati rilevati nel periodo post challenge. Nelle cavie la reattività sierologica è stata saggiata fino al giorno 365.

Materiali e Metodi

La produzione del vaccino sierotipo 9 è stata descritta nel precedente lavoro (14). Per una più agevole lettura ne vengono riassunti i dati. Il vaccino è stato utilizzato dopo cinque mesi dalla data di produzione.

Linee cellulari

Cellule BHK_{21} (clone 13), fornite da European Collection of Cell Cultures (ECACC), sono state utilizzate per la produzione del vaccino. Cellule VERO (ECACC) sono state usate per la determinazione dei titoli virali, l'esecuzione delle prove di sieroneutralizzazione e l'isolamento virale.

Virus

Il virus PE sierotipo 9 impiegato per la produzione del vaccino, proveniente da AHS reference antigens (Bob Swanepoel collection) è stato gentilmente fornito dal dott. Hübschle†. Dopo amplificazione, purificazione e concentrazione, la sospensione virale è stata controllata in accordo a quanto descritto dalla Farmacopea Europea (3). La tipizzazione virale è stata condotta tramite neutralizzazione di tutti i 9 sierotipi del virus PE (14).

Lo stesso ceppo virale utilizzato per la produzione del vaccino è stato impiegato per l'esecuzione del challenge a 109 giorni dalla vaccinazione. Un ceppo di campo isolato da un focolaio di PE occorso, nel 2008, in Namibia è stato usato per il challenge effettuato a 365 giorni dalla vaccinazione (16).

I due ceppi virali, al secondo passaggio in BHK_{21}, liofilizzati, controllati per purezza e conservati a 5°C ± 3°C hanno mostrato, rispettivamente, un titolo infettante pari a $10^{6,9}$ e $10^{6,8}$ $TCID_{50}$/ml.

Al momento del challenge, il virus è stato ricostituito con acqua distillata, diluito in terreno MEM fino ad avere un titolo pari a 10^5 $TCID_{50}$/ml.

Inattivante

Il processo di inattivazione è stato effettuato con BEI 5mM come descritto da Ronchi *et al.* (14).

Adiuvanti

L'adiuvante ISA27VG (SEPPIC Italia S.r.l., Milano, Italia) e precedentemente saggiato nei cavalli per la valutazione delle proprietà infiammatorie, è stato emulsionato con la sospensione virale concentrata purificata e inattivata in accordo alle istruzioni fornite dalla ditta produttrice (14). Un quantitativo pari a 0,3 mg di saponina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA) per dose vaccinale è stato aggiunto prima dell'utilizzo.

Cavalli

Le procedure seguite per l'esecuzione degli esperimenti di vaccinazione, il successivo challenge sui cavalli e le linee guida per la cura e il mantenimento degli animali sono state approvate dal Central Veterinary Laboratory (CVL) Animal Ethics Committee. Le fasi di vaccinazione, inoculazione, salasso e monitoraggio dei cavalli sottoposti a challenge, quando

richiesto, sono state svolte con la supervisione di un medico veterinario. La prova di efficacia del vaccino è stata eseguita presso la Bergvlug Veterinary Research Farm del Namibian Ministry of Agriculture, Water and Forestry, nel distretto di Windhoek. L'azienda che copre una superficie di 5.000 ha, si trova a 1.932 m sopra il livello del mare, le temperature notturne variano tra -8°C in inverno e 8°C in estate, al suo interno si trovano bovini, ovini, cavalli, antilopi e predatori. Nell'azienda, utilizzata nei primi del '900 dalle truppe tedesche per proteggere i cavalli dalla malattia, non si registrano focolai di PE.

Quindici animali di età superiore ai due anni, costituenti un gruppo omogeneo sulla base dell'esame clinico, del profilo biochimico e della conta completa degli elementi corpuscolati del sangue sono stati acquistati a Karas, a 780 Km da Windhoek, dove la vaccinazione per la PE non è praticata. I sieri degli animali sono stati saggiati prima dell'acquisto e quindici giorni dopo il loro arrivo a Bergvlug con un'ELISA competitiva (c-ELISA) per la verifica di assenza di anticorpi alla PE. Il giorno della vaccinazione (T_0) un ulteriore campione di sangue è stato prelevato e saggiato mediante sieroneutralizzazione (SN) per escludere la presenza di anticorpi nei confronti dei 9 sierotipi virali.

Il vaccino è stato somministrato per via intramuscolare ai 10 cavalli sul terzo medio del lato sinistro del collo con una dose pari ad 1 ml. La temperatura corporea e la reazione infiammatoria al punto di inoculo sono state monitorate e registrate nei 15 giorni successivi alla prima e seconda vaccinazione. La temperatura è stata rilevata due volte al giorno, mattina e sera. La dose di richiamo, pari a 1 ml, è stata somministrata al livello del terzo medio del lato destro del collo a 35 giorni dalla prima somministrazione (T_{35}). Prelievi di sangue dalla giugulare sono stati effettuati, a T_{15}, T_{21}, T_{35}, T_{42}, T_{49}, T_{63}, T_{109}, T_{175}, T_{220}, T_{250}, T_{294}, T_{321}, e T_{365}, al fine di monitorare la cinetica della risposta anticorpale tramite SN e indice sieroneutralizzante (ISN). I cavalli sono stati tenuti al pascolo fino al momento del challenge quando sono stati trasferiti in un locale a prova di insetto provvisto di porta e finestre schermate con zanzariere a prova di *Culicoides*, impregnate ogni giorno con insetticida Fendona (BASF Agricultural Products Ltd, Città del Capo, Sud Africa).

Cavalli sentinella

I cinque cavalli non vaccinati sono stati impiegati inizialmente come animali sentinella per escludere circolazione virale. Il giorno 109 il numero dei cavalli sentinella si è ridotto a 4 in quanto uno degli animali è stato utilizzato come controllo nel primo challenge. I soggetti sentinella sono stati tenuti al pascolo assieme ai soggetti vaccinati. I sieri prelevati con cadenza mensile da questi animali sono stati saggiati con c-ELISA.

Cavie

L'esperimento è stato condotto in accordo alla Legge Italiana 116/92. Al fine di eseguire l'esperimento su cavie è stata inviata una comunicazione scritta al Ministero della Salute, Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti; Ufficio VI, Roma, Italia.

Quattro cavie femmina, di peso compreso tra 350 e 500 g, sono state inoculate con 0,5 ml di vaccino nella zona prescapolare. Una dose di richiamo è stata somministrata 35 giorni dopo. Gli animali sono stati sottoposti a prelievo di sangue tramite puntura cardiaca, effettuata previa anestesia totale, con la stessa tempistica utilizzata per i cavalli. I sieri ottenuti sono stati saggiati in ISN. L'esperimento è stato condotto negli stabulari autorizzati dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" di Teramo, Italia. Tutti gli animali utilizzati sono stati mantenuti in strutture di ricovero dotate di aria condizionata (tra 20°C e 24°C), con umidità relativa pari al 50-55%, con acqua e cibo *ad libitum*. Gli animali sono stati controllati quotidianamente tramite esame clinico fino alla fine dell'esperimento.

Sierologia

I test c-ELISA sono stati effettuati utilizzando il kit commerciale Ingezim AHSV Compac Plus (INGENASA, Madrid, Spagna). Il metodo per calcolare l'ISN ottenuto attraverso diluizioni seriali in base 10 del virus contro il siero inattivato diluito 1:10 è stato descritto in precedenza (14). Le prove di SN attraverso diluizioni al raddoppio del siero contro 100 $TCID_{50}$ di virus (6) sono state eseguite in parallelo. Gli ISNs sono stati espressi come log_{10}, il titolo SN come reciproco del fattore di diluizione neutralizzante il 50% dell'attività virale.

Test di immunogenicità

L'efficacia del vaccino è stata testata al T_{109} e T_{365} dopo la prima somministrazione di vaccino.

Come già affermato, lo stesso virus utilizzato per la formulazione del vaccino inattivato è stato usato nel challenge nel giorno 109 dalla vaccinazione mentre il sierotipo 9, isolato in Namibia nel 2008, è stato utilizzato nel challenge nel giorno 365 dalla vaccinazione. In entrambi i casi sono stati inoculati per via intravenosa 10^5 $TCID_{50}$ dei rispettivi virus. Nella prima prova sono stati utilizzati 5 cavalli vaccinati. Nel secondo challenge il numero di cavalli impiegati è stato pari a 4 in quanto il quinto cavallo era ingestibile. Non è stato possibile spostare l'animale nella stalla a prova di insetto senza che si corressero rischi per gli operatori. L'uso di un solo controllo per ognuno dei due challenge è stato dettato da ragioni di benessere animale, nel rispetto della logica delle 3R: Refinement, Replacement, Reduction (15).

L'esame clinico e la rilevazione della temperatura corporea sono stati effettuati due volte al giorno per 21 giorni dopo l'effettuazione della prova di challenge. Valori ≤ 38°C sono stati considerati fisiologici. Campioni di sangue con anticoagulante sono stati prelevati quotidianamente per 28 giorni. La viremia è stata valutata attraverso la tecnica dell'isolamento virale su cellule VERO e la RT-PCR, in accordo con quanto descritto nell'*OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (21). Campioni negativi per effetto citopatico al primo passaggio sono stati ulteriormente saggiati effettuando tre passaggi seriali della durata di 7 giorni ciascuno. Al terzo passaggio le cellule sono state rimosse ed esaminate in immunofluorescenza per escludere la presenza di virus PE.

Cattura di *Culicoides*

Trappole luminose per insetti prodotte da Onderstepoort Veterinary Institute sono state collocate nei pressi della zona di pascolo nella stagione secca e nella stagione delle pioggie.

Risultati

Reattività alla vaccinazione

Reazione infiammatoria al punto di inoculo

Dopo la somministrazione della prima dose di vaccino è risultato visibile, al punto di inoculo, un lieve ispessimento della cute che è regredito dopo 48 ore dall' inoculazione. Al T_{35} la dose di richiamo ha indotto la formazione di un piccolo nodulo, del diametro massimo di 5 mm, perdurante per tre giorni. In nove animali il nodulo non è risultato né dolente né caldo. Solo l'animale n. 4 ha manifestato un nodulo caldo nei giorni 36 e 37 dalla vaccinazione.

Temperatura corporea

La temperatura corporea è rimasta nel limite dei valori fisiologici fino al giorno 35 dalla vaccinazione. In seguito alla somministrazione della seconda dose, nel giorno 36, si è avuto un rialzo termico, tra 38,2°C e 38,8°C, in 4 dei 10 cavalli (Tabella 1). Durante il periodo di osservazione non sono stati rilevati altri segni clinici. Il rialzo termico nei 4 cavalli ha coinciso con la reazione infiammatoria osservata nei giorni 36 e 37 successivi alla somministrazione della dose di richiamo.

Risposta sierologica

La reattività sierologica al vaccino è stata registrata nei cavalli sino al giorno dell'effettuazione del challenge.

ISNs nei cavalli

Gli ISNs al T_{15} hanno mostrato una variazione, tra 2,10 e 4,27, in 8 cavalli. Gli animali n. 6 e n. 7 hanno reagito al T_{21} con ISNs pari a 0,7 e 1,5, rispettivamente. Dopo la dose di richiamo, al T_{42}, gli ISNs hanno raggiunto valori ≥ 6,8 per rimanere costanti durante l'intero periodo di osservazione con l'eccezione dei cavalli n. 6 e n. 9 che hanno mostrato ISNs pari a 2,27 e 0,83 al T_{109} e T_{365}, rispettivamente. La cinetica della risposta immunitaria è riportata in Tabella 2 e in Figura 1. Gli ISN ≤ 0,5 al T_0 sono stati omessi.

Tabella I. *Temperatura corporea nei cavalli in seguito a somministrazione della dose di richiamo (T_{35}).*

Cavallo n.	$T_{1 a 35}$	T_{36}	T_{37}	T_{38}	T_{39}	T_{40}	T_{41}	T_{42}	T_{43}	T_{44}
1	Temperatura fisiologica ≤ 38 °C	37,1	37,2	36,8	36,7	36,5	36,9	36,1	36,2	36,1
2		37,8	37,2	36,9	36,9	36,9	37	36,3	36,8	36,5
3		36,6	36,9	36,9	36,5	36,5	36,4	36,1	36,5	36,5
4		**38,4**	37,3	37,2	37,1	36,1	36,6	36,5	36,8	36,2
5		**38,4**	37,6	37,5	37,8	36,7	36,9	36,5	36,8	36,4
6		**38,2**	37,2	37	37,1	36,9	37,3	36,5	37,1	36,6
7		**38,8**	37,9	37,6	37,6	37	37,1	37	36,4	36,7
8		37,9	36,3	36,4	36,5	36,6	36,9	36,6	36,9	36,9
9		37,7	37,1	37,2	36,8	36,8	36,9	36,7	36,7	36,1
10		37,8	36,2	36,8	36,9	36,3	36,8	36,9	37,2	36,7
11 controllo		37	36,6	37	37,1	36,8	37,1	36,5	36,3	36,8
12 controllo		37,2	37,3	37	37	37	36,9	36,8	36,8	36,4
13 controllo		37,1	37	37,3	37,1	36,1	36,9	36,9	36,8	36,4
14 controllo		37,6	36,5	36,5	36,1	36,1	36,8	36,6	36,1	36,9
15 controllo		35,9	36	35,9	35,8	35,9	36,1	35,7	35,6	35,9

Tabella II. *Indici sieroneutralizzanti nei cavalli e nelle cavie .*

	T_{15}	T_{21}	T_{28}	T_{35} (a)	T_{42}	T_{49}	T_{63}	T_{109} (b)	T_{175}	T_{220}	T_{250}	T_{294}	T_{321}	T_{365} (c)
Cavallo n° 1	4,27	4,00	5,97	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80						
Cavallo n° 2	3,10	3,33	5,97	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80						
Cavallo n° 3	3,93	3,50	5,97	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80						
Cavallo n° 4	3,85	3,33	5,97	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80						
Cavallo n° 5	0,00	0,70	0,67	0,34	6,80	6,80	6,80	2,27						
Cavallo n° 6	3,10	3,50	5,97	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80
Cavallo n° 7	0,00	1,50	2,37	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80
Cavallo n° 8	2,27	2,50	5,97	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80
Cavallo n° 9	3,10	3,50	5,97	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	0,83
Cavallo n° 10	2,10	1,50	5,97	5,97	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80
Cavia n° 1	1,5	2	3,66	3,16	5,5	4,83	4,5	4,83	4,83	4,72	4,5	4,16	4,5	4,5
Cavia n° 2	2	2,66	3,16	2,66	5,5	4,83	4,5	4,83	4,33	4,72	4,5	4,16	3,5	3,5
Cavia n° 3	1,66	2,16	1,66	2,16	5,5	4,83	4,5	4,83	4,83	4,72	3,5	4,16	4,5	4,5
Cavia n° 4	2	2	2,33	2	5,5	4,83	4,5	4,83	4,67	4,72	4,5	4,16	3,5	3,5

(a) T_{35} dose di richiamo, (b) challenge T_{109}, (c) challenge T_{365}.

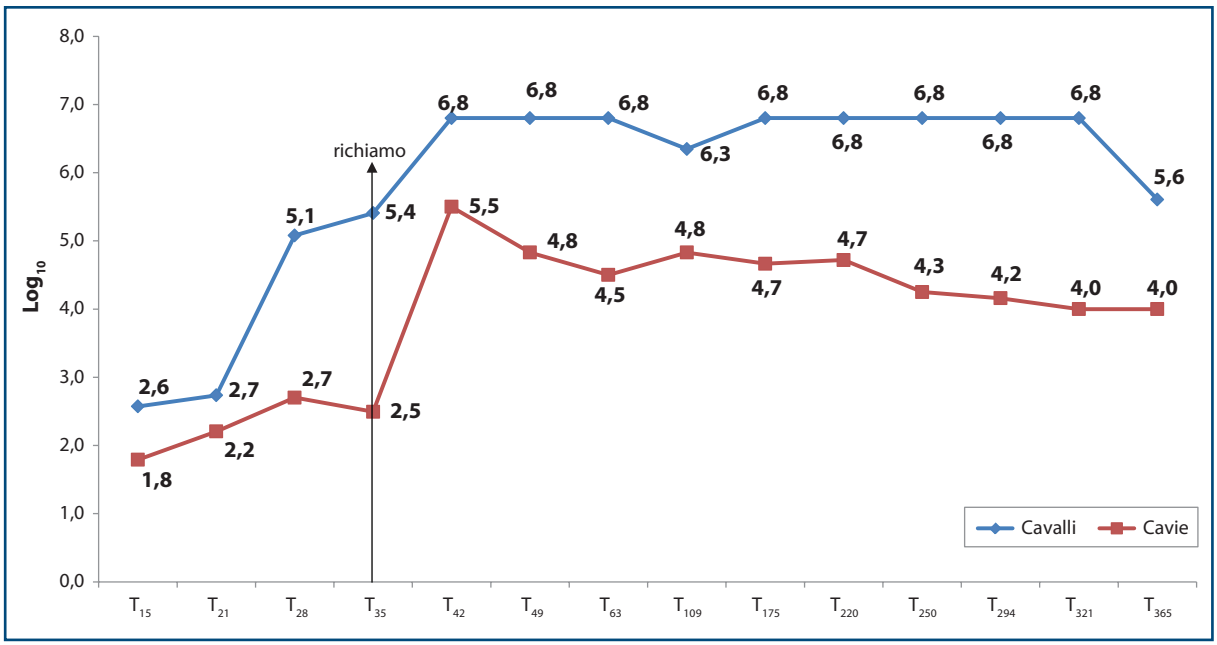


Figura 1. *Media degli indici sieroneutralizzanti nelle cavie e nei cavalli.*

ISNs nelle cavie

La reattività sierologica al T_{15} è stata simile a quella registrata nei cavalli. Al T_{42} gli ISNs hanno raggiunto il valore massimo di 5,5 e al T_{365} hanno mostrato una variazione tra 3,5 e 4,5 (Tabella 2).

La cinetica della risposta immunitaria nella cavia ha mostrato un andamento parallelo a quella dei cavalli come evidenziato in Figura 1. Gli ISN al T_0 sono risultati ≤ 0,5 e conseguentemente sono stati omessi.

Titoli sierologici nei cavalli

La Tabella 3 mostra i risultati della SN. La reattività nei cavalli n. 6 e n. 7 è risultata ritardata al T_{21}. Un picco sierologico pari a 320 è stato registrato tra T_{42} e T_{49} per decrescere, in seguito, lentamente. I titoli sono rimasti, comunque, a livelli di positività fino al T_{365} dalla vaccinazione.

Tabella III. *Titoli sieroneutralizzanti nei cavalli vaccinati.*

	T_{15}	T_{21}	T_{28}	T_{35} (a)	T_{42}	T_{49}	T_{63}	T_{109} (b)	T_{175}	T_{220}	T_{250}	T_{294}	T_{321}	T_{365} (c)
Cavallo n° 1	40	40	160	80	320	320	320	160						
Cavallo n° 2	20	40	160	80	320	320	320	160						
Cavallo n° 3	40	40	160	160	320	320	320	160						
Cavallo n° 4	40	40	80	160	320	320	160	40						
Cavallo n° 5	5	5	20	5	80	320	40	20						
Cavallo n° 6	40	40	5	80	320	80	320	160	160	160	160	160	160	160
Cavallo n° 7	5	10	80	40	320	320	320	160	80	80	80	80	80	80
Cavallo n° 8	20	40	20	160	320	320	320	320	80	80	80	80	80	80
Cavallo n° 9	40	40	80	80	320	320	320	160	160	160	160	160	40	20
Cavallo n° 10	20	20	40	160	320	320	320	160	80	80	80	40	40	40

(a) T_{35} dose di richiamo, (b) challenge T_{109}, (c) challenge T_{365}.

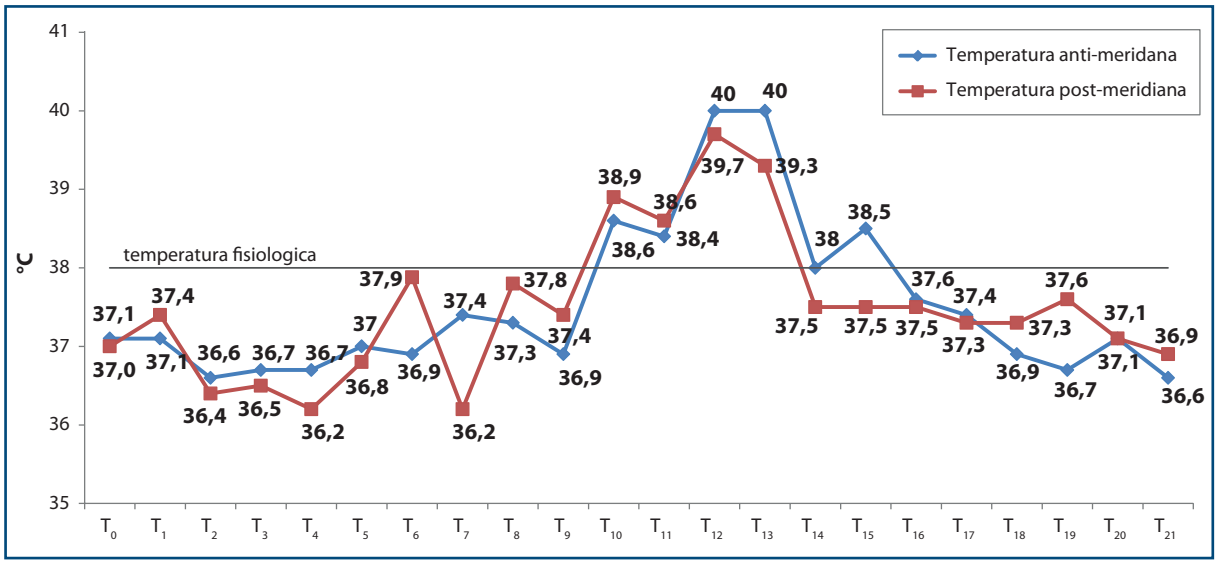


Figura 2. *Challenge a T_{109} : temperature corporee nel cavallo di controllo.*

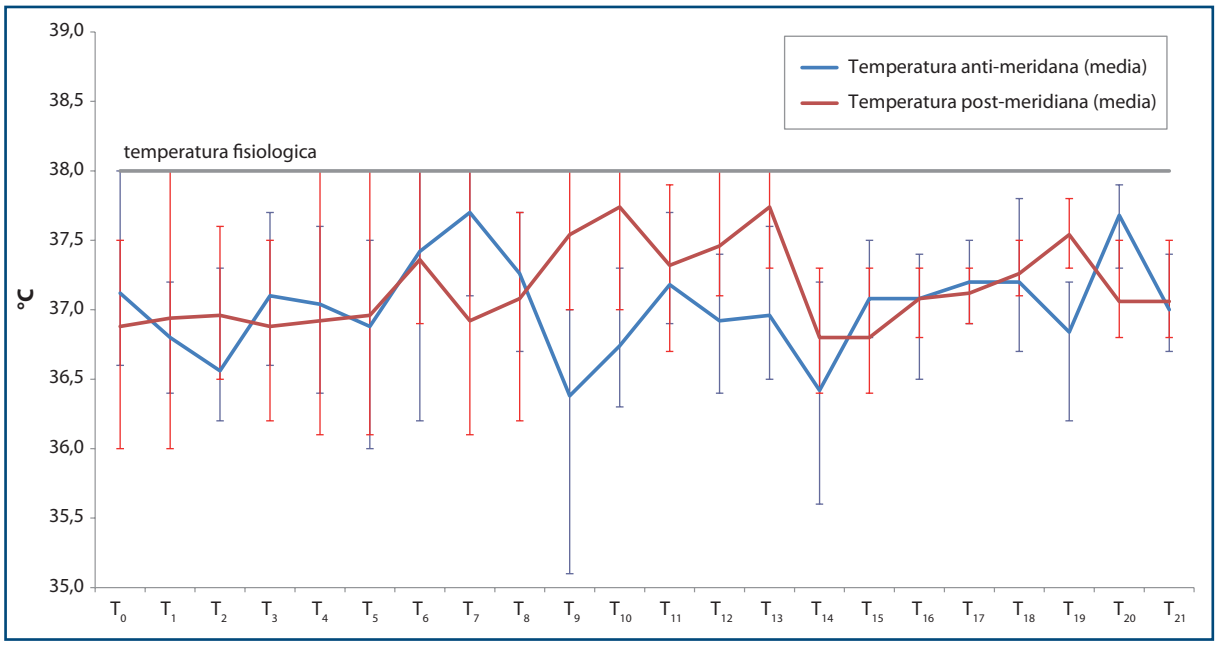


Figura 3. *Challenge a T_{109} : media delle temperature corporee nei cavalli vaccinati.* Le barre di errore indicano le temperature massime e minime.

Prove di efficacia

Challenge dell'immunità T_{109}

Cinque cavalli immunizzati e un cavallo di controllo sono stati sottoposti a challenge tramite inoculazione intravenosa di 10^5 $TCID_{50}$ particelle di virus omologo al ceppo impiegato per la produzione del vaccino.

Nel cavallo di controllo si è avuto un rialzo termico, oscillante tra i 38,6°C e 40°C, nei giorni 10, 11, 12, 13, 14 e 15 dall'inoculazione. In questi giorni sono stati osservati sintomi quali edema sopraorbitale, depressione sensoriale, rifiuto del cibo e riluttanza al movimento. Durante i 21 giorni di osservazione non sono stati rilevati segni clinici o rialzo della temperatura corporea nei cavalli vaccinati. Le Figure 2 e 3 riportano i valori della temperatura corporea anti e post-meridiana nel cavallo di controllo e nei cavalli vaccinati. Nell'animale di controllo, l'isolamento virale ha rilevato la presenza di virus dal giorno 12 al giorno 16, i titoli infettanti sono risultati variare tra $10^{2.8}$ e $10^{4.8}$ $TCID_{50}$/ml. La RT-PCR è risultata positiva dal giorno 11 al giorno 21 dall'inoculazione. La Figura 4 riporta i risultati.

Nei cavalli vaccinati l'isolamento virale e la RT-PCR, condotti sui campioni di sangue nei 28 giorni seguenti al challenge, hanno dato esito negativo.

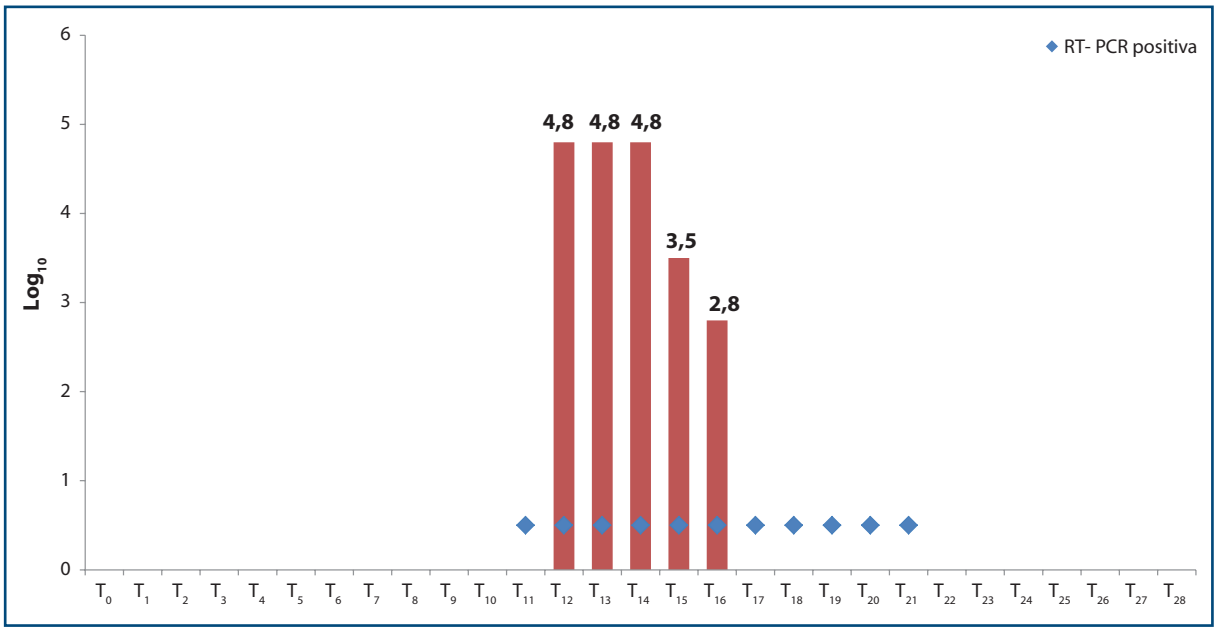


Figura 4. *Challenge a T_{109}: RT-PCR e titoli viremici/ml relativi al cavallo di controllo.* Nei cavalli vaccinati l'isolamento virale e la RT-PCR erano negativi e non sono riportati.

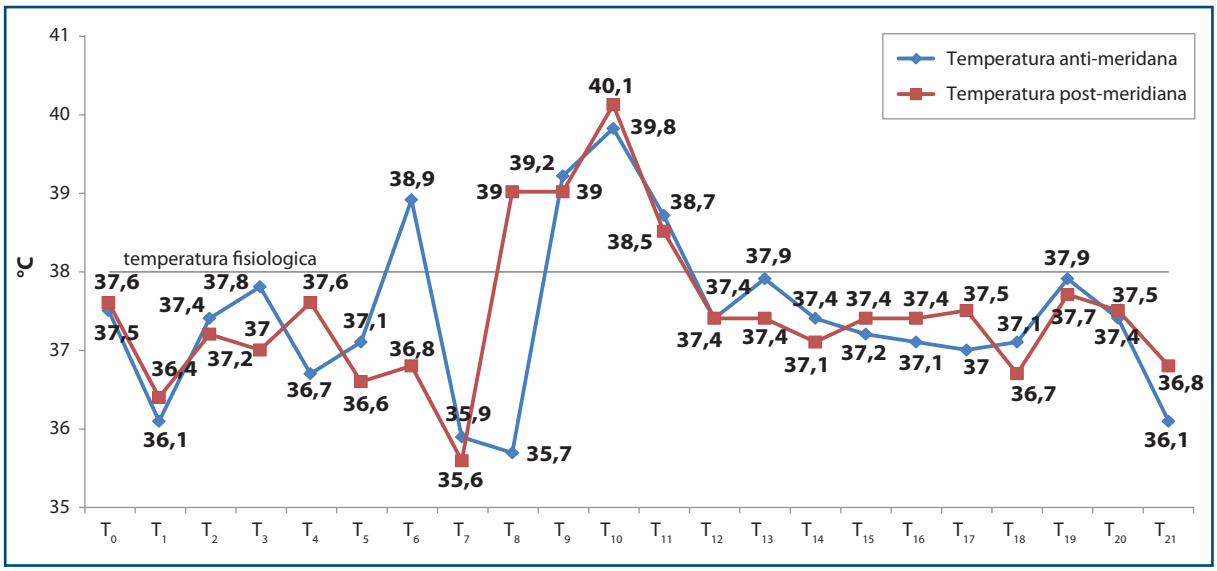


Figura 5. *Challenge a T_{365}: temperature corporee nel cavallo di controllo.*

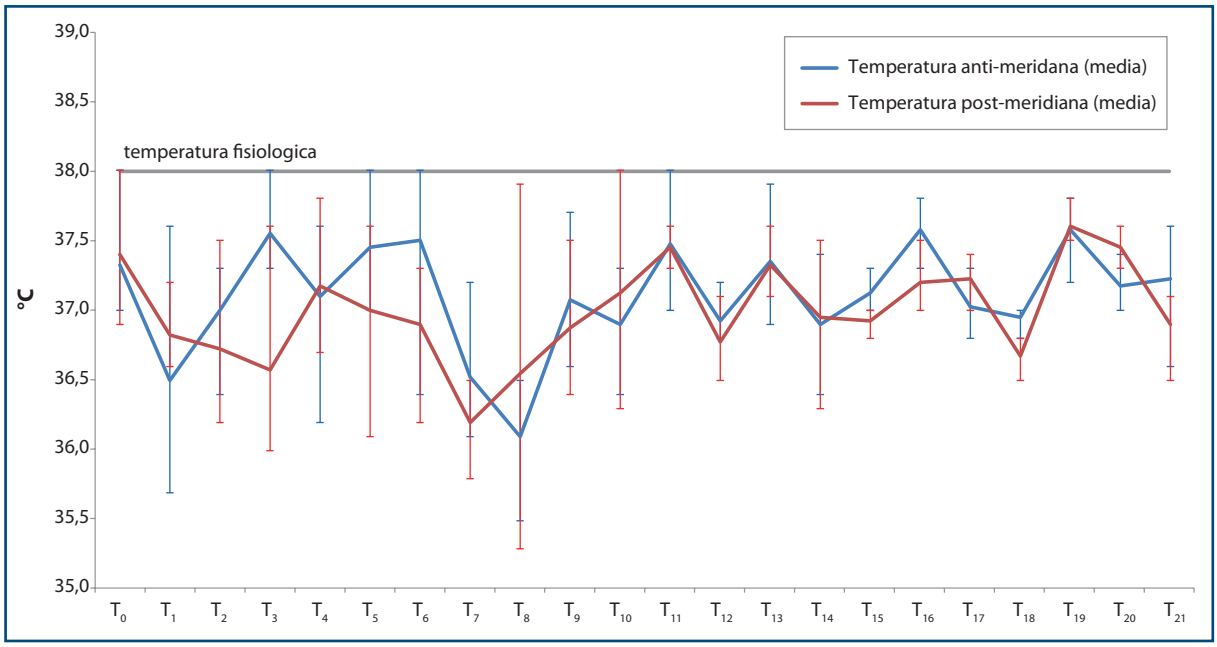


Figura 6. *Challenge a T_{365} : media delle temperature corporee nei cavalli vaccinati.* Le barre di errore indicano le temperature massime e minime.

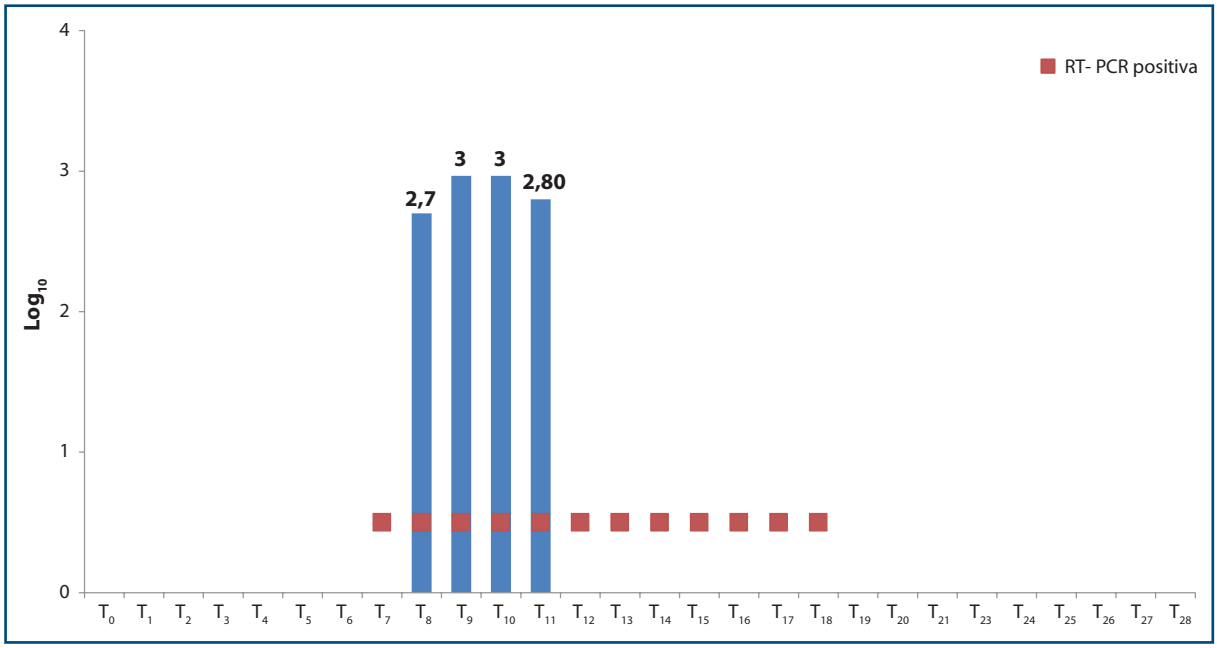


Figura 7. *Challenge a T_{365} : RT-PCR e titoli viremici/ml relativi al cavallo di controllo.* Nei cavalli vaccinati l'isolamento virale e la RT-PCR erano negativi e non sono riportati.

Challenge dell'immunità T_{365}

Quattro cavalli immunizzati e un cavallo di controllo sono stati sottoposti a challenge dell'immunità tramite inoculazione intravenosa di 10^5 $TCID_{50}$ particelle di virus di campo isolato, nel 2008, in Namibia.

Nel cavallo di controllo un primo rialzo termico della temperatura corporea è stato registrato nel giorno 6 dall'inoculazione, un secondo rialzo, compreso tra i 38,5°C e 40,1°C, nei giorni 8, 9, 10 e 11 dall'inoculazione (Figura 5). Nel periodo febbrile sono stati osservati segni clinici paragonabili a quelli osservati nel cavallo di controllo sottoposto a challenge al T_{109}.

Il virus è stato isolato dal sangue nei campioni prelevati dal giorno 8 al giorno 11, il titolo virale infettante variava tra $10^{2.7}$ e 10^3 $TCID_{50}$/ml. La RT-PCR è risultata positiva dal giorno 7 al giorno 18 dall'inoculazione (Figura 7).

Nei cavalli immunizzati non sono stati rilevati segni clinici nei 21 giorni di osservazione. Le prove di isolamento virale e RT-PCR condotti sui campioni di san-

gue nei 28 giorni dall'inoculazione hanno confermato l'assenza virale.

I due cavalli di controllo sono sopravvissuti all'infezione.

Cavalli sentinella

I cavalli sentinella sono rimasti negativi per PE durante tutti i 14 mesi di osservazione.

Cattura dei *Culicoides*

Durante la stagione estiva delle piogge il numero di *Culicoides* catturati nelle vicinanze della zona di pascolo è risultato compreso tra 100 e 150 unità per notte. Il numero di insetti catturati nella stagione invernale secca è risultato ridotto a circa 10.

Conclusioni

Durante i 14 mesi della sperimentazione, non sono stati osservati né segni clinici né positività sierologica nei cavalli sentinella, confermando quanto già conosciuto, nei primi del '900, dalle autorità tedesche che avevano in uso l'azienda Bergvlug per proteggere i cavalli dalla PE. Si può ipotizzare che l'habitat, caratterizzato dall'elevata altitudine, circa 2.000 metri s.l.m., unitamente alle basse temperature non siano favorevoli alla colonizzazione di *Culicoides* che pur essendo presenti sono in numero tale da non avere la capacità vettoriale. Al contrario, nelle zone a più bassa altitudine, nello stesso distretto di Windhoek, i *Culicoides*, durante la stagione delle piogge, sono catturati a migliaia e la malattia è endemica.

Il sierotipo 9 è stato utilizzato nella sperimentazione in quanto non è presente nel vaccino polivalente prodotto da OBP nonostante, nel recente passato, il sierotipo sia stato dominante nella zona del Capo Occidentale. I due test di sieroneutralizzazione non hanno evidenziato differenze significative nella capacità di rilevare anticorpi, in seguito a vaccinazione, durante i dodici mesi di osservazione.

Nei cavalli immunizzati i titoli sierologici sono stati rilevati già 15 giorni dopo la vaccinazione, il plateau è stato raggiunto tra i giorni 42 e 49 dalla vaccinazione. I titoli sono rimasti a livelli significativi nell'intero periodo di osservazione. La sieroconversione registrata nei cavalli a T_{365}, 1:80, è risultata paragonabile a quella riportata in letteratura, 1:40, a 200 giorni dalla vaccinazione (5).

Il vaccino preparato con il virus proveniente dalla collezione antigeni Bob Swanepoel ha dimostrato di essere efficace quando il challenge è stato eseguito a 365 giorni con un ceppo di campo recentemente isolato in Namibia. Nei cavalli vaccinati non è stata rilevata reazione febbrile o viremia, a indicare che i cavalli sono risultati protetti dall'infezione e dalla malattia e che non sono risultate differenze significative legate a un drift antigenico tra i ceppi virali utilizzati.

Al contrario, i due animali di controllo utilizzati nelle prove di challenge a T_{109} e a T_{365} hanno presentato piressia, viremia e segni clinici. La reazione febbrile ha preceduto la viremia di almeno 24 ore. Entrambi gli animali sono sopravvissuti all'infezione.

Nelle cavie il vaccino ha stimolato titoli anticorpali a un livello paragonabile a quello rilevato nei cavalli. Gli indici sieroneutralizzanti sono stati rilevati a partire dal quindicesimo giorno e il plateau è stato raggiunto nel giorno 42 dalla vaccinazione. I valori dei titoli sierologici sono rimasti a livelli significativi per l'intero anno di osservazione, questo aspetto conferma che la cavia potrebbe essere un indicatore delle proprietà antigeniche del prodotto in esame. In un prossimo esperimento sarà interessante comparare il modello cavia e il modello topo IFNAR -/- per la valutazione dell'efficacia dei vaccini PE.

Bibliografia

1. Chiam R., Sharp E., Maan S., Rao S., Mertens P., Blacklaws B., Poynter N.D., Wood J. & 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.
2. 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) VP2 protects against AHSV challenge in an IFNAR –/– mouse model. *PLos One*, **6**(1), e16503.
3. Direction de la Qualité du Medicament du Conseil de l'Europe (DEQM) European Pharmacopeia 2004. European Pharmacopeia, 5th Ed. Juin 2004. Aubin, Ligugé, 01/2005:0062, 628-634.
4. 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.
5. 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, June 1991 Paris, France CRC Press, Boca Raton, 874-886.
6. Gard G.P. & Kirkland P.D. 1993. Bluetongue virology and serology. Australian standard diagnostic techniques for animal diseases (L.A. Corner & T.J. Bagust, eds). CISRO Information Services, Melbourne, 1-17.
7. 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, London, 712-715.
8. 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.
9. 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.
10. Mare S. & Paweska J.T. 2005. Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera. *J Virol Methods,* **125** (1), 55-65.
11. Mellor P.S. & Hamblin C. 2004. African horse sickness. *Vet Res*, **35**, 445-466.
12. Nashwa K.M. & Rofaiil S.K. 2007. Evaluation of bivalent inactivated oil adjuvant African horse sickness vaccine in guinea-pigs and mice. *In* Proc. 5th Scientific Conference, 5 November. Beni-Suef. *Beni Suef Medi J*, **18** (1), 57-61.
13. Nurton J.P., Guthrie A.J. & Howell P.G. 2001. Development and preliminary validation of an inactivated African horse sickness virus serotype 4 vaccine. *In* Proc. Annual Congress of the Equine Practitioner Group of the South African Veterinary Association, January 2001. Pretoria, South Africa. World Veterinary Association, Brussels, 33-129.
14. Ronchi G.F., Ulisse S., Rossi E., Franchi P., Armillotta G., Capista S., Peccio A., Di Ventura M. & Pini A. 2012. The guinea-pig as a model for the study of the antigenic properties of an inactivated and adjuvanted vaccine for the control of African horse sickness. *Vet Ital*, **48** (1), 67-76.
15. Russel W.M.S. & Burch R. 1959. The principles of human experimented technique; Methuen, London, 238 p.
16. 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.
17. Scanlen M., Paweska J.T., Vershoor J.A. & van Dijk A.A. 2002. The protective efficacy of a recombinant VP2-based African horsesickness subunit vaccine candidate is determined by adjuvant. *Vaccine*, **20**, 1079-1088.
18. Von Teichman B.F., Dungu B. & Smit T.K. 2010. In vivo cross-protection to African horse sickness serotypes 5 and 9 after vaccination with serotypes 8 and 6. *Vaccine*, **28**, 6505-6517.
19. 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.
20. Wilson A., Mellor P.S., Szmaragad C., Mertens P.P.C. 2009. Adaptive strategies of African horse sickness virus to facilitate vector transmission. *Vet Res* **40**(2):16. doi: 10.1051/vetres:2008054.
21. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2008. Manual of diagnostic tests and vaccine for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Sixth edition. OIE, Paris, 823-838.