IZS TERAMO

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

Sviluppo e valutazione della efficacia di vaccini inattivati nei confronti di due *Orbivirus* emergenti nel bacino del Mediterraneo (IZS AM 06_22 RC)

GAETANO FEDERICO RONCHI

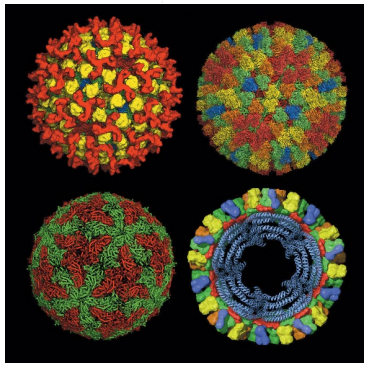
IZS TERAMO
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"

Obiettivi

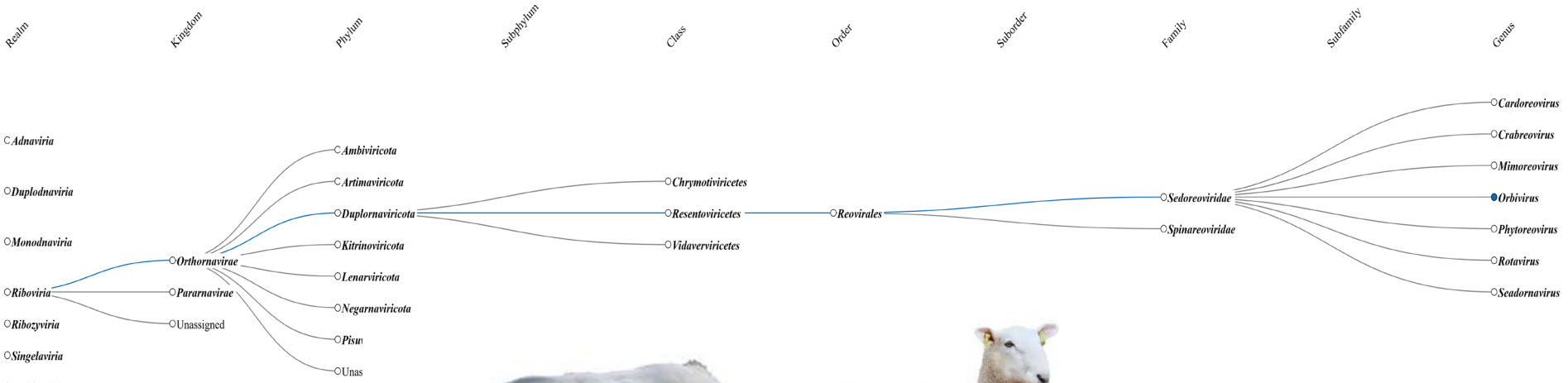
- Produrre e controllare due lotti di vaccino inattivato e rispettivi lotti di placebo per EHDV8 e BTV3
- Studiare la tossicità *in vitro* delle formulazioni vaccinali prodotte
- Valutare la sicurezza, l'immunogenicità e l'efficacia su bovini e ovini delle formulazioni vaccinali prodotte
- Saggiare l'immunogenicità su cavia delle formulazioni vaccinali prodotte

IZS TERAMO

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

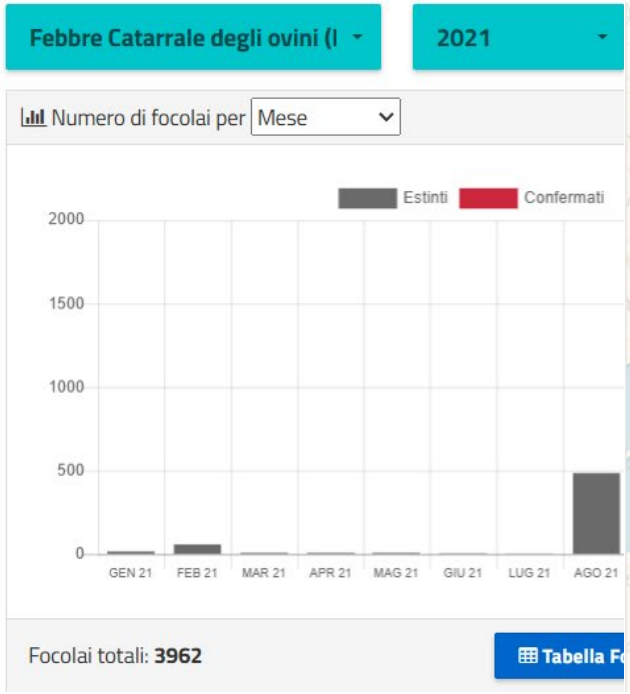


Orbivirus



BTV3 – EHDV8 Italia 2021

- 3962 focolai BTV (67 -BTV3) – 0 focolai EHDV8

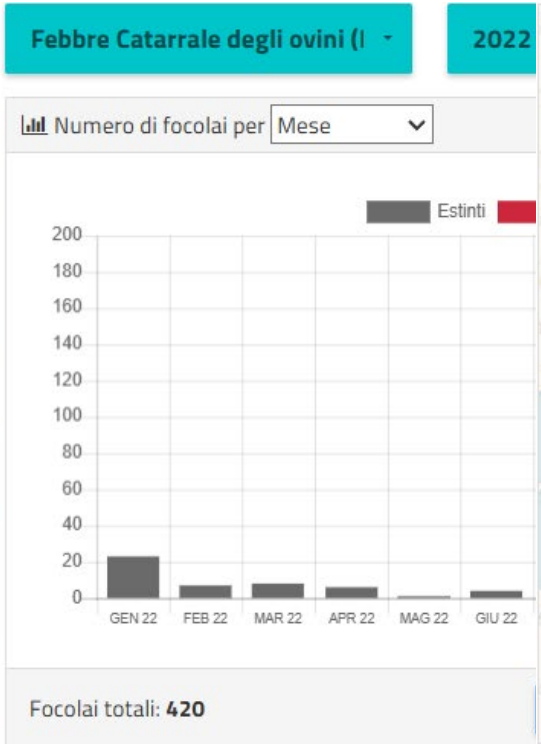


BENV
Bollettino Epidemiologico
Nazionale Veterinario

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

BTV3 – EHDV8 Italia 2022

- 336 focolai BTV3 Vs 10 focolai EHDV8



BENV
Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario

IZS TERAMO

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

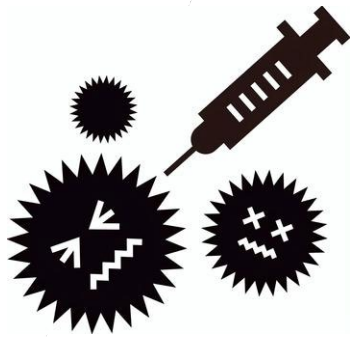
SVILUPPO DEI VACCINI INATTIVATI

CEPPO VIRALE: EHDV-8

PROVENIENZA: 2021 Tunisia

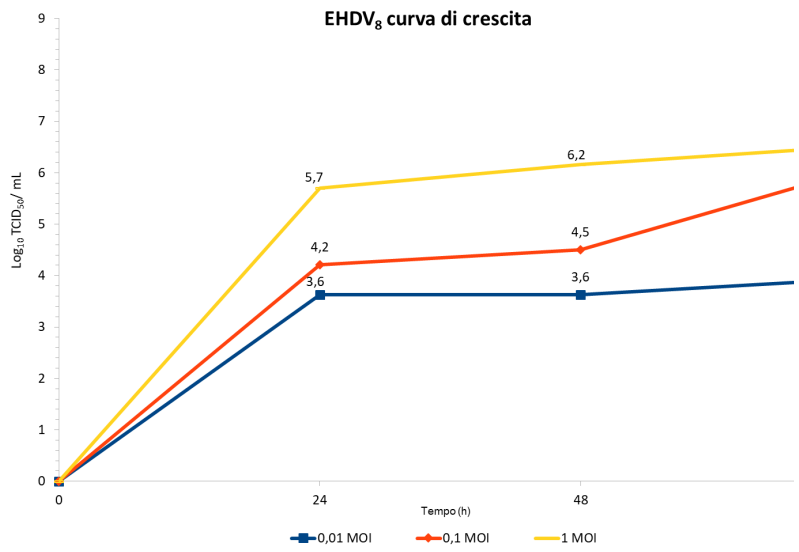
CEPPO VIRALE: BTV3

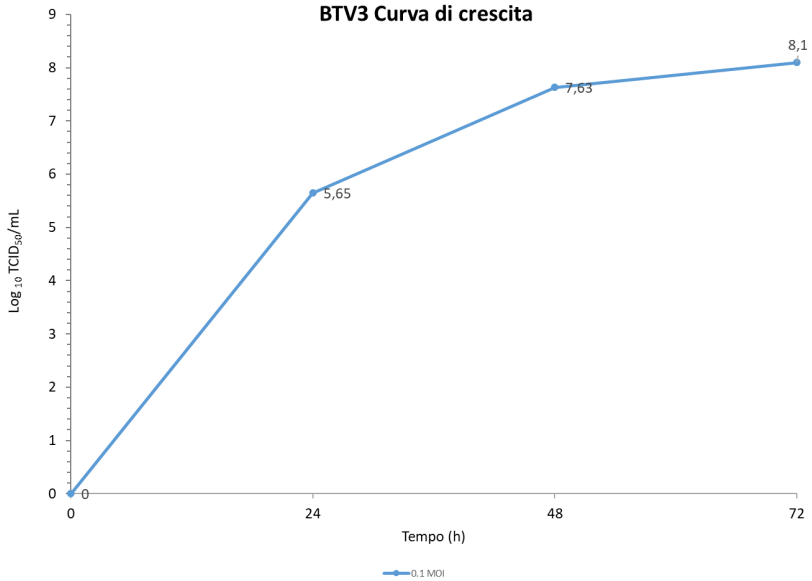
PROVENIENZA: 2022 Sardegna



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

Curve di crescita virus EHDV8-BTV3

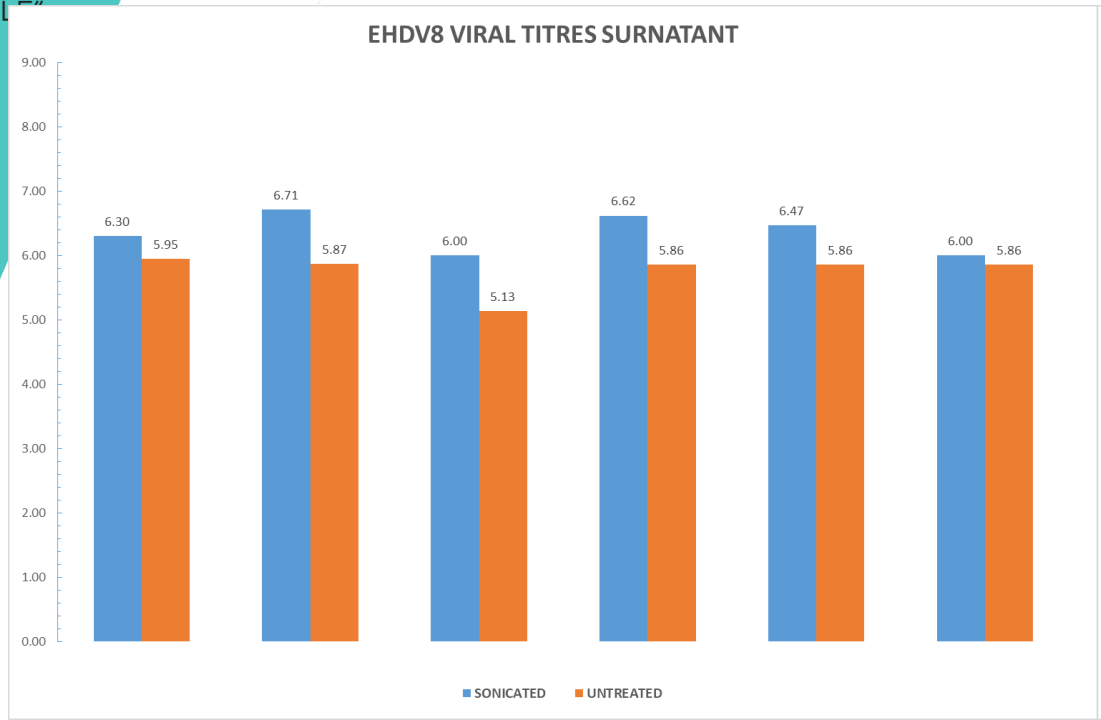


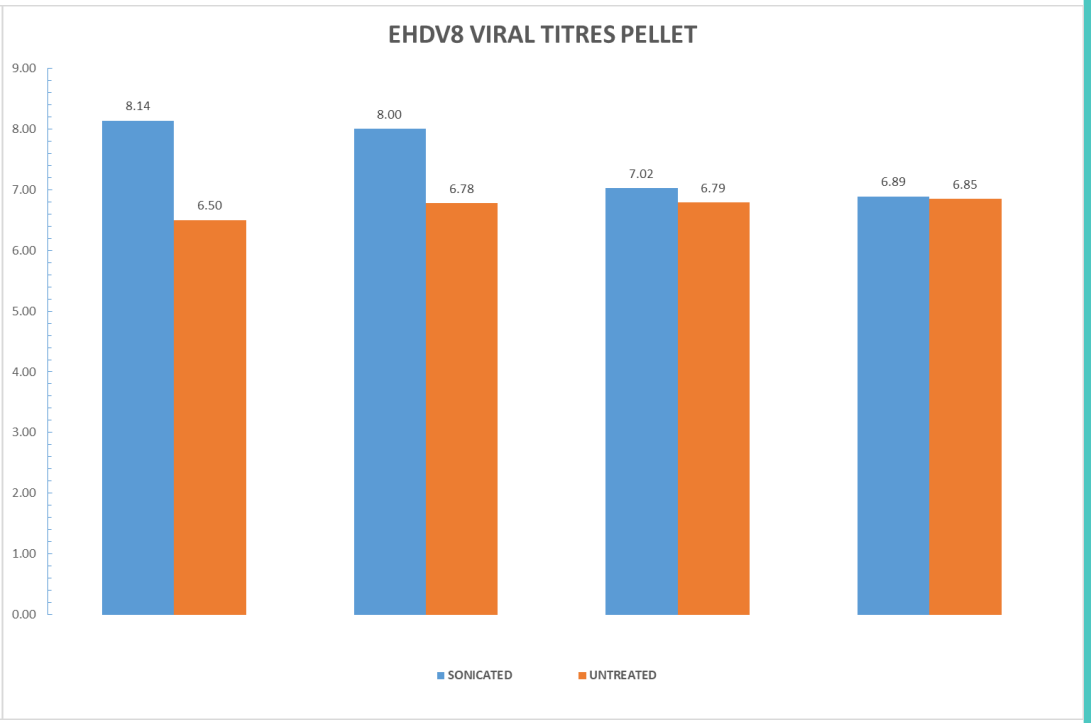


IZS TERAMO

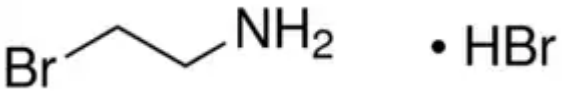
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"

EHDV8 – Aumento del titolo virale





INATTIVAZIONE



Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine

Hans G. Bahnemann

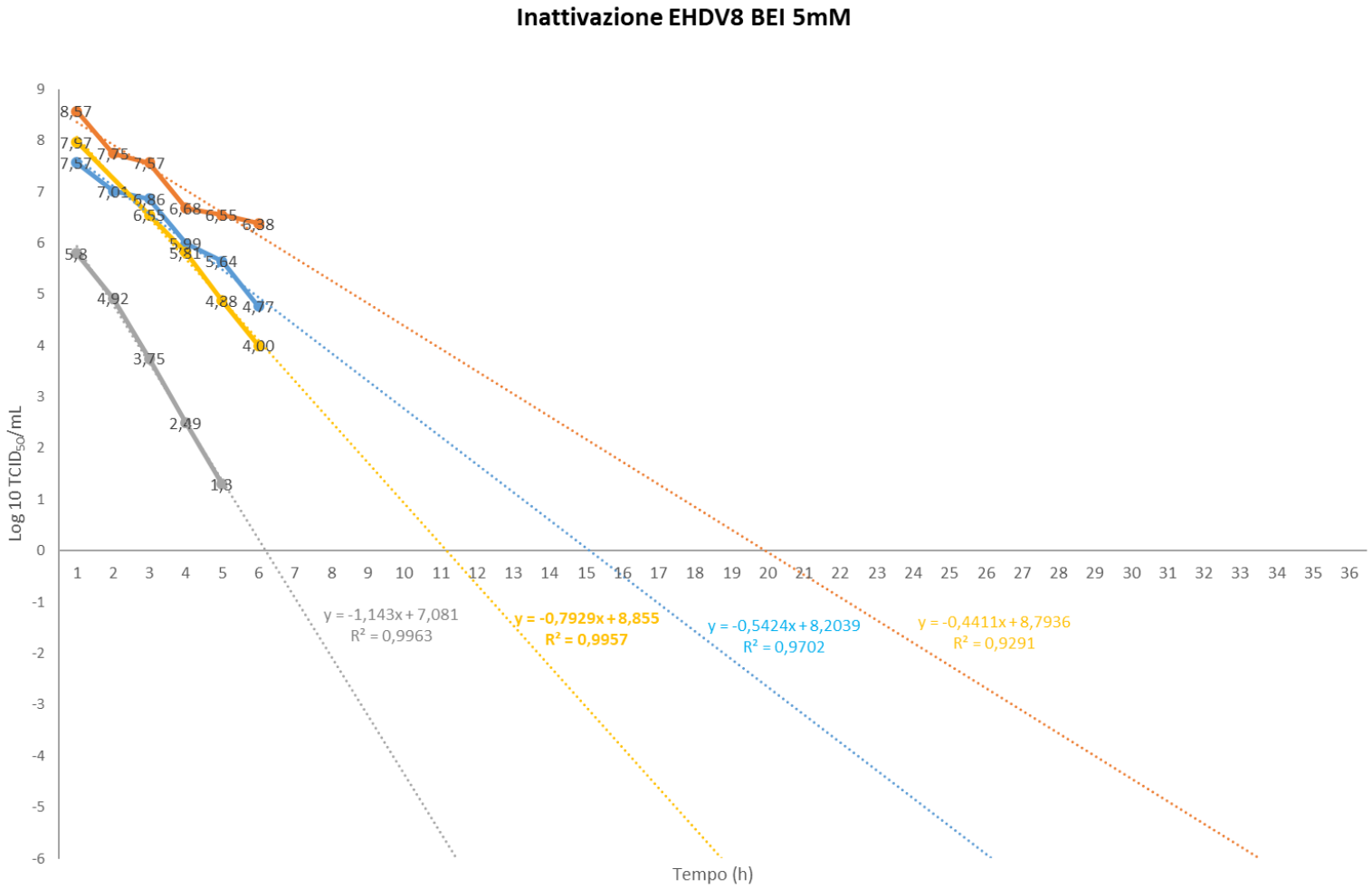
Viral antigens for human and veterinary vaccines are still inactivated with formaldehyde. This is not an ideal inactivant and the problems of formaldehyde inactivation of vaccines are discussed. Vaccines inactivated with aziridines are superior in safety and antigenicity. Aziridines inactivate viruses in a first-order reaction and the inactivation rate and endpoint can be determined. The preparation and application of the aziridine compound binary ethylenimine (BEI) and the necessary conditions for and controls of the inactivation process are described and discussed. A computer program has been written for assistance in the use of BEI for controlled inactivation of viral antigens.

Keywords: Inactivation; binary ethylenimine; viral antigens

IZS TERAMO

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

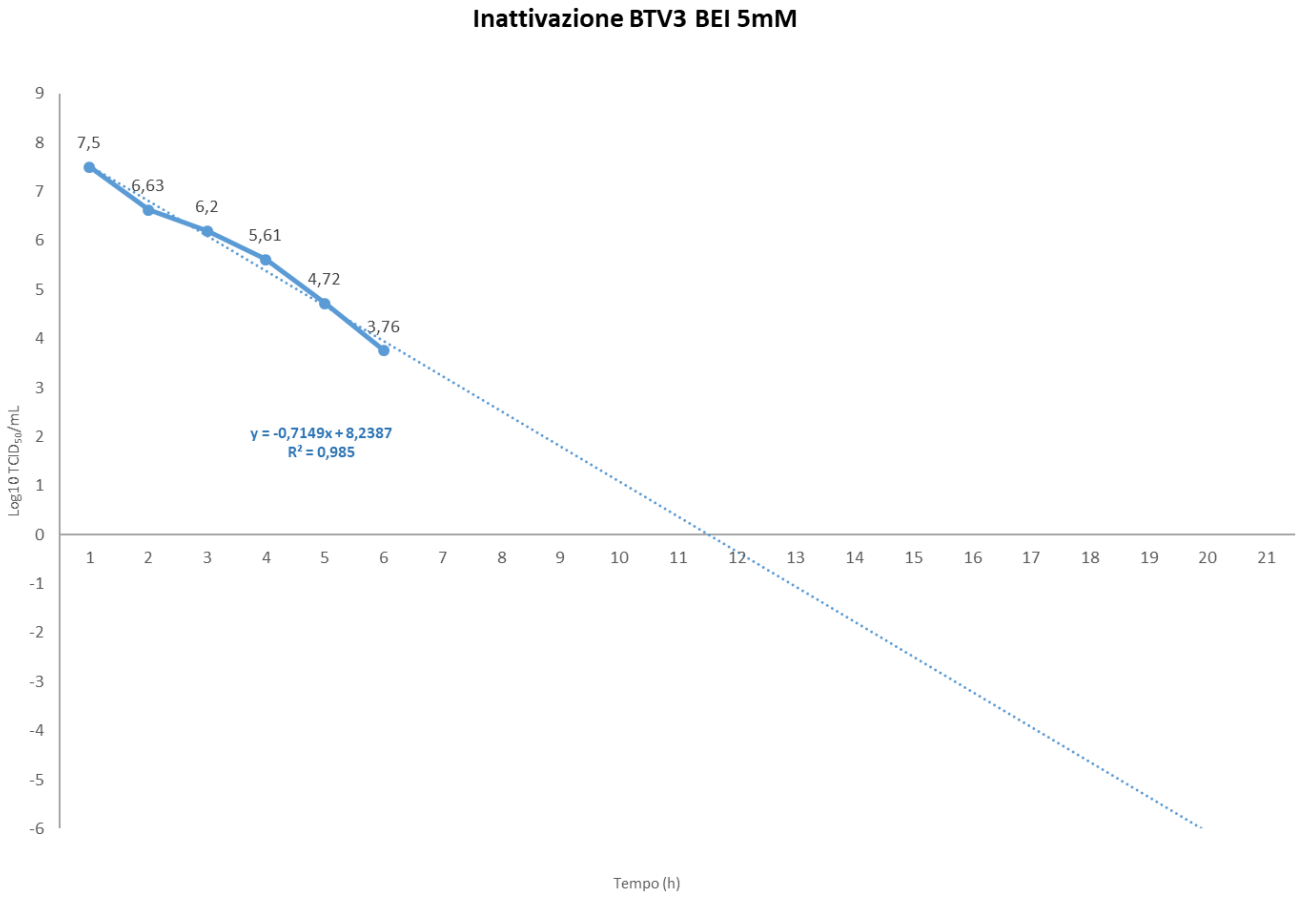
Curve di inattivazione



IZS TERAMO

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

Curve di inattivazione



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

Concentrazione e filtrazione sospensioni virali

- Concentrazione/purificazione

Filtrazione tangenziale 300kD

- Filtrazione: 0.22 µm

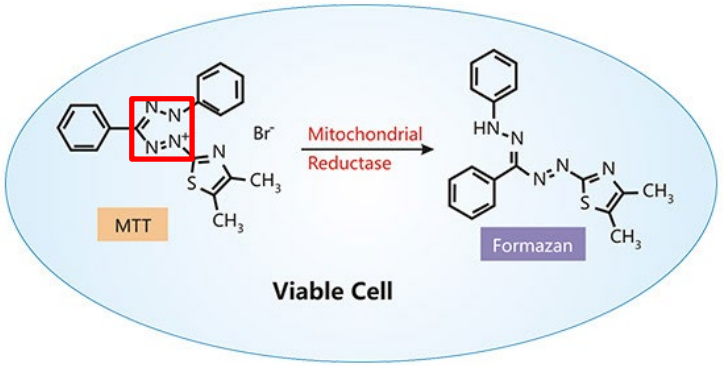
Studio di selezione dei filtri

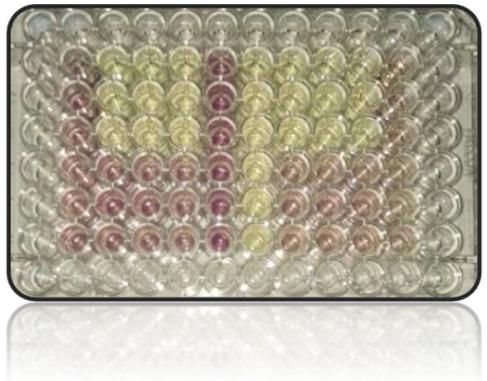
IZS
TERAMO
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"

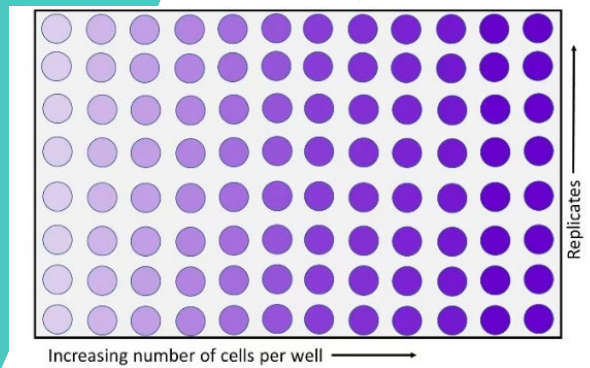
ADIUVANTE

MONTANIDE™ GEL
(10% V/V)
+
SAPONINA
0.3 mg/mL

Studio di tossicità *in vitro* MTT test





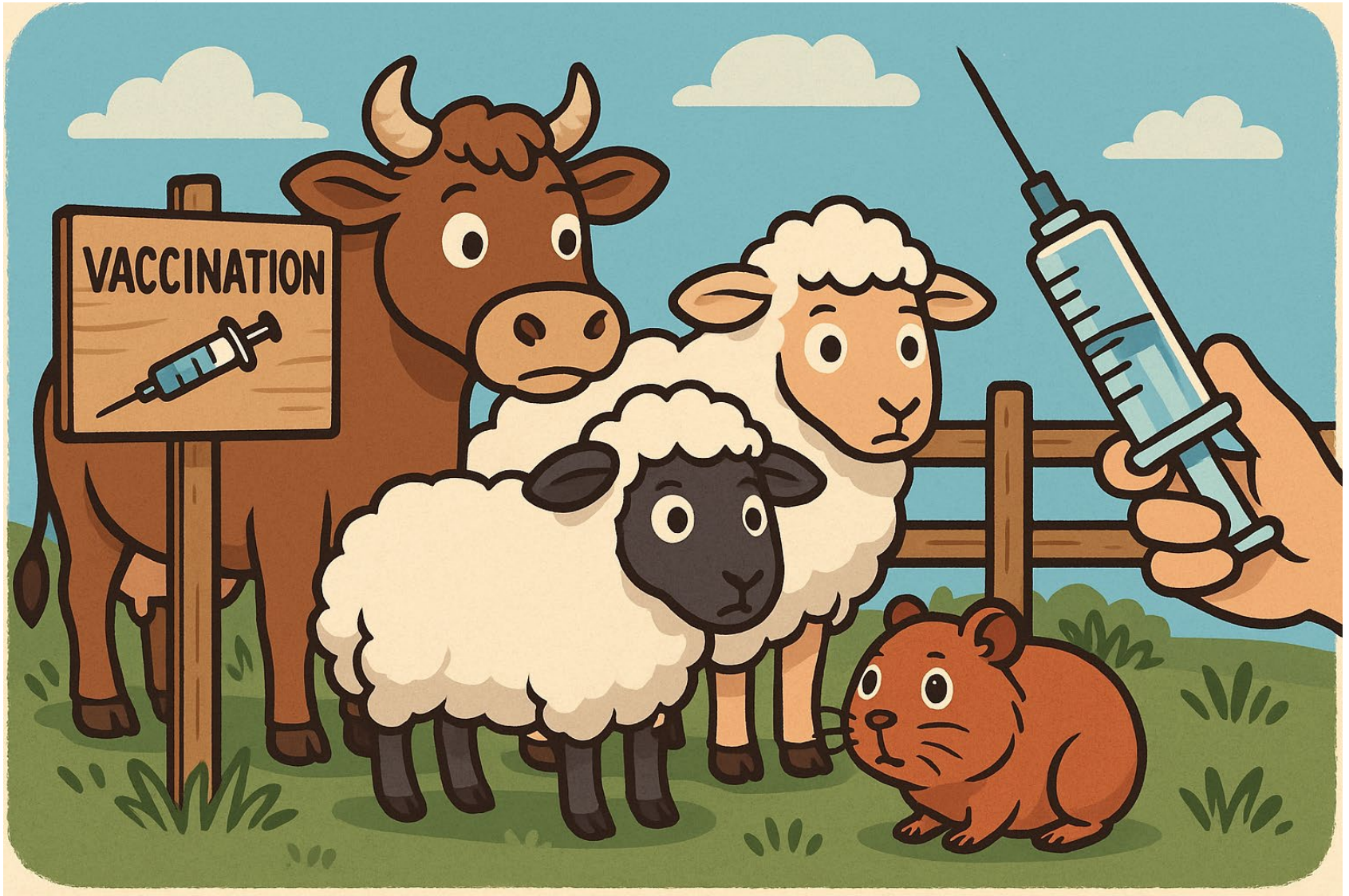


- L'MTT: bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio è una sostanza di colore giallo.
- In particolare, si va a misurare l'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, che è attivo solo nelle cellule vive. La sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT con conseguente formazione di formazano (un sale blu/violaceo).
- La reazione è misurata mediante una lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570nm.

IZS

TERAMO

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



Vaccinazione, Sicurezza Immunogenicità ed efficacia

Animali	Vaccino	Dose-Tempo	Via d'inoculo	Saggio
Bovini 6+4	EHDV8	2 mL – T0 - T21	Sottocutanea	Sicurezza - Immunogenicità - Efficacia
Cavie 16		0.5 mL – T0 - T21	Intramuscolo	Immunogenicità
Ovini 6+4	vBTV3	1 mL - T0 - T21	Sottocutanea	Sicurezza - Immunogenicità - Efficacia
Cavie 16		0.5 mL – T0 - T21	Intramuscolo	Immunogenicità

Sicurezza immunogenicità ed efficacia

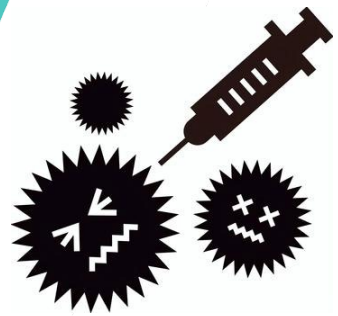
- Temperatura corporea

- Esame clinico quotidiano e osservazioni al sito di inoculo

- Prelievo campioni sangue x ELISA, SN, Real Time RT PCR e Isolamento virale

Challenge

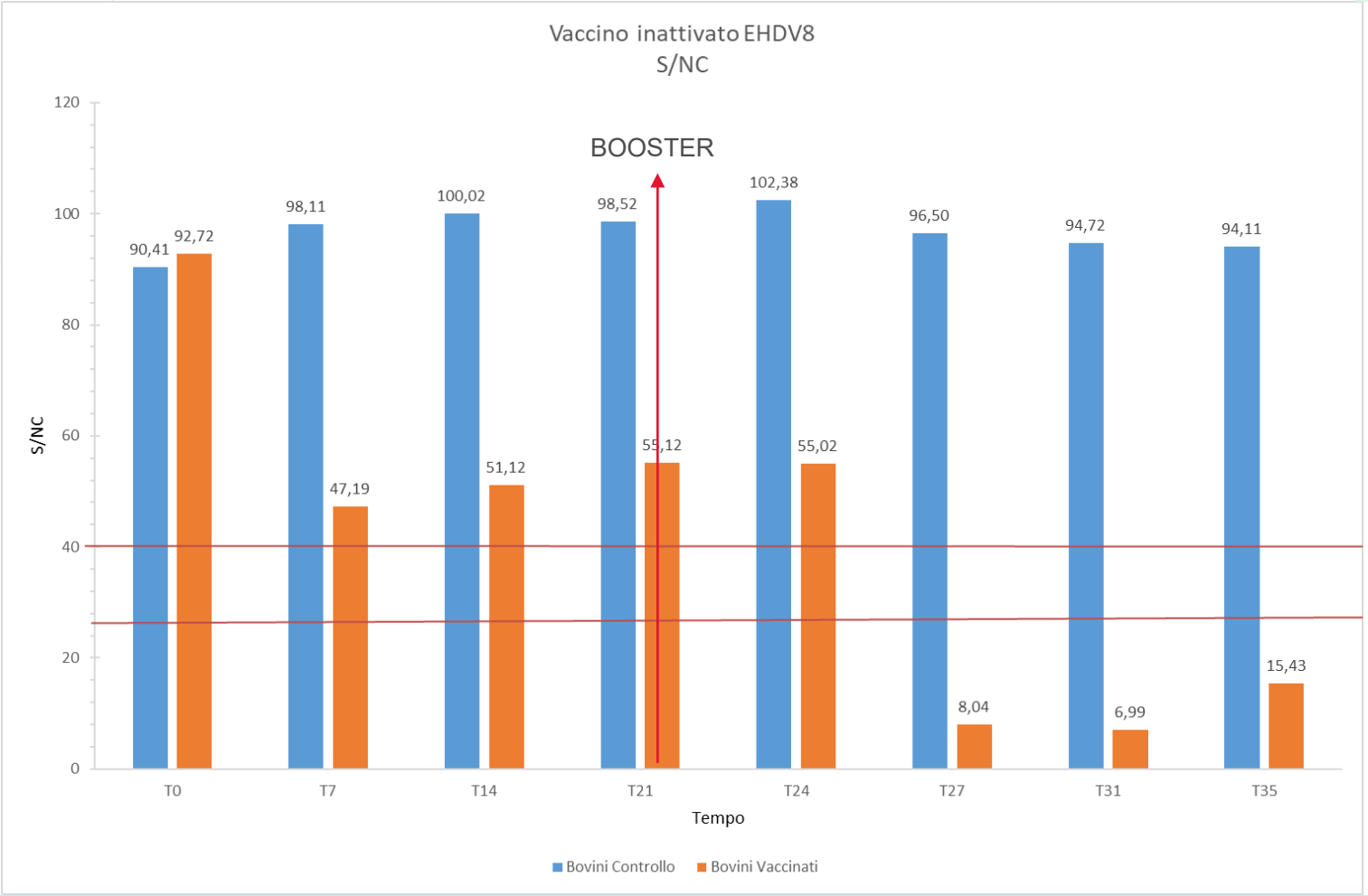
Vaccino	CEPPO CHALLENGE	ISOLATO	VIA	TEMPO
vEHDV8	EHDV-8	Sardegna 2022	3 mL via sottocutanea 2 mL via intradermica	T35
vBTV3	BTV3	Sardegna 2022	1 mL inoculato per via sottocutanea e 0,2 mL, inoculati per via intradermica	T35



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

Risultati EHDV8

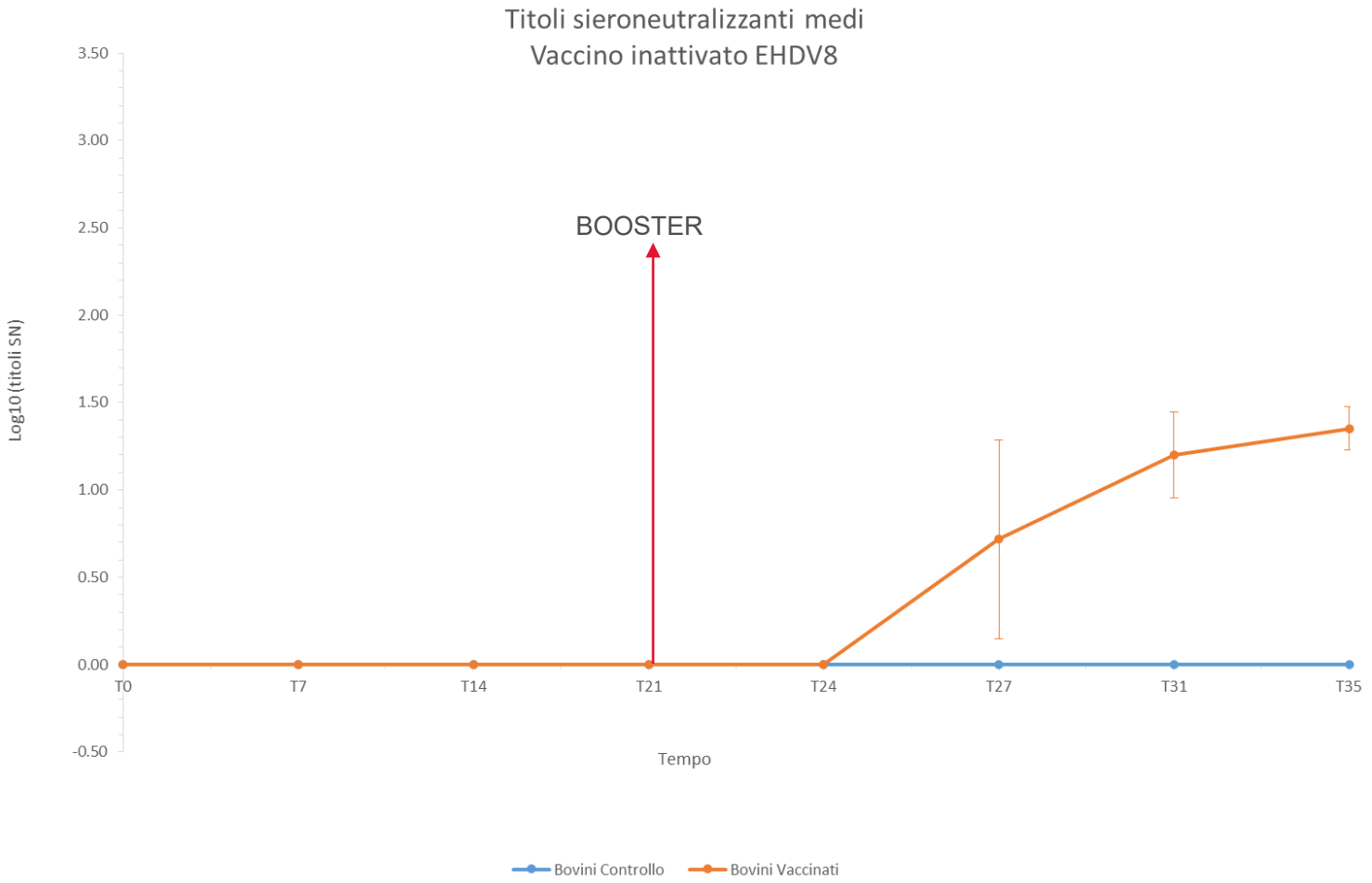
IMMUNOGENICITÀ ELISA



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

Risultati EHDV8

IMMUNOGENICITÀ SN

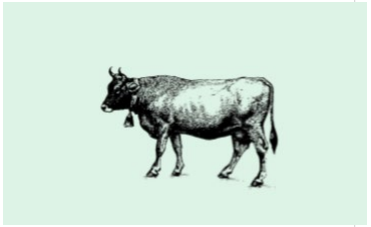


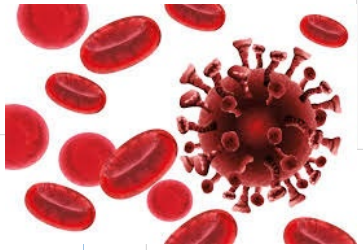
IZS TERAMO

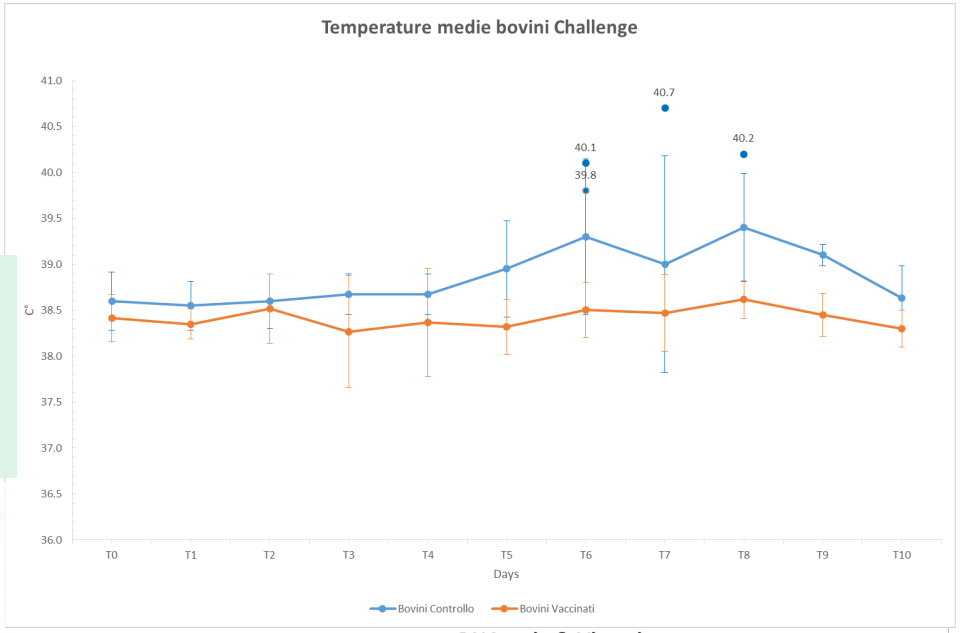
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"

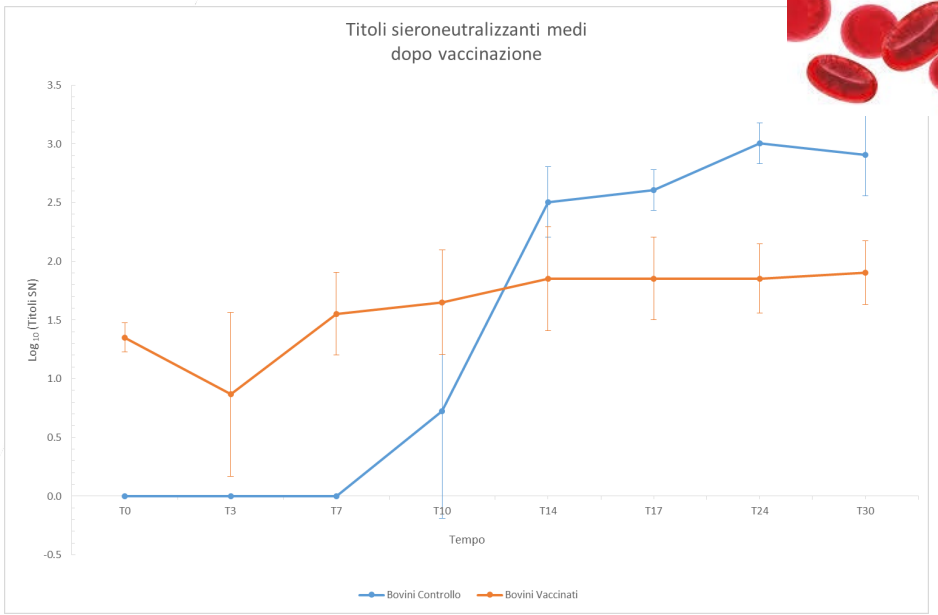
Risultati $EHDV_8$

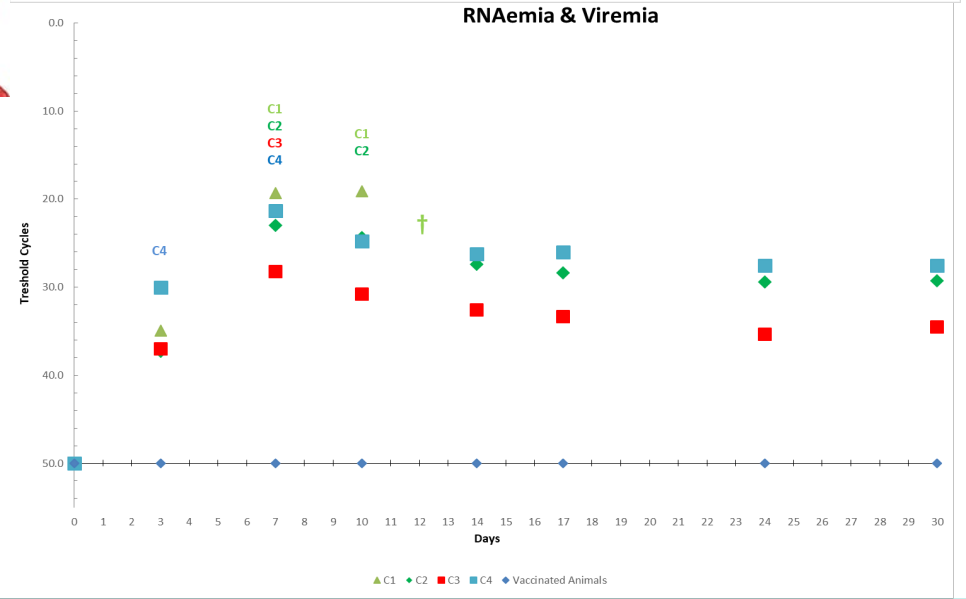
EFFICACIA









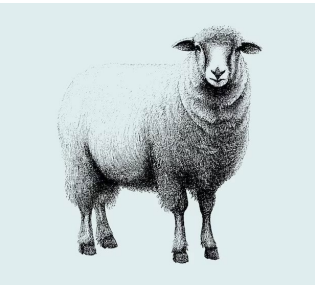


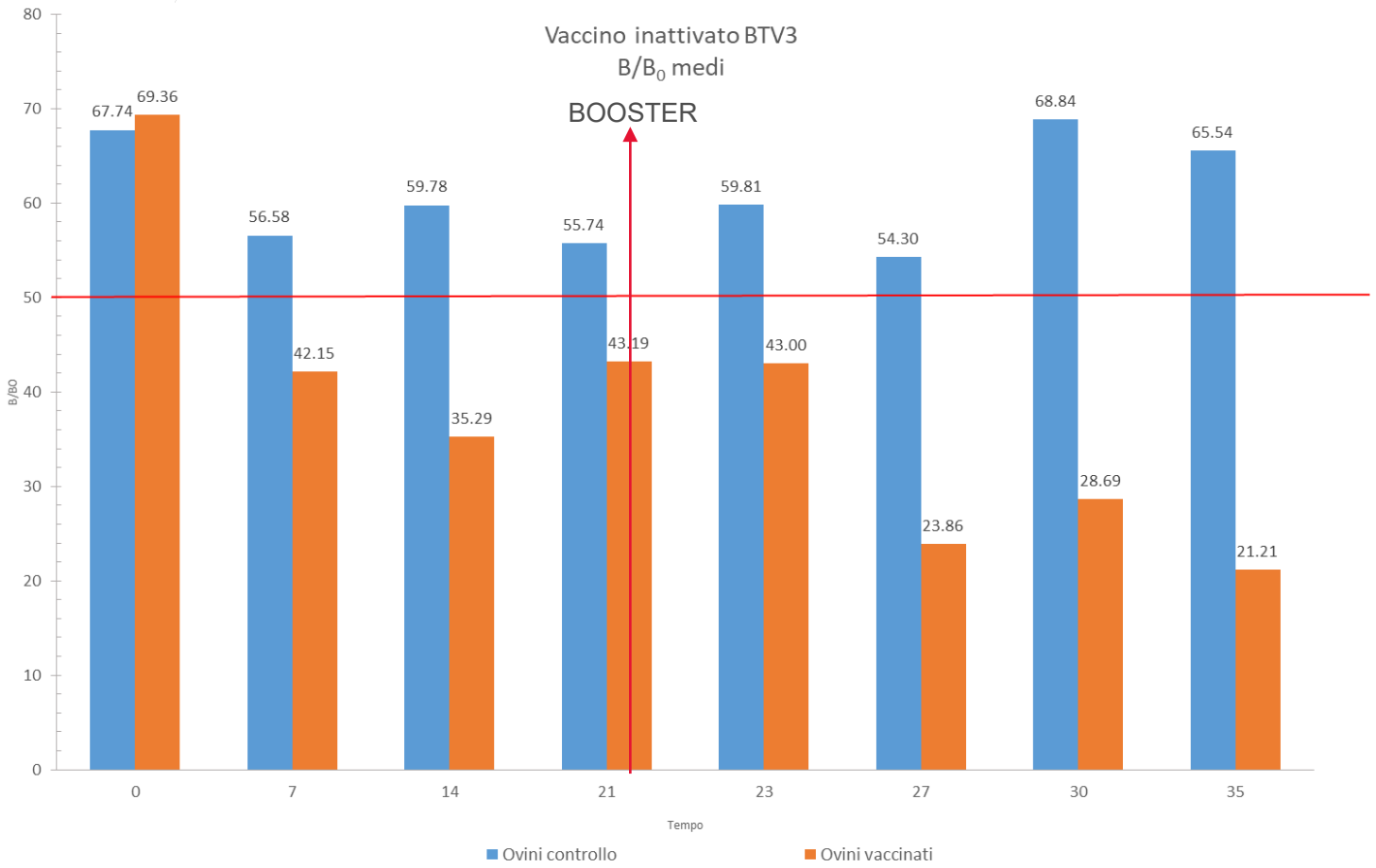
IZS TERAMO

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

Risultati BTV3

IMMUNOGENICITÀ ELISA

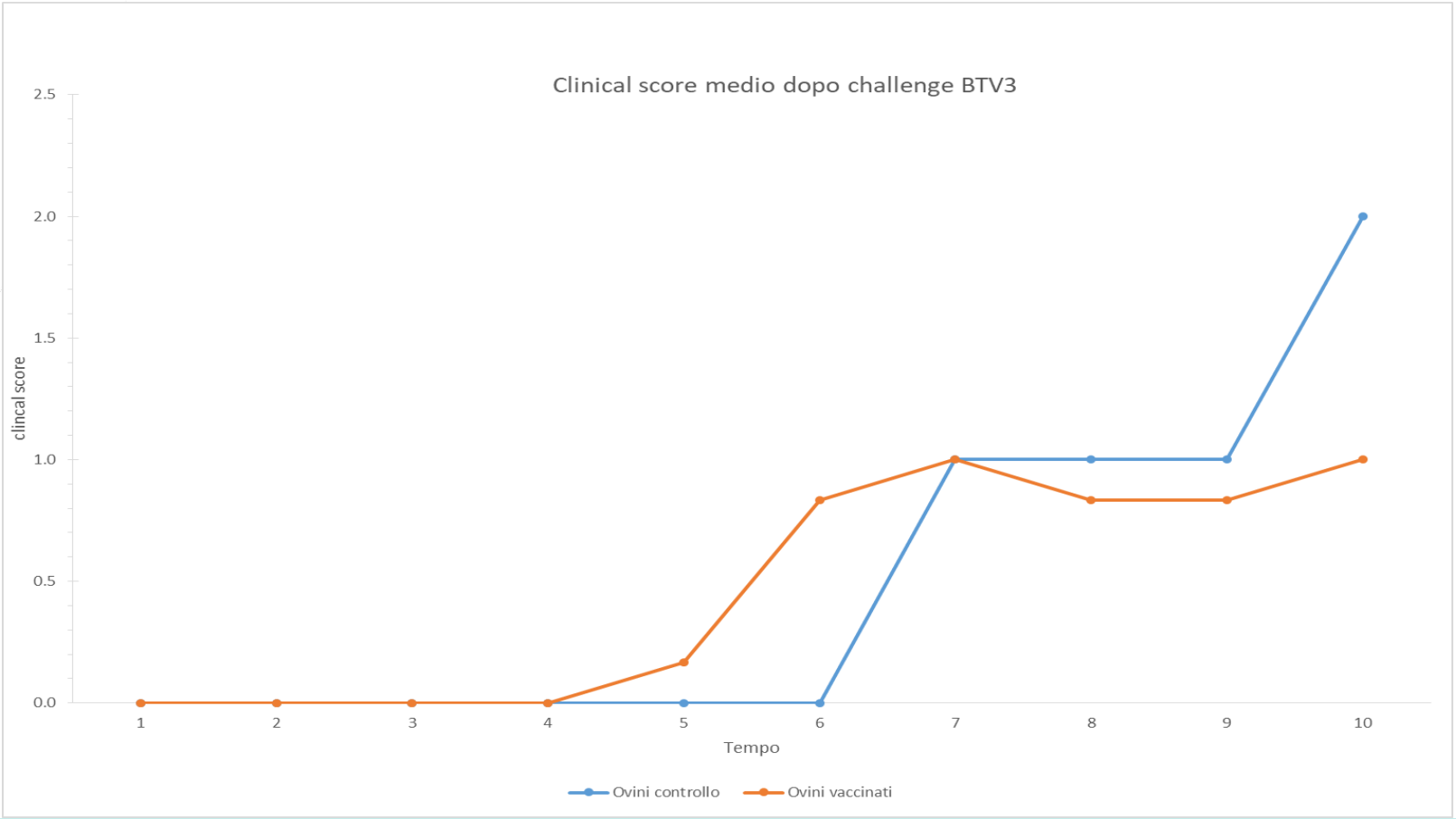




ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"

Risultati BTV3

EFFICACIA

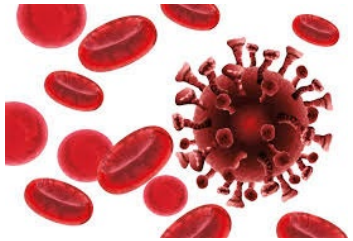


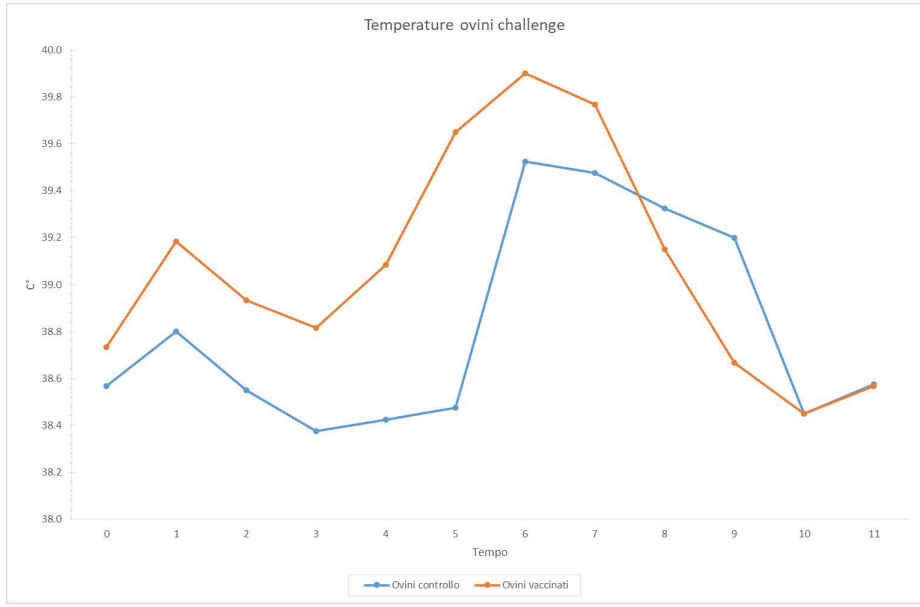
IZS TERAMO

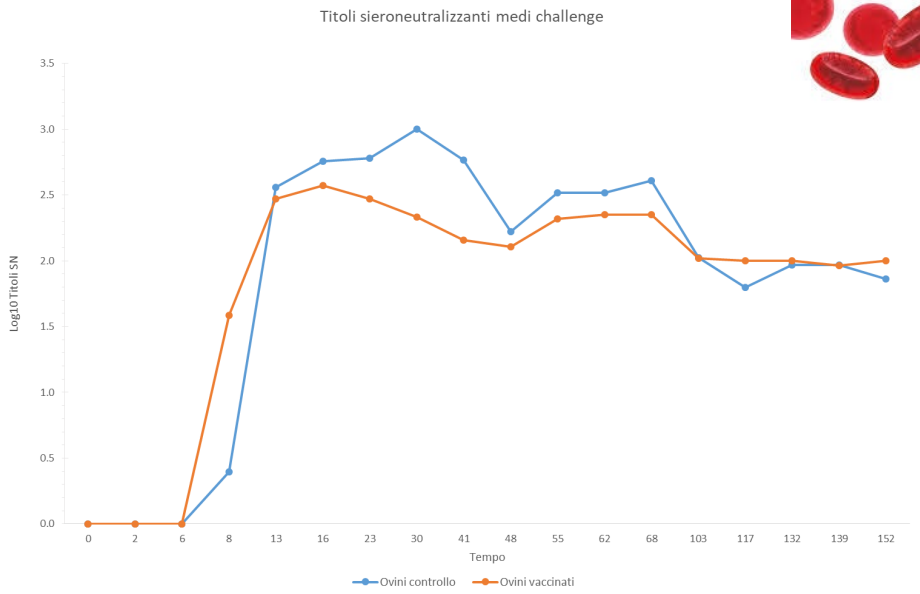
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"

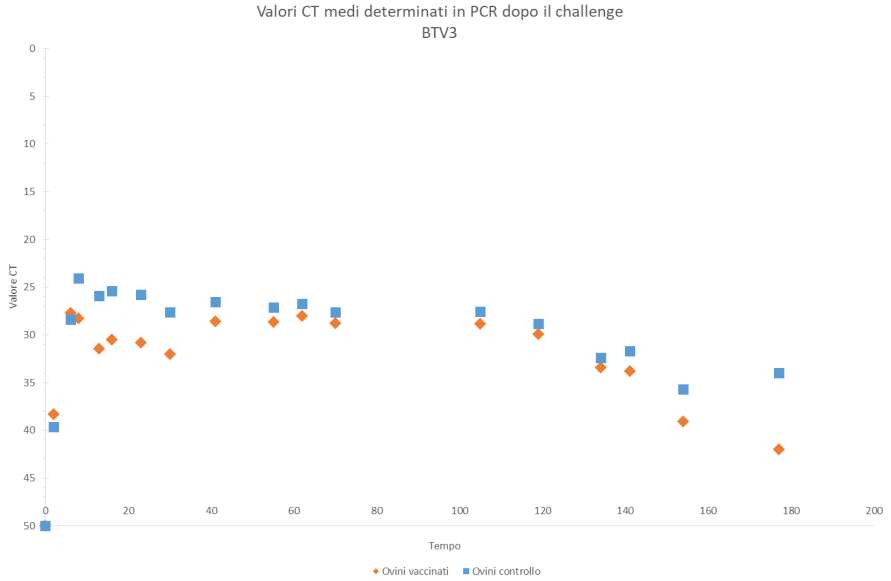
Risultati BTV3

EFFICACIA



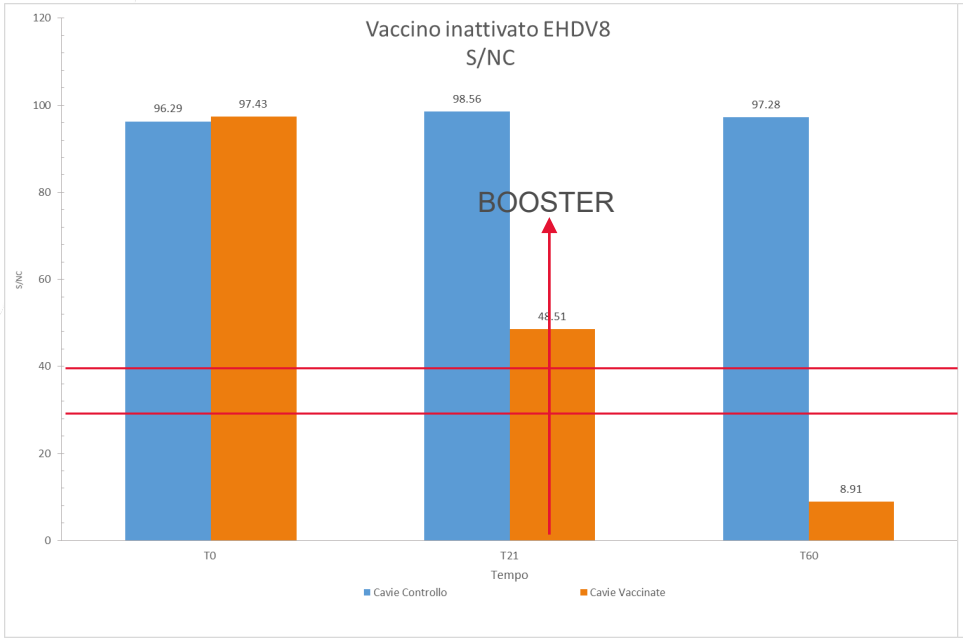


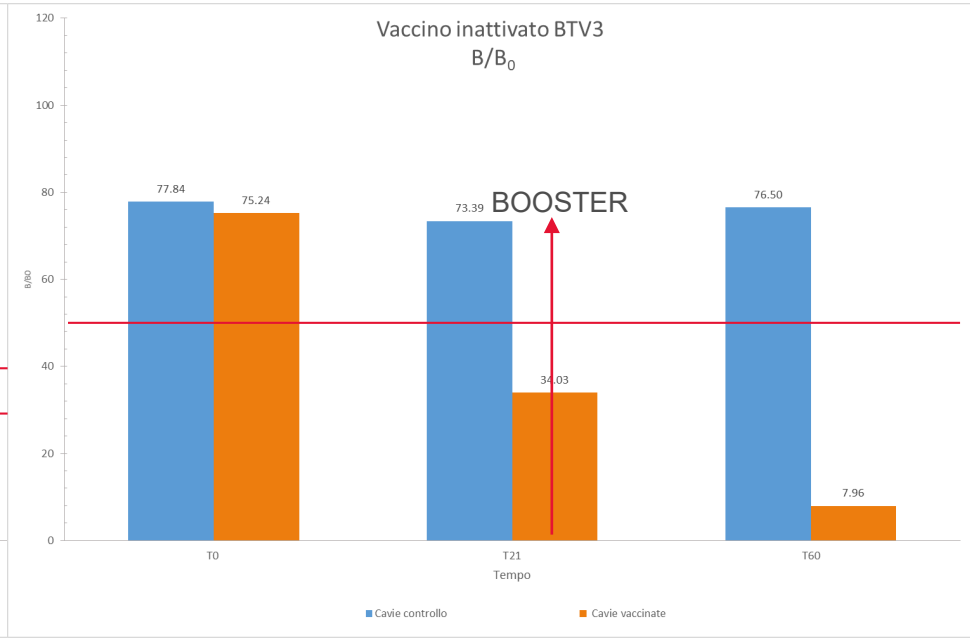




ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"

ELISA CAVIE



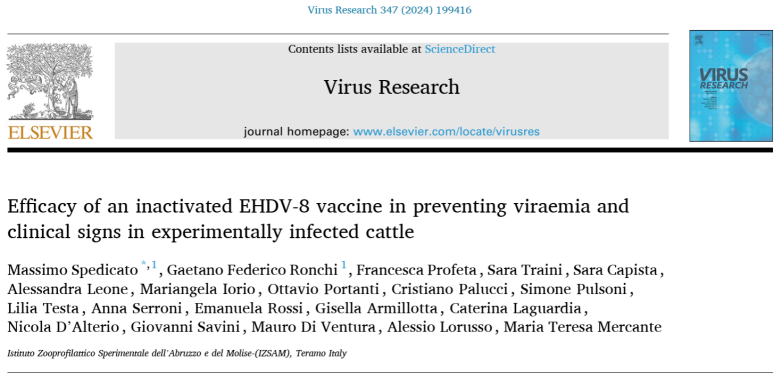


IZS TERAMO

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

CONCLUSIONI

- I vaccini sviluppati sono risultati entrambi sicuri.
- Il vaccino EHDV8 è stato in grado di stimolare anticorpi sieroneutralizzanti capaci di prevenire la viremia.
- Le produzioni sono state effettuate tenendo in considerazione l'industrializzazione del processo



Virus Research 347 (2024) 199416

Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Efficacy of an inactivated EHDV-8 vaccine in preventing viraemia and clinical signs in experimentally infected cattle

Massimo Spedicato [*,1], Gaetano Federico Ronchi [1], Francesca Profeta, Sara Traini, Sara Capista, Alessandra Leone, Mariangela Iorio, Ottavio Portanti, Cristiano Palucci, Simone Pulsoni, Lilia Testa, Anna Serroni, Emanuela Rossi, Gisella Armillotta, Caterina Laguardia, Nicola D'Alterio, Giovanni Savini, Mauro Di Ventura, Alessio Lorusso, Maria Teresa Mercante

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM), Teramo Italy

IZS TERAMO

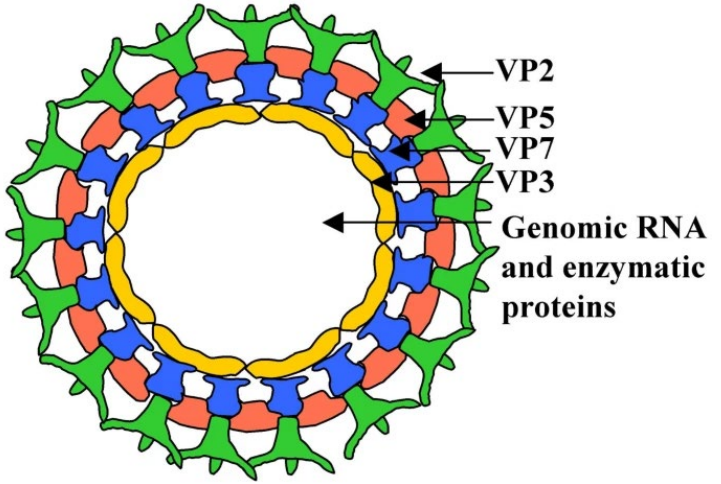
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "G. CAPORALE"

CONCLUSIONI

- Il protocollo di produzione e il ceppo virale del vaccino EHDV8 sono stati consegnati, dopo stipula di contratto a seguito di bando per manifestazione di interesse, alla ditta farmaceutica FATRO per l'industrializzazione del processo

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

CONCLUSIONI



- Il vaccino BTV3 ha indotto una immediata produzione di anticorpi anti VP7 ma non è stato in grado di indurre anticorpi neutralizzanti. I risultati ottenuti aprono la strada ad indagini finalizzate alla comprensione del motivo della mancata stimolazione degli anticorpi neutralizzanti.

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

CONCLUSIONI

- Il modello animale cavia dimostratosi predittivo di immunogenicità per altre formulazioni vaccinali prodotte non ha dato i risultati attesi per quanto riguarda il vaccino EHDV8, deve essere ulteriormente indagato per quanto riguarda il vaccino BTV3

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

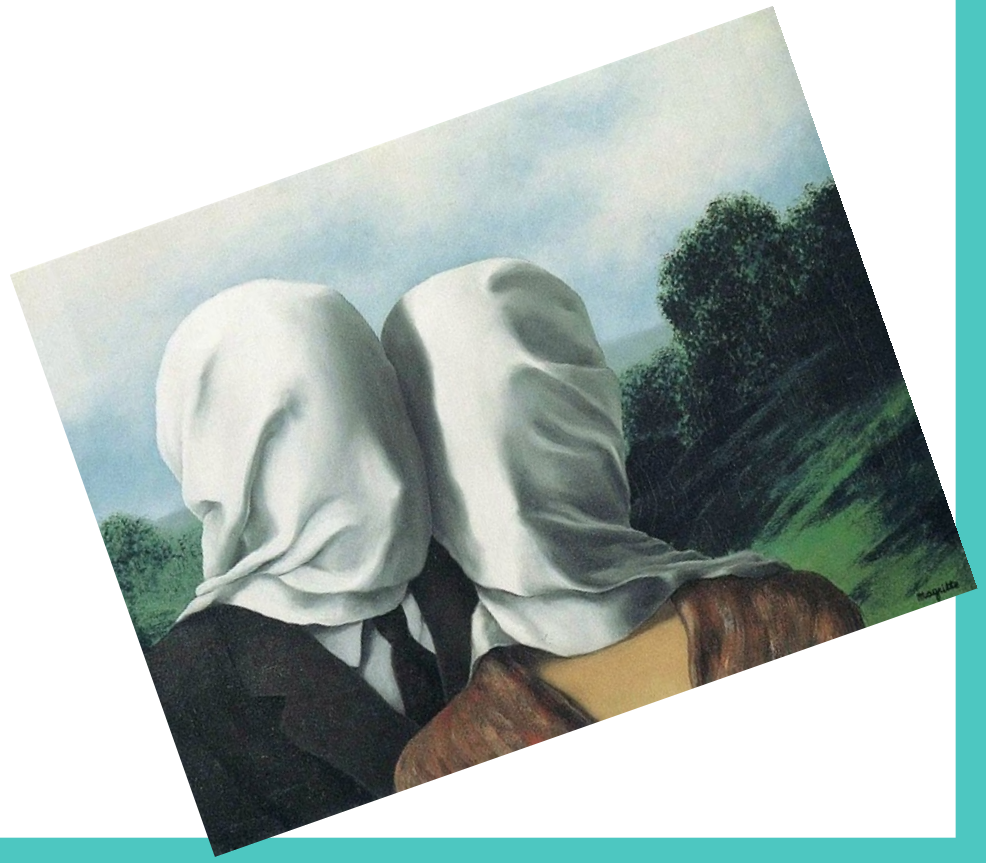
Ringraziamenti

Massimo Spedicato, Francesca Profeta, Sara Traini, Sara Capista, Alessandra Leone, Mariangela Iorio, Ottavio Portanti, Cristiano Palucci, Simone Pulsoni, Lilia Testa, Anna Serroni, Emanuela Rossi, Gisella Armillotta, Caterina Laguardia, Gianpaolo Foschini, Emiliano Creati, Barbara Bonfini, Tiziana Di Febo
Nicola D'Alterio, Giovanni Savini, Mauro Di Ventura, Alessio Lorusso, Maria Teresa Mercante

IZS
TERAMO

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

Grazie per l'attenzione

«A piece of bad news wrapped up in a protein»

Sir Peter Medawar (Nobel prize for Medicine 1960)