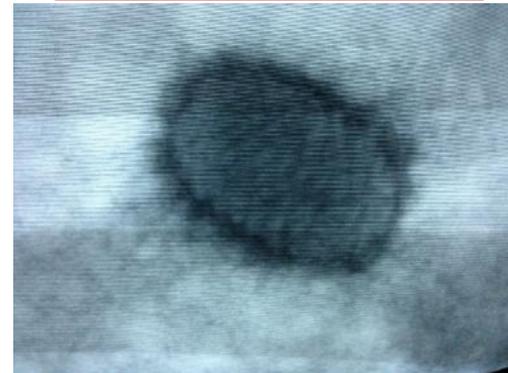


La Produzione di vaccini stabulogeni "Isolamento del virus Orf per la produzione del vaccino dell'Ectima"



Lesioni in cavità orale tipiche dell'Ectima
contagioso di pecore e capre (Foto UOT TC Siena)

Virus Orf - Parapoxvirus, 160 x 250 nm
(Foto al microscopio elettronico, DO Virologia)



Dott.ssa Giusy Cardeti UOC DO Virologia IZSLT Roma



Isolamento del virus Orf per la produzione del vaccino dell'Ectima

ECTIMA: malattia infettiva contagiosa esantematica delle pecore e delle capre
Agente eziologico: virus Orf (*Parapoxvirus ovis*)

- Colpisce particolarmente gli agnelli e i capretti -> mancata alimentazione e deperimento o morte (fino al 90%); soggetti non più adatti alla macellazione per il consumo
- interessamento anche degli adulti -> lesioni sui capezzoli e mastiti; gravi forme respiratorie e morte (fino al 24%)
- tarda primavera, tarda estate; pecore persistentemente infette? (Hosamani, 2009)
- trasmissibile all'uomo per contatto, malattia professionale (Dir 2003/99/CE)
- in Italia malattia endemica, vaccinazione vietata
- in Europa commercializzati due Vaccini a base di virus vivo attenuato

ECTHYBEL®

MedVet

Date de création : 08-11-2017
 Date de mise à jour : 08-11-2017

Informations et posologie

Especies cibles



Espèce cible complément
 Ovins et caprins.

Indications d'utilisation, spécifiant les espèces cibles

Chez les ovins et caprins :

- immunisation active contre l'ecthyma contagieux, uniquement en milieu infecté ou à risque.



Karki et al, 2019



Fig. 1. Global distribution of contagious ecthyma in different animals, including sheep and goats (grey areas)



**Proposta: preparare un VACCINO stabulogeno
a virus inattivato (D.M. 17/3/94 n° 287)**

- minori problematiche per l'Autorizzazione dal Ministero della Salute
- esclude l'eliminazione di virus vivo nell'ambiente
- di più rapida produzione e impiego al fine di tutelare la salute degli agnelli durante la loro breve vita prima della macellazione

Anno 2019

- Idea sviluppata da dott.ssa G.Perfetti Officina Farmaceutica Sezione di Siena e Direttore Sanitario sulla base di una consolidata esperienza di preparazione di vaccini stabulogeni di natura batterica
- Incontri, scambi di informazione per email e per telefono
- Possibile progetto di Ricerca corrente

Anno 2020

Obiettivo di Struttura DO Virologia:

[E1.1.1/19] Studio per presentazione domanda per la produzione vaccino Ectima contagioso

Piano attuativo:

[E1.1.1/19.1] 1) Verifica della letteratura scientifica 2) contatti ed intervista degli esperti del settore 3) valutazione dei sistemi per la produzione di virus ORF su substrati cellulari



1) Verifica della letteratura scientifica

Autore	Titolo	Rivista	Anno	Argomento
Anziliero D et al	Effects of inactivated parapoxvirus ovis on cellular and humoral events of the innate immune response in mice	J Med Biol Res	2014	Produzione Vaccino
D. Aarathi, K. Ananda Rao, R. Robinson, V.A. Srinivasan	Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine	Biologicals 32 (2004) 153e156. doi:10.1016/j.biologicals.2004.09.001	2004	Produzione Vaccino
Balaa JA, Balakrishnan KN, Abdullah AA, Mohamed R, Haron AW, Jesse FFA, Noordin MM, Mohd-Azmi ML	The re-emerging of orf virus infection: A call for surveillance, vaccination and effective control measures	Microbial Pathogenesis; 120: 55-63	2018	Review ORF
Bahnemann HG	Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine.	Vaccine. Aug;8(4):299-303. doi: 10.1016/0264-410x(90)90083-x	1990	Produzione Vaccino
Buddle BM, Pulford HD	Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus	Vet Microbiol 1984 Oct;9(6):515-522 doi: 10.1016/0378-1135(84)90013-0	1984	Vaccino Immune Response
Buddle BM, Dellers RW, Schurig GG	Contagious ecthyma virus-vaccination failures	Am J Vet Res. 45(2):263-266	1984	Vaccino Immune Response
Coradduzza E, Sanna D, Rocchigiani AM, Pintus D, Scarpa F, Scivoli R, Bechere R, Dettori MA, Montesu MA, Marras V, et al	Molecular Insights into the Genetic Variability of ORF Virus in a Mediterranean Region (Sardinia, Italy)	Life 2021, 11, 416. https://doi.org/10.3390/life11050416	2021	WGS
Coradduzza E, Sanna D, Scarpa F, Azzena I, Fiori M.S, Scivoli R, Rocchigiani A.M., Bechere R, Dettori M.A, Pintus D, et al.	A Deeper Insight into Evolutionary Patterns and Phylogenetic History of ORF Virus through the Whole Genome Sequencing of the First Italian Strains	Viruses 2022, 14, 1473. https://doi.org/10.3390/v14071473	2022	WGS
Freshney RI	Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique	Second Edition, Wiley-Liss Editor	1991	Colture cellulari
Friebe A, Friederichs S, Scholz K, Janssen U, Scholz C, Schlapp T, Mercer A, Siegling A, Volk HD, Weber O	Characterization of immunostimulatory components of orf virus (parapoxvirus ovis)	Journal of General Virology, 92: 1571–1584	2011	Immunocomponenti ORF
Galante D, Cafiero MA, Raelo DA, Pugliese N, Padalino I, Cavaliere N, Buonavoglia C	Identification and characterization of Orf viruses isolated from sheep and goats in Southern Italy	Veterinaria Italiana 55(4): 347-353	2019	Isolamento in CC
Gallina L, Dal Pozzo F, Mc Innes CJ, Cardeti G, Guercio A, Battilani M, Ciulli S, Scagliarini A	A real time PCR assay for the detection and quantification of orf virus	Journal of Virological Methods 134: 140–145	2006	Diagnosi molecolare

Autore	Titolo	Rivista	Anno
ATTIVITA' IMMUNOMODULANTE			
Fachinger V, Schlapp T, Strube W, Schmeer N, Saalmuller A	Poxvirus-Induced Immunostimulating Effects on Porcine Leukocytes	Journal of Virology. 74(17): 7943–7951	2000
Kruse & Weber	Selective Induction of Apoptosis in Antigen-Presenting Cells in Mice by Parapoxvirus ovis	Journal of Virology 75(10):4699-4704	2001
Weber et al	Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus	Journal of General Virology 84:1843-1852	2003
Friebe et al	Immunomodulatory Effects of Inactivated Parapoxvirus Ovis (Orf Virus) on Human Peripheral Immune Cells: Induction of Cytokine Secretion in Monocytes and Th1-Like Cells	Journal of Virology 78(17):9400-9411	2004
Fiebig et al	Inactivated Orf virus (Parapoxvirus ovis) Induces Antitumoral Activity in Transplantable Tumor Models	Anticancer Research 31:4185-4190	2011
DIAGNOSI SIEROLOGICA			
Bala JA, Balakrishnan KN, Abdullah AA, Adamu L, Bin Noorzahari BS, May LK, Mangga HK, Ghazali MT, Bin Mohamed R, Haron AW, Noordin MM, Mohd Lila MA	An association of Orf virus infection among sheep and goats with herd health programme in Terengganu state, eastern region of the peninsular Malaysia	BMC Veterinary Research 15:250. doi.org/10.1186/s12917-019-1999-1	2019
Bora M, Bora DP, Barman NN, Borah B, Das S	Seroprevalence of contagious ecthyma in goats of Assam: An analysis by indirect enzyme-linked immunosorbent assay	Veterinary World, 9(9): 1028-1033. doi: 10.14202/vetworld.2016.1028-1033	2016
Yogisharadhyia R, Kumar A, Bhanuprakash V, Shivachandra SB	Evaluation of a recombinant major envelope protein (F1L) based indirect-ELISA for sero-diagnosis of orf in sheep and goats	Journal of Virological Methods 261: 112–120113	2018
Al Saad KM, Thweni HT, Abdali DA, Tarik AS	Clinical and Diagnostic Studies of Contagious Ecthyma (ORF) In Sheep	IOSR Journal of Agriculture and Ve terinary Science 10(7): 64-69. DOI: 10.9790/2380-1007016469	2017

2) Intervista a colleghi esperti del settore

- prof.ssa Alessandra Scagliarini (Università di Bologna)
- dott.ssa Maria Teresa Mercante (IZS AM, Teramo)
- dott. Domenico Galante (IZS PB, Foggia)
- dott.ssa Monica Cagiola (IZS UM PG)
- dott. Gavino Marogna (IZS Sardegna, Sassari)
- Dr.ssa Chiara Emanuele IZS Sicilia, Palermo)
- dott.ssa Mariella Goria (IZS PLV, Torino)

Prof. A. Scagliarini: Orf ricorrente nei mungitori e macellatori, ovini e caprini della popolazione Musulmana più colpiti -> Aplotipi particolari e Tradizione predisponente (attività mattatoria a mani nude)

MALIGNITA': nei caprini già di per sé forma più grave; in Emilia ovini e caprini tutti infetti; spesso animali adulti immunodepressi per infezioni concomitanti (Visna Maedi, Pestivirus, Micoplasmi) + virus Orf attività immunomodulatrice -> forme cliniche molto gravi.

Dott.ssa M.T. Mercante (IZS AM) -> prodotto per qualche anno vaccino a virus vivo attenuato, mai registrato (Mercante et al, 2008); somministrato solo ai greggi sintomatici. Mai prodotto vaccino stabulogeno, redatto un foglietto illustrativo.

Dott.ssa M. Cagiola (IZS UM) -> negli anni 1998-2000, eseguiti esperimenti di "infezione controllata" mediante scarificazione o spennellamento sulla linea alba dell'agnello, con croste prelevate da soggetti della stessa azienda e risospese in soluzione fisiologica.

Dott. D. Galante (IZS PB) -> indagine sulla diffusione dell'infezione in Puglia e Basilicata tra il 2012 e 2014 (Galante et al, 2019): isolamento del virus ORF da croste su BHK21; identificazione mediante PCR (Kottaridi et al, 2006)



3) Valutazione dei sistemi per la produzione di virus ORF su substrati cellulari

Ricerca bibliografica per l'utilizzo di Colture Cellulari

Altri articoli su isolamento virus Orf:

Nettleton et al, 1996 → isolamento ceppo Orf su MDOK, Vero, PLT (Primary Lamb Testis)

Houssawi & Abu Elsein, 2000 → per isolamento n.2 pass su ST e poi coltivazione su Vero

Musser et al, 2008 → MDOK per isolamento e crescita ceppi Orf da capra e produzione di un vaccino per capre

Galante et al, 2019 → BHK21 congelate dopo 4 gg dall'inoculo; isolamento per tipizzazione dei ceppi circolanti

Wang et al, 2019 → studio della sensibilità di tre colture cellulari di origine bovina al virus Orf

Table 2. Data for cell cultures inoculated with the Pasarel isolate – time for appearance of the cytopathic effect, its strength and final cell culture titres

Cell cultures	Strength of cytopathic effect after inoculation												Titre, TCID ₅₀ /mL
	Days												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
ST	-	-	1+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	10 ⁴
SK	-	-	-	1+	1+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	10 ^{2.76}
RK	-	-	-	1+	2+	2+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	10 ^{3.73}
MDBK	-	-	1+	1+	1+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	10 ^{3.76}
BTR	-	-	-	-	-	1+	1+	2+	2+	3+	3+	4+	10 ^{2.33}
EBTR	-	-	-	-	1+	1+	2+	2+	3+	3+	4+	4+	10 ^{3.33}
FSK	-	-	-	1+	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+	4+	10 ^{3.5}
BHK 21	-	-	-	1-2+	2+	2+	3+	3+	4+	4+	4+	4+	10 ^{2.76}
SFT	-	-	-	1+	2+	2+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	10 ^{4.33}

Note: 1+ to 4+: strength of cytopathic effects. ST – sheep testis, SK – sheep kidney, RK – rabbit kidney, MDBK – Madin Darbi bovine kidney, BTR – bovine trachea, EBTR – embryonal bovine trachea, FSK – foetal sheep kidney, BHK 21 – baby hamster kidney, SFT – sheep foetal thymus.

Ivanov et al, BJVM 2016



4) Ricerca bibliografica sull'attività immunizzante del virus Orf e sui tipi di vaccino allestibili

Attività immunizzante del virus Orf (Bala et al, 2018):

- stimola la produzione di IgG (soprattutto IgG2) durevoli per 2-3 anni, più efficace però l'ICM a livello dermico
- virus ad elevata attività immunomodulatrice -> interagisce con il sistema immunitario e interferisce con la risposta infiammatoria dell'ospite tramite fattori di virulenza: viral VEGF e vIL10, IFN resistance, fattore inibitore del GM-CSF e dell'IL2) -> reinfezioni; possibile scarsa efficacia del vaccino.

VACCINO (1° vaccino sviluppato in Texas primi anni del 1900):

- a virus vivo (Hosamani et al, 2009)
- a virus coltivato, inattivato (Nettleton et al, 1996)
- a virus coltivato, vivo attenuato (inoculo x scarificazione -> formazione di croste che cadono -> anche se virus attenuato, aumento della carica virale infettante ambientale) (Mercante et al, 2008)
- subunità virale in VACV (Mercer et al, 1997) e a DNA (proteine chimeriche immunogeniche ORF 011 e 059) (Zhao et al, 2011)
- virus inattivato ad uso immunoterapeutico in altre spp animali (Weber et al, 2013)



PHENAX® CLASSIC

DESCRIPTION

Phenax® Classic is a vaccine for sheep and goats against scabby mouth (Orf virus). It is a live attenuated vaccine that provides long-lasting immunity.

INDICATIONS

Phenax® Classic is indicated for the prevention of scabby mouth in sheep and goats.

CONTRAINDICATIONS

Phenax® Classic should not be used in animals with severe immunodeficiency or in contact with other animals suffering from scabby mouth.

PRECAUTIONS

Phenax® Classic should be used in accordance with the instructions for use. It should be stored at 2-8°C and protected from light.

HOW TO USE

Phenax® Classic is administered by subcutaneous injection. The recommended dose is 1 ml per animal.

STORAGE

Phenax® Classic should be stored at 2-8°C and protected from light. The shelf life is 24 months.

PHARMACEUTICAL COMPANY

Phenax® Classic is manufactured by Virbac.

ZYLEXIS®
Parapox Ovis Virus Immunomodulator
Description



Vaccino STABULOGENO: lesioni virulente t.q., lesioni virulente inattivate, virus coltivato e inattivato -> uso mirato a proteggere gli agnelli nella fase di ingrasso.

Phenax® Classic
Vaccine for sheep and goats against scabby mouth



Progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute anno 2021
(IZS LT 11/21 RC)
“Studio preliminare per la produzione di un vaccino stabulogeno inattivato per
l'Ectima contagioso”

- Durata 24 mesi (inizio 29/12/21, prorogato al 29/12/24)
- Responsabile scientifico dott. G.Ragionieri
- n. 5 U.O. (Officina Farmaceutica Siena, DO Virologia, Osservatorio epidemiologico Toscana, Lab. Diagnostica di Grosseto, Lab. Diagnostica e Biologia molecolare di Siena)

Obiettivi:

a breve termine:

- valutare la capacità e l'efficienza di isolamento dei ceppi di campo del virus Orf in differenti tipi di colture cellulari
- produrre un vaccino stabulogeno a base di virus Orf inattivato
- redigere la relativa Linea Guida/Procedura Operativa Standard

a lungo termine:

- valutare l'innocuità e l'efficacia del vaccino stabulogeno prodotto somministrandolo ad agnelli e pecore gravide nell'allevamento di origine del ceppo Orf utilizzato
- allestimento di una ceppoteca
- sulla base dei risultati valutazione della possibilità di una progettazione di una linea di vaccini virali presso l'Officina Farmaceutica di Siena, UOT Toscana Sud



Studio preliminare per la produzione di un vaccino stabulogeno inattivato per l'Ectima contagioso

Principali attività del progetto

UOT Toscana Sud:

- Sopralluoghi, contatti con i veterinari, ricezione campioni (tutte le U.O.)
- Censimento allevamenti sedi di focolaio, indagini epidemiologiche (Osservatorio)
- Controlli di qualità sullo stock di virus vaccinale prodotto a Virologia (OF Siena)
- Esami diagnostici di supporto (Lab. Diagnostica GR e SI)

GESTIONE DEL FOCO LAIO

Trattamento e profilassi
Lesioni in cavità orali: trattare con una felle; seguenti soluzioni: permanganato di potassio all'1%, solfato di rame al 5%, emulsione di acido fenico al 3%, perossido di idrogeno al 3%.
Lesioni cutanee: utilizzare una soluzione al 1% di solfato di rame oppure unguento salicilico, pomate o spray antinfiammatori, glicerina iodata.
In latte non è consentita la vaccinazione con vaccini commerciali.

Cosa si deve/fare
1) Isolare gli individui malati dal resto del gregge e chiamare il Veterinario
2) procedere a pulizia e disinfezione di tutti gli utensili e dei locali frequentati dagli animali (conobio al 5% o permanganato di potassio 1%); se possibile evitare per almeno 2 anni i contatti con animali pascolanti in altri allevamenti.
3) prelevare le lesioni con guanti e inviare alla sede più vicina dell'IZS, per l'esecuzione degli esami di laboratorio, fornendo i propri contatti e le sede dell'allevamento.
4) comunicare la positività al servizio veterinario e al dipartimento di prevenzione.
5) in accordo con l'allevatore, è possibile inviare altro materiale patologico per avviare le procedure di adattamento sperimentale di un vaccino stabulogeno inattivato.

Gli esami sono gratuiti

LE SEDI

SEDE CENTRALE - Roma
Via Apollo Nuova, 1411 - 00178 Roma
Tel. 06 799991
e-mail: info@izs.it; PEC: info@izs.it

UOT LAZIO SUD - Latina
Strada Congiunta Destre snc - 04100
Tel. 0773 668960

UOT LAZIO NORD - Frosinone
Strada Terme - 01100
Tel. 0773 230147

UOT TOSCANA CENTRO - San Marino alla Palma (PI)
Via di Casalepisci - 50010
Tel. 0573 711523

UOT TOSCANA NORD - Pisa
S.S. dell'Abbatino e del Traversaro, 4 - 56123
Tel. 050 558563

UOT TOSCANA SUD - Grosseto
Viale Europa, 30 - 58100
Tel. 0564 456248

UOT TOSCANA SUD - Siena
Viale Tevere, 12 - 53100
Tel. 0577 41352

UOT TOSCANA NORD - Pisa
S.S. dell'Abbatino e del Traversaro, 4 - 56123
Tel. 050 558563

ECTIMA CONTAGIOSO DEGLI OVINI E DEI CAPRINI

MALATTIA DIAGNOSI GESTIONE

UOT Toscana Sud
Scheda raccolta informazioni

Data compilazione: _____ Cognome e nome: _____ Indirizzo: _____ Città: _____	
Informazioni generali sull'allevamento Proprietà/destinazione: _____ Indirizzo: _____ Comune: _____ Prov. _____	
Informazioni sui capi allevati Numero ovini/capri: _____ Sesso: _____ Numero capi/lotto: _____ Rapporto Inallevato ad Allevato (N/A) _____ Acquisto capi (lotto): _____ da: (Paese) (U.S.) (N) da allevamento (Paese) (U.S.) (N) specie e numero/origine/presenza di capi acquistati: _____	
Informazioni sulla gestione e sull'allevamento dei capi Tipo di allevamento: (S) Stabulazione (M) Mista Allevamento: (S) Tradizionale (M) Moderno (S) Intensivo (C) Altro _____ Tipo di focolaio: (S) Focolaio (M) Mista (S) Intensivo (C) Altro _____ Se gli animali sono di proprietà di un: _____ Diagnostico: (S) Sì (N) No se è indicato il numero dell'anno: _____ Tipo di allevamento: (S) Sì (N) No Vigente: (S) Sì (N) No Intervento: (S) Sì (N) No	

DO Virologia:

- Diagnosi di Ectima su lesioni sospette prelevate in allevamento o al macello o in sede autoptica
- Isolamento del virus Orf in coltura cellulare primaria
- Produzione di stock virale su linea cellulare continua
- Inattivazione (calore; BEI) e verifica dell'inattivazione (Cinetica, inoculo di CC)
- Verifica della conservazione dell'immunogenicità (morfologia in ME)

Protocollo vaccino stabulogeno a virus coltivato e inattivato

- 1) In base ai risultati della ricerca bibliografica, acquisizione di colture cellulari primarie per l'isolamento del virus Orf a partire da materiale patologico e di linee continue per la produzione dello stock virale
- 2) Lettura della Farmacopea europea per la messa a punto dei saggi di controllo richiesti nelle varie fasi della produzione di vaccino stabulogeno
- 3) Contattati i colleghi dell'IZSLER Brescia, Lab. Produzione Vaccini (produzione un vaccino stabulogeno inattivato di EMCV coltivato su BHK21)

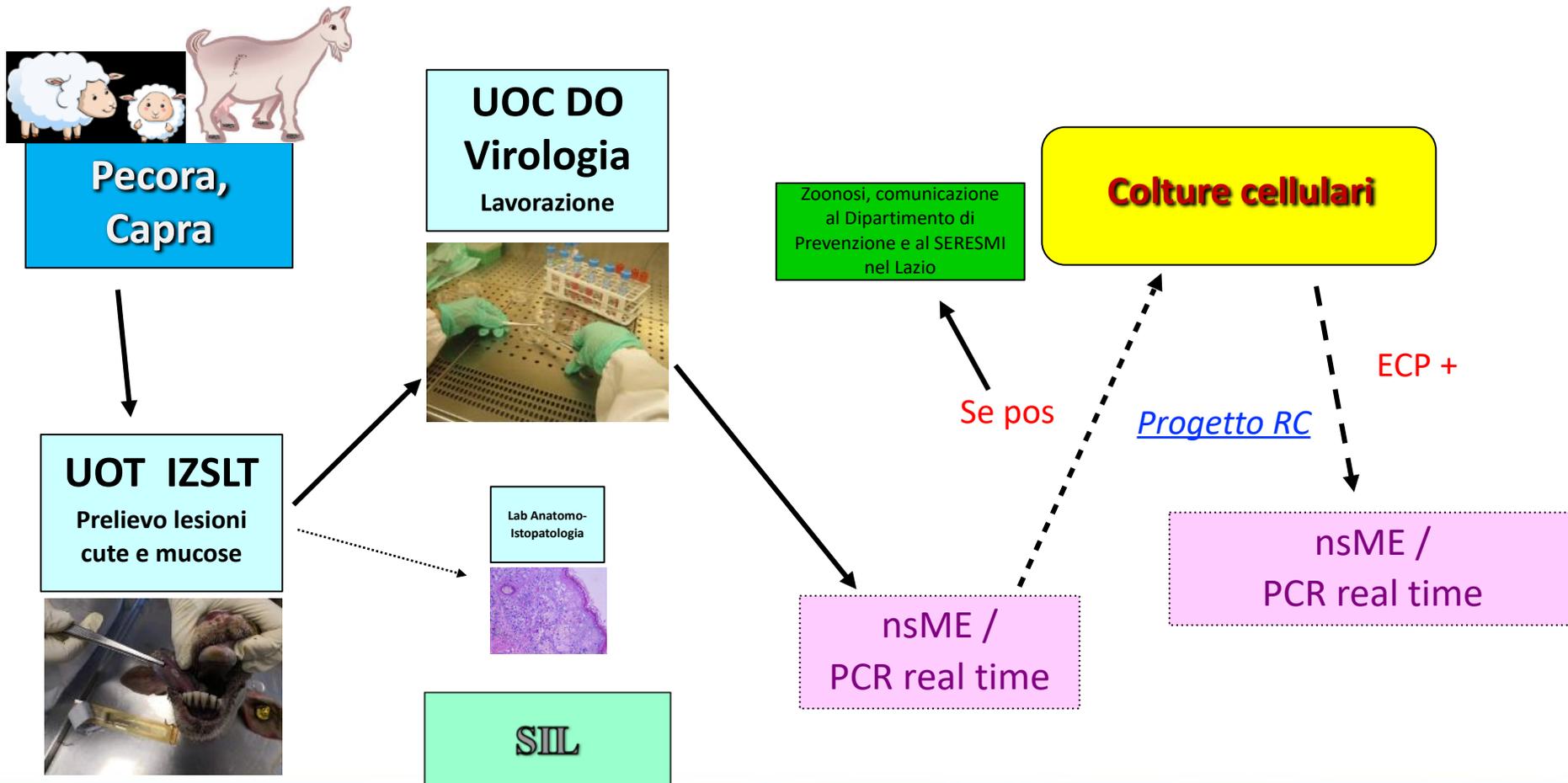
Messa a punto dei seguenti protocolli di lavoro per:

- prelievo lesioni sospette
- prelievo, conservazione, trasporto testicoli per coltura primaria
- isolamento e produzione di colture primarie e di virus
- saggi di controllo sui reagenti e prodotti
- inattivazione del virus e verifica dell'avvenuto processo



Flusso diagnostico per Diagnosi Ectima contagioso pecore e capre e per isolamento virus Orf

Foto IZSLT



Campioni di cute o mucosa con lesioni tipiche

Redazione di un protocollo di prelievo, conservazione e trasporto del campione dall'allevamento al laboratorio



Foto IZSLT DO Virologia

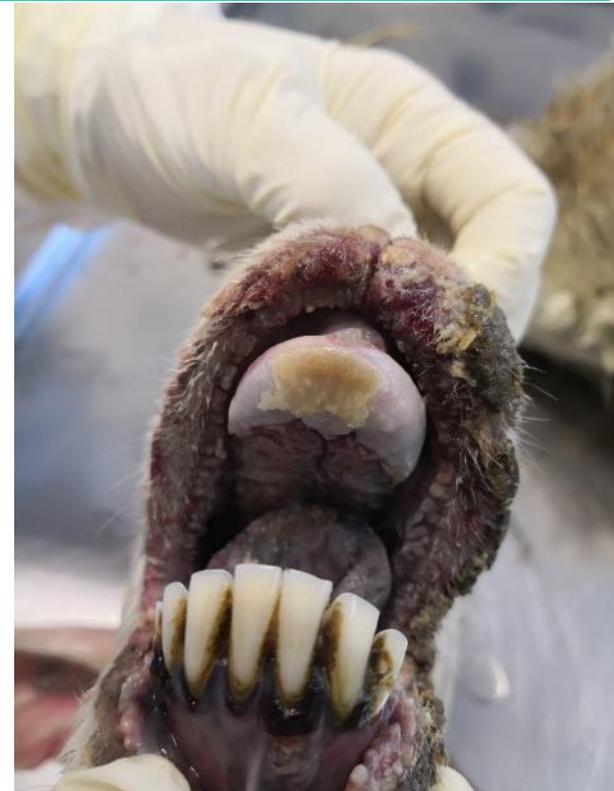


Foto IZSLT UOT TS Siena

Diagnosi di Ectima contagioso:

- nsME metodo goccia (POS DMV 009 INT)
- PCR real time (protocollo standardizzato nell'ambito del progetto di ricerca corrente: Gallina et al, 2006)



In giornata -> Osservazione al Microscopio Elettronico a Trasmissione metodo goccia

- Preparazione campione (lesioni su cute e mucose): omogenizzazione senza quarzo in acqua grado reagente e colorazione negativa
- Osservazione al TEM a 22.000x, 80 kV
- Tempo di diagnosi: rapido (circa 3 ore) + Diagnosi Differenziale con BT, BoHV2, CaPV, FMDV.



Immagini al TEM: particelle riferibili a Parapoxvirus
(Foto IZSLT, DO Virologia)



TEM Philips EM 208,
IZSLT, Roma



Isolamento del virus Orf in Coltura Cellulare (1)

Attività 2019-2020 preparatoria al progetto di RC: prove di coltivazione su **BHK₂₁** e **MDBK** -> inconcludenti

- Selezionati 8 campioni (2016-2018-2019-2020)
- Inoculo su BHK₂₁ e MDBK
- Eseguiti 5 passaggi -> no ECP

Problemi dovuti a:

- difficoltà a crescere in coltura dei poxvirus in generale (titoli bassi) e dei parapoxvirus in particolare (ceppi che si adattano in maniera diversa alla crescita in CC)
- effetto citotossico al primo passaggio (tipo di matrice di partenza)
- adattamento della cellula alla presenza del virus per la sua capacità di produrre molecole immunomodulatrici
- basso titolo virale

- Ripetere su coltura primaria
- Ordinate c/o Biobanca IBVR n.2 Colt.Primarie e virus Orf Ceppo NZ₂ di referenza



Isolamento del virus Orf in Coltura Cellulare (2)

Ricerca bibliografica -> (Wang et al, 2019)
preparazione di CC primarie a partire da
testicolo di agnello (PTA):

- Stesura protocollo di campionamento/conservazione/
trasporto testicoli di agnello da cui produrre le
colture primarie per l'isolamento del virus.
- Stesura protocollo di preparazione della PTA
- Farmacopea europea: messa a punto dei saggi di
controllo sulla *semenza cellulare primaria (SCP)*

Wang et al. BMC Veterinary Research (2019) 13:13
https://doi.org/10.1186/s12917-018-1066-1

BMC Veterinary Research

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Comparison of the sensitivity of three cell cultures to ORFV



Guangxiang Wang^{1,2,3}, Yanhua Wang^{1,3}, Boqiang Wang^{1,2,3}, Minmin Li^{1,2,3}, Jijun Wu^{1,2,3}, Yan Chen^{1,2,3}, Kangzuo Liu^{1,2,3}, Youjun Shang^{1,2,3} and Zhidong Zheng^{1,2,3*}



PROTOCOLLO PER IL PRELIEVO AL MATTATOIO DI TESTICOLI DI AGNELLO, DA UTILIZZARE PER L'ISOLAMENTO DI COLTURE CELLULARI PRIMARIE

Premessa: individuare (DE Toscana) allevamenti ovini con animali di genotipo resistente alla Scrapie (ARR), al fine di effettuare il prelievo dei testicoli ad agnelli figli di riproduttori con genotipo resistente. (Qualora possibile, escludere allevamenti con storia positiva per Prionovirus).

Gli animali selezionati dovranno avere al massimo 3 mesi di età ed essere in buono stato di salute.

Al fine di confermare che il soggetto scelto è genotipicamente resistente alla Scrapie, prelevare sangue con anticoagulante e inviare alla UDC ID Veterinaria per la prova di genotipizzazione.

I testicoli dovranno essere prelevati dall'animale macellato in condizioni di massima igiene possibile, utilizzando forbici, pinze, bilucchi ecc. sterili.

Procedere come segue:

- asportare gli scroti e deponerli in piastre petri fornite di IZSLT
- lavare con abbondante alcool o altro disinfettante la superficie dello scroto
- tagliare la cute e tenere i lembi ben aperti: usando un nuovo paio di pinze, forbici e/o bisturi sterili (da cambiare per ogni testicolo) prelevare il testicolo senza tagliare la capsula che lo avvolge
- trasferire ogni testicolo in provetta tipo Falcon, meglio se contenente terreno di trasporto ambiente (torrione del laboratorio)
- refrigerare immediatamente (temperatura tra +4°C e +6°C, MAI CONGELARE) e inviare assieme al campione di sangue, al Laboratorio presso la sede centrale di Roma entro 24 ore dal prelievo
- Compilare scheda di accompagnamento campione (Modulo PG ACC 001/L), indicando razza ed età del soggetto

Contatti: Tel 06/79099362 Laboratorio colture cellulari, dott.ssa Katia Barbero; tel. 06/79099316 Laboratorio isolamento ceppi virali, dott.ssa Giuseppina Cardesi

Primarie di Testicolo di Agnello - PTA

n.2 testicoli agnello Ndr SIL.....

Agnello: razza, età ... gg; Codice Aziendale

Data Prelievo/...../.....

Data Lavorazione/...../.....

Terreni (20 ml in fiasca 75 cm² - M; 50 ml in fiasca 225 cm² - G):

- Crescita -> DMEM + 10% SFB + 1% Na Piruvato + 1% aa NE + 1% PSF
- Mantenimento -> DMEM + 2% SFB + 1% Na Piruvato + 1% aa NE + 1% PSF
- Congelamento -> SFB + DMSO 10%
- Lavaggi durante la procedura -> PBS x TC + PSF 1%

Reagenti per Preparazione Coltura Primaria

- Soluzione di Tripsina-EDTA
- Soluzione Tampone Fosfato (PBS x TC)
- Soluzione antibiotata e antifungina (100 UI/ml Penicillina, 100 µg/ml Streptomicina, , 2 ug/ml Anfotericina B - PSF)

- In piastra petri sterile, con forbici e pinze allontanare le tonache testicolari che rivestono testicolo ed epididimo
- allontanare per quanto possibile la capsula del testicolo e sminuzzare il parenchima (circa 30 grammi)
- sospendere il tessuto frammentato ottenuto, in una provetta tipo Falcon contenente 20 ml di TV
- incubare a 37 °C agitando la provetta ogni 15 minuti circa, per 2 h
- centrifugare ad 800x g per 10'
- allontanare il surnatante ed aggiungere 25 ml di PBS x TC, risospesendo più uniformemente possibile i frammenti/cellule del pellet
- centrifugare ad 800x g per 10'
- effettuare un altro lavaggio con PBS x TC (in totale n.2)
- dopo la centrifugazione, eliminare il surnatante, risospesendo il pellet in 50 ml di terreno di crescita e distribuire in una fiasca G (in genere 1 per testicolo)
- incubare a 37 °C con 5% di CO₂
- osservare quotidianamente il monostrato (morfologia e % di confluenza) al microscopio ottico invertito (con e senza contrasto di fase)
- preparare successive subcolture per ottenere uno stock di coltura cellulare primaria a basso numero di passaggi da congelare in vapori di azoto

Protocollo Preparazione di colture cellulari primarie a partire da testicolo di agnello (PTA)



Foto IZSLT, DO Virologia

Studi preliminari al progetto RC
(2021): prodotti n. 3 Lotti



Coltura cellulare primaria di testicolo di agnello (PTA)

Farmacopea europea cap. 5.2.4 e 5.2.8:
coltura cellulare di isolamento del virus ->
semenza cellulare primaria (SCP) su cui è
richiesta l'esecuzione di saggi di controllo

Attività svolta:

- messa a punto dei saggi di controllo sulla SCP
- stesura di una specifica IL (IL DMV 035 in pubblicazione)
- esecuzione dei Saggi di controllo con esito favorevole su 3 lotti di PTA prodotti nel 2022

N.B. secondo FE cap. 5.2.5, previsti controlli anche sulle sostanze di origine animale come SFB e TV: 1) origine; 2) Lotto omogeneo; 3) sterilizzazione. Verifica delle informazioni riferite dalla ditta produttrice.

Tabella 5.2.4-1. - Stadi di sviluppo delle colture cellulari ai quali devono essere effettuati i saggi.

	Semenza cellulare primaria	Semenza cellulare di lavoro	Cellule derivate dalla semenza cellulare di lavoro al più alto livello di passaggio
Microscopia generale	+	+	+
Batteri e funghi	+	+	-
Micoplasm	+	+	-
Virus	+	+	-
Identificazione della specie	+	-	+
Cariotipo	+	-	+
Tumorigenicità	+	-	-



DIREZIONE DI LAVORO SAGGI DI CONTROLLO SU COLTURE CELLULARI, REAGENTI, CEPO VIRUS ORF

no.	area di provenienza	sedimento incubato	verifica sierologica e coltura in cellule a proliferazione rapida	approvazione responsabile di struttura
1	Italia/Italia	Italy control	Italy control	Italia ricerca IZS

Decisione del tecnico della struttura: []
 Data e posto dei saggi di controllo come richiesto dalla farmacia europea e verifica della qualità dei reagenti utilizzati nella produzione del virus vaccinale (ICS (MAY/000/197))



Protocollo per isolamento in coltura cellulare (CC) (1)

Preparazione omogenato per inoculo su CC:

- omogenizzare la lesione su cute-mucosa (pos in ME/PCR), sminuzzando in mortaio con quarzo in 1:10 p/v di MEM 199 + PSF 5x)
- centrifugare a 3000x g x 5' (se osservati batteri al ME, filtrare con filtri 0,45 μ)
- incubare overnight a +4 °C per contatto con antibiotici/antifungini



Foto IZSLT, DO Virologia



Protocollo per isolamento in coltura cellulare (CC) (2)

Inoculo CC per isolamento:

- Inoculo su PTA splittate (1:1,2/1,5) 24 h prima in piastra multiwell (includere controllo positivo* e controllo negativo)
- osservare quotidianamente al microscopio ottico invertito
- in presenza di ECT dopo 24 h o in assenza di ECP dopo 7 gg: eseguire una subcoltura; se no ECP dopo 7-10 gg, virus non isolabile
- in presenza di ECP (cellule arrotondate di > volume, diradamento tappeto, ponti citoplasmatici intercellulari) -> congelare quando ECP 80%
- eseguire una subcoltura per aumentare il titolo virale -> **LSPV**

***ACQUISTATO CEPPO VIRALE di
referenza Virus ORF NZ-2 e
adattato su 3 CC**

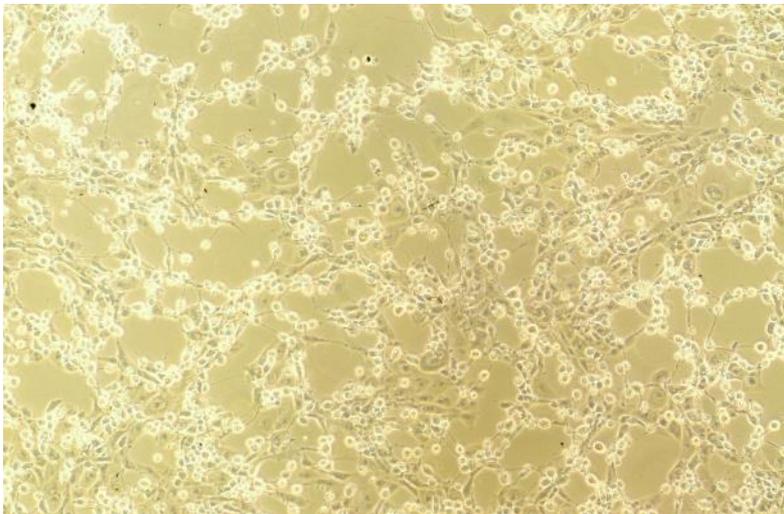
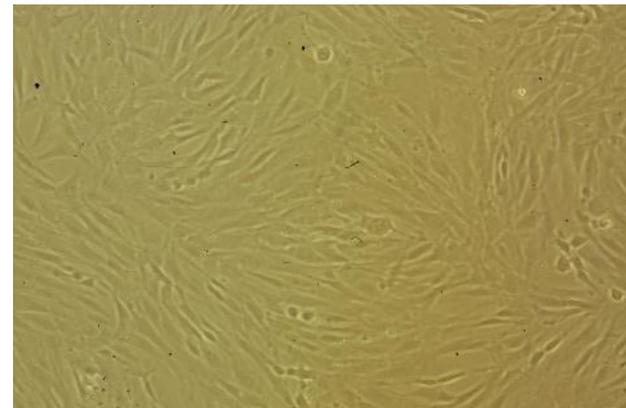


- **SCP = Sheep Choroid Plexus**
- **PTA = Primarie di Testicolo di Agnello**
- **MDBK = Madin Derby Bovine Kidney**



EFFETTO CITOPATICO del ceppo ORF NZ-2 su coltura primaria SCP

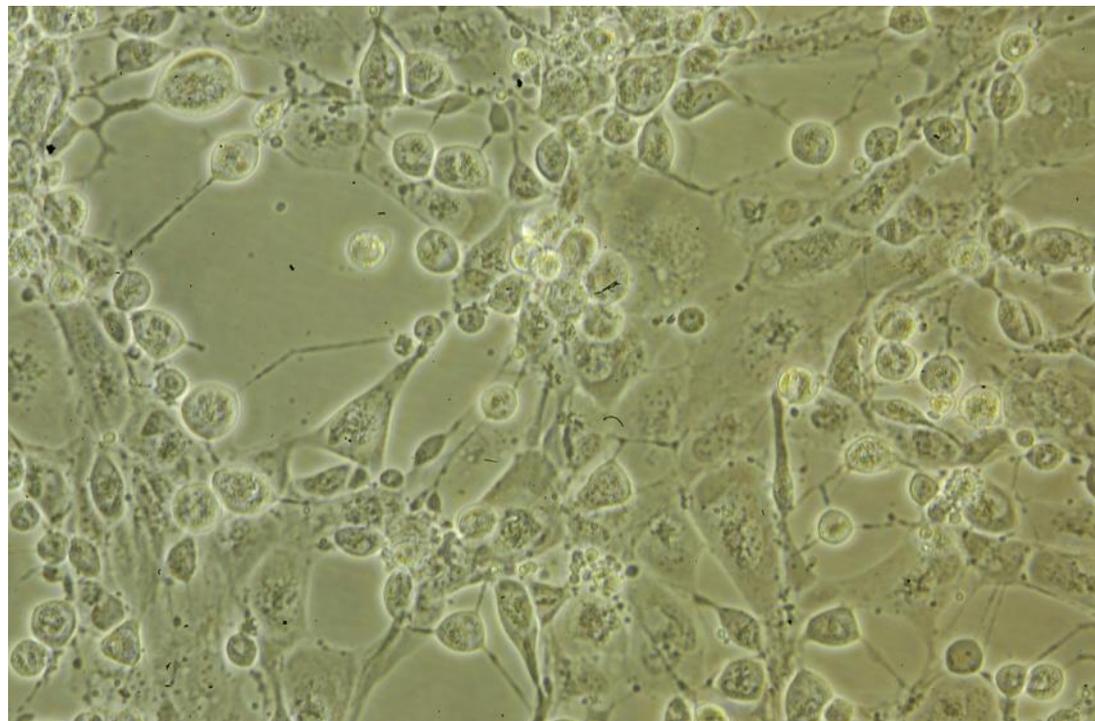
SCP non
inoculate - 10x



ECP 10x

Foto IZSLT, DO Virologia

ECP 40x



ECP di campioni diagnostici inoculati su CC

Comparsa in 3a – 4a giornata dall'inoculo

SCP

PTA

non inoculate
10x-4x

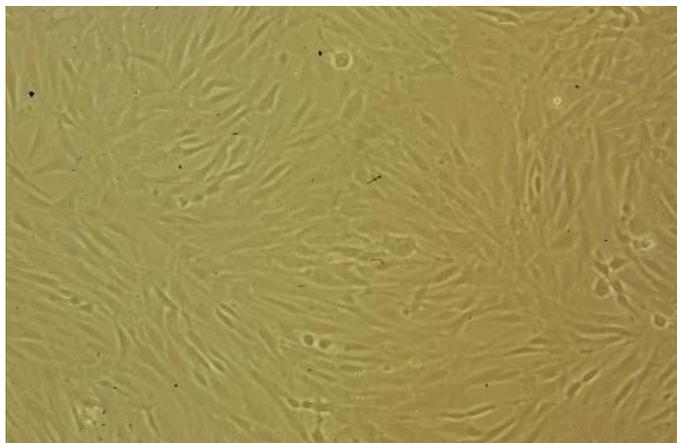
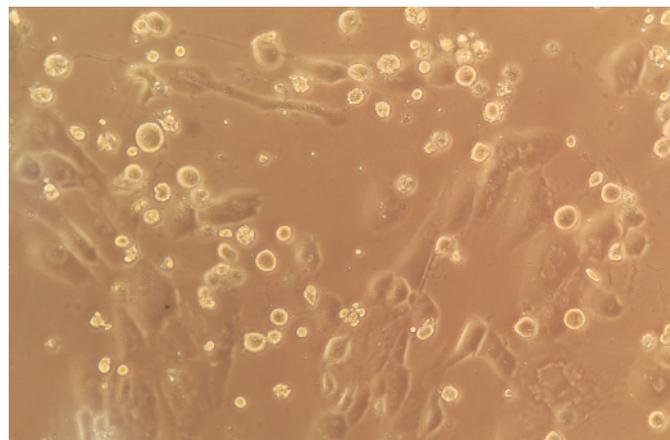
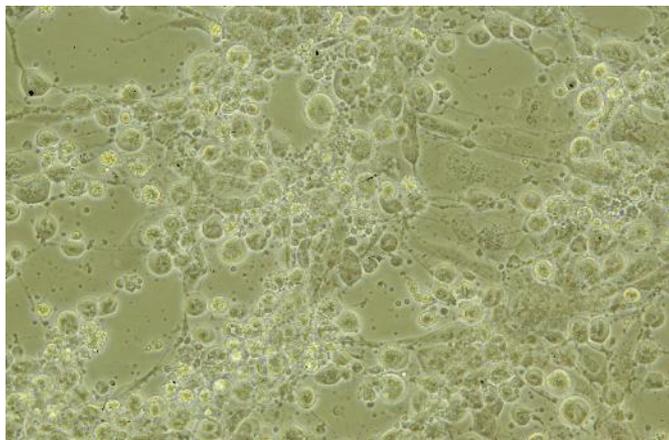


Foto IZSLT, DO Virologia

ECP
20x



Saggi di controllo secondo Farmacopea Europea 2018, Monografia 0062 cap.2.1.3.2 sul *Lotto di Semenza Primaria del Virus*:

- Identificazione del ceppo di virus Orf (nsME e PCR real time)
- verifica contaminazione da batteri, funghi, micoplasmi
- assenza di virus avventizi mediante due subcolture su:
 1. colture primarie di ovino (specie di origine del virus) (per es. primarie di testicolo di agnello)
 2. colture sensibili ai virus patogeni per gli ovini (specie a cui è destinato il vaccino) (MDBK, SCP)
 3. colture cellulari sensibili ai pestivirus (BVDV e BDV) (MDBK BVD-free)

Ad esito favorevole di tutti i saggi di controllo previsti:

- Titolazione in micrometodo (secondo “Protocollo OPV-CPXV” -> lettura in 4a-5a giornata)
- conservazione di un'aliquota del ceppo nei vapori di azoto
- adattamento e coltivazione su SCL (Produzione virus vaccinale)



Available online at www.elsevier.com/locate/jvirol
SCIENCE@DIRECT®
 Journal of Virological Methods 131 (2006) 180–185



A real time PCR assay for the detection and quantification of orf virus

L. Gallina^a, F. Dal Pozzo^a, C.J. Mc Innes^b, G. Cardeti^a, A. Guccio^a, M. Battilani^a, S. Ciulli^a, A. Scagliarini^{a,*}

^a Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum, Bologna, Italy

^b Institute of Virology, University of Liverpool, Leahurst, Neston, Merseyside L69 7GB, United Kingdom, Liverpool, UK

^c Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana, Via della Ricerca 107, 00178 Roma, Italy

^d Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Via Marconi 6, 90129 Palermo, Italy

Received 6 September 2005; received in revised form 12 December 2005; accepted 10 December 2005

Available online 21 January 2006

IL DMV 035



ISTRUZIONE DI LAVORO SAGGI DI CONTROLLO SU COLTURE CELLULARI, REAGENTI, CEPO VIBRUS ORF

ANNO	USO DI	INDICAZIONE	VERIFICA	RESPONSABILITÀ
0	INDICAZIONE	INDICAZIONE	VERIFICA	RESPONSABILITÀ

Descrizione del metodo della
 riduzione

Questo è parte dei saggi di controllo come richiesto dalla Farmacopea europea e verifica della qualità dei reagenti utilizzati nella produzione del virus vaccinale (PVS) (MVA/000/007)



Preparazione stock su *Semenza Cellulare di Lavoro (SCL)* (1)

Saggi di controllo sulla SCL e SCL-ALP sec. Farmacopea Europea Tab. 5.2.4-1, cap. 5.2.4 e 5.2.8:

Non eseguiti per i seguenti motivi:

- eseguiti dalla biobanca distributrice
- manipolazione della SCL utilizzando apparecchiature e reagenti dedicati
- coltivazione dell’LSPV per massimo due passaggi sulla SCL: l’esecuzione di meno di tre subcolture garantisce che la SCL non acquisisca le caratteristiche di SCL-ALP

Tabella 5.2.4.-1. - *Stadi di sviluppo delle colture cellulari ai quali devono essere effettuati i saggi.*

	Semenza cellulare primaria	Semenza cellulare di lavoro	Cellule derivate dalla semenza cellulare di lavoro al più alto livello di passaggio
Microscopia generale	+	+	+
Batteri e funghi	+	+	-
Micoplasm	+	+	-
Virus	+	+	-
Identificazione della specie	+	-	+
Cariotipo	+	-	+
Tumorigenicità	+	-	-

IL DMV 035

 Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri
 SOCIO VERDESSA
 IL DMV 035
 STRUTTURA DI UN DMV IN CONDIZIONI DI COLTURA CELLULARE, INSEMI, COPPIE, TERZIARI pag. 3 di 4

RINSECCO DI LAVORO SANI IN CONDIZIONI DI COLTURA CELLULARE, INSEMI, COPPIE, TERZIARI

N°	Dati di anidazione	Indirizzo/Località/Contatto	Particolarità/Note e informazioni relative all'attività	Tipi di attività/Iniziativa di controllo
1	INDIVIDUA	Contatto	Contatto	Attività di controllo

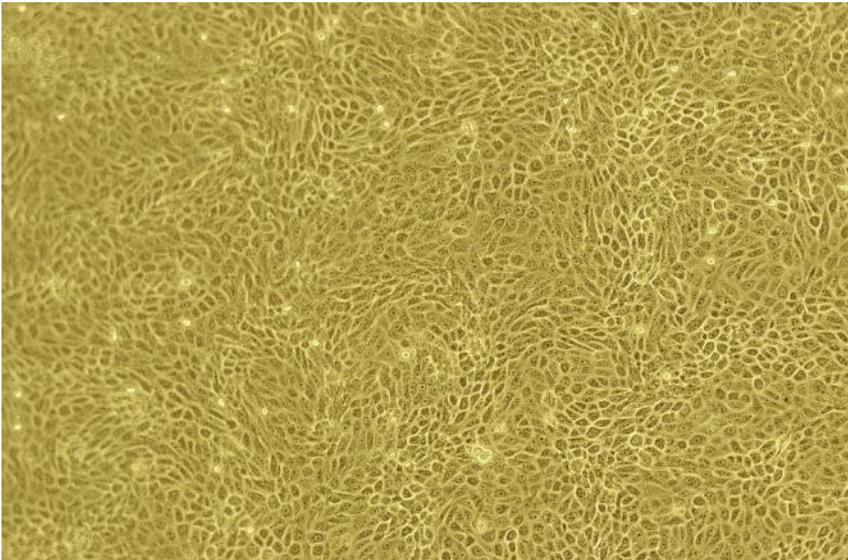
DESCRIZIONE DEL METODO DI LAVORO: In base a serie di saggi di controllo con ricorso alla semenza primaria e alla SCL, si valutano le caratteristiche di lavoro delle SCL in base alla loro attività.



Coltivazione dell'LSPV su SCL -> MDBK-BVD free:

- Almeno due passaggi in fiasche da 225 cm²
- Titolazione in micrometodo dello stock virale ottenuto

MDBK non inoculate - 10x



ECP su MDBK - 3 gg - 20x

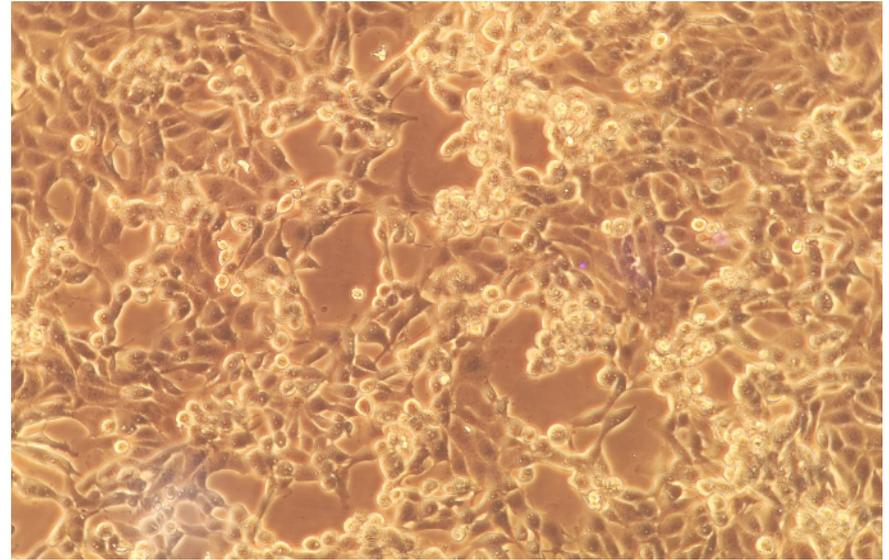


Foto IZSLT, DO Virologia



Inattivazione dello stock virale prodotto in MDBK

Protocollo di inattivazione (adattato da Bahnemann, 1990 e Aarthi et al, 2004)

- Preparazione dei reagenti BEI (binary ethylenimine) e NaTiosolfato
- centrifugare la sospensione virale a $2.000 \times g \times 10'$ e filtrare con filtro $0,45\mu$
- aggiungere BEI 0,1 M alla concentrazione finale del 3% (T0)
- eseguire n.3 prelievi a distanza di 1,5h – 4h - 6h dal T0 e aggiungere NaTiosolfato al 10% sul volume finale restante
- lasciare in agitazione a $26^\circ\text{C} \times 24 \text{ h}$ e cambiare recipiente
- a 48 h (termine processo di inattivazione) aggiungere NaTiosolfato 10% e agitare x 15' a 26°C
- Verifica del NaTiosolfato residuo (FE Monografia 0062, cap. 2.1.4.2; IL DMV 036 in pubblicazione)

Verifica dell'avvenuta Inattivazione

- Titolazione in micrometodo del virus per lo studio della cinetica di inattivazione -> retta di regressione lineare con $r \leq -0,90$
- almeno due passaggi di 7 gg ciascuno su MDBK per verificare l'assenza di virus infettante -> risultato favorevole se assenza di ECP
- controllo al TEM della morfologia del virus indice di immunogenicità conservata

IL DMV 036



ISTRUZIONE DI LAVORO INVESTITORE DEL SOGGERO TROPICALI RELATIVO IN UNA SOSPENSIONE VIRALE INATTIVATA CON BEI

Rev.	Data di emissione:	Revisione richiesta:	Verifica obbligatoria o collaborazione esterno professionista esterno	Approvazione responsabile di struttura
1	11/01/2014	Analisi ulteriori e modifiche minori	5 Controlli	Dr. C. Luciani

Descrizione della modifica richiesta dalla revisione:
 Inserire a punto del metodo richiesto dalla riepilogazione europea e verifica per l'eventuale inattivazione con BEI della sospensione virale

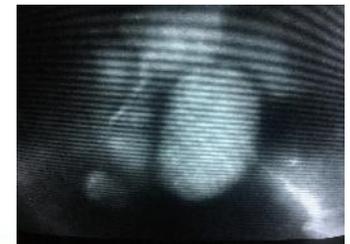
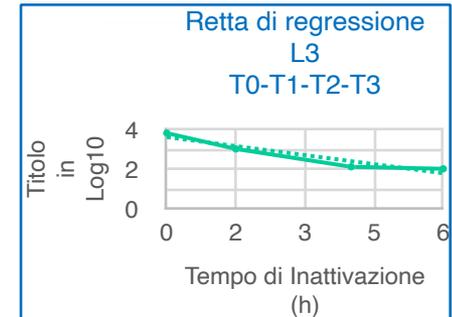


Foto IZSLT,
DO Virologia

Documentazione e Invio Lotto alla Officina Farmaceutica

Virus vaccinale prodotto

- Identificazione con numero di Lotto
- invio alla Officina Farmaceutica, UOT Toscana Centro Siena

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri
VIA S. GIOVANNI BATTISTA, 131 - 00144 ROMA

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO Sperimentale F.lli LANCINI DELLA TOSCANA M. Aleandri
STOCK VIRUS OSE (MATTIATO) MODULO INVIO AL LABORATORIO OFFICINA FARMACEUTICA SEZIONE DI SIENA

N° DI SELEZIONE: _____ FORNITORE: _____

RECHERCHER SEZ. NOM. LA PRIMA UNITA' DI UN STABILIMENTO COMPARTITO: _____

CIPIPO LA: VIRUS OSE

SPECIE ANIMALE: OVINO

VACCINO RICHIESTO: SCITINA CONTRO LA OVAE E CAPRINI

QUANTITA' TOTALE INVIATA IN MI: _____

TITOLO DELLO STOCK DI VIRUS OSE: _____

DATA: 26/05/04 FIRMA: _____

Presso l'Officina Farmaceutica

- Controlli di sterilità
- controllo delle endotossine batteriche (LAL test)

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO Sperimentale F.lli LANCINI DELLA TOSCANA M. Aleandri LABORATORIO REGIONALE FARMACEUTICA SEZIONE DI SIENA		STAMPATA PER TELECOM PARTI DI FARMACODIAGNOSI PAG. 02/02
ENTRATA	Data Minicarta: 28/03/2003 Lotto N°: 81/2003	Codice Pagina: 01895 Pagina Contabile Officina Farmaceutica
ACCETTAZIONE	Prodotto: Vaccino E. Colera Infanzia L11101 Materiale: 100 CUBI QUOTI CORRETTI AL 20030504/04/03	Sperimentale per Verifica Interna
CONTROLLO DI FORTIFICAZIONE	Data Controllo: 28/03/03 Operatore 1: Pascucci Operatore 2: Mammucari	Lotto Testato AG: 200302 Lotto Testato OB: 200302 Lotto Testato TMA: 200304 Lotto Testato TMA: 200304 Lotto Testato OSE: 200304
VERIFICA CONTROLO DI AUTENTICAZIONE E QUALITÀ	Data Verifica: 28/03/03 Operatore 1: Pascucci Operatore 2: Pascucci	Probe Infanzia AG: NEGATIVO Probe Infanzia OB: NEGATIVO Probe Infanzia TMA: NEGATIVO Probe Infanzia OSE: NEGATIVO
LETTERE SANCIONATE	Data Letture: 09/04/03 Operatore 1: Pascucci Operatore 2: Pascucci	Cala Miliari SE: NEGATIVO - 03040303
IMBOTTIGLIAMENTO		Risultati da 100 ml di Risultati da 200 ml di Risultati da 500 ml di
CONTROLLO DI AUTENTICAZIONE FINITO	Data Controllo: 31/03/2003 Operatore 1: Pascucci Operatore 2: non iscritto	PL 101: OK Ampere: OK Quantità Microbiologica: FAVORITIVO LAL Test: <i>Limulus a 500 ml di</i>
VALUTAZIONE	Data Valutazione: 01/04/03 Valutatore: Pascucci	Stato Autenticazione: SI
ALTRI DATI	Isola di provenienza: 030 motivo di provenienza: Vaccino Iniezione	
NOTE		

Ricerca dell'endotossina (LPS) mediante LAL-test

- Il *Limulus Amoebocyte Lysate test* ha sostituito la prova di pirogenicità nel coniglio (molto più sensibile)



<https://slideplayer.it/slide/1004666/>



Flusso attività per la produzione di virus vaccinale Orf a base di virus coltivato e inattivato

POS DMV 012 INT rev.0
in pubblicazione

MECC 018 del 24/06/2022

IZS Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Alleardi

UOCC DO VIROLOGIA

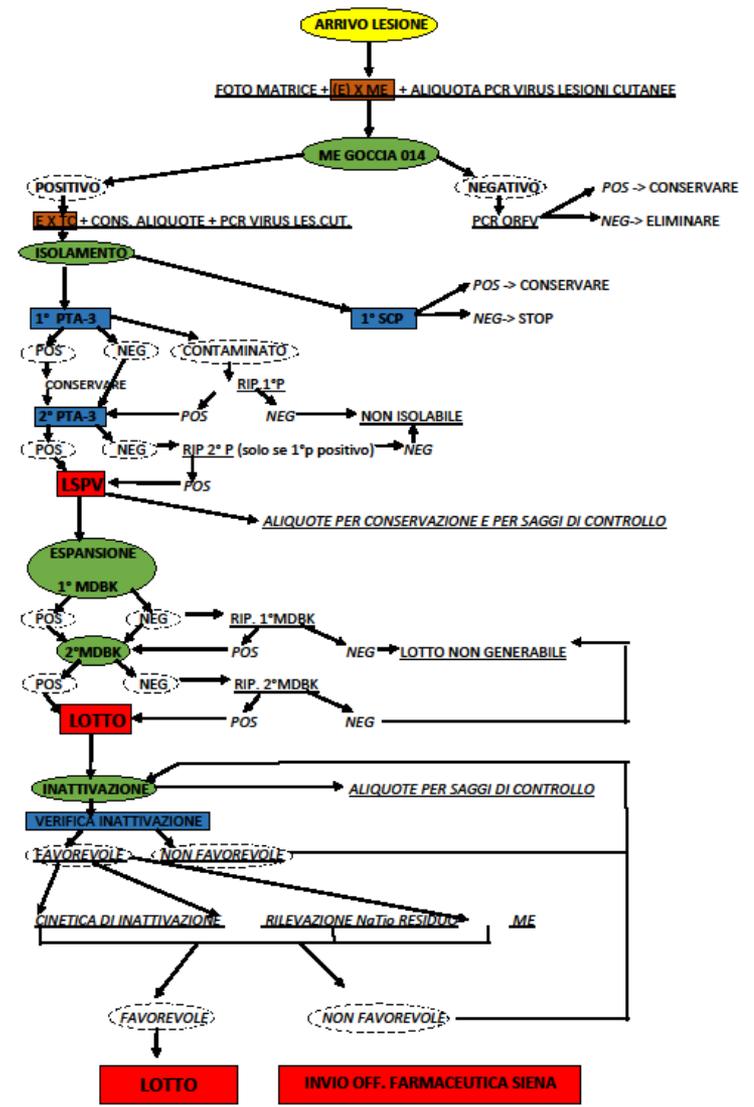
POS DMV 012 INT rev.0
PRODUZIONE DI VIRUS ORF INATTIVATO PER LA PREPARAZIONE DI VACCINO STABILIZZATO CONTRO L'ECZEMA CONTAGIOSA DI OVINI E CAPRINI (CULTURE CELLULARI) pag. 1 di 1

PRODUZIONE DI VIRUS ORF (INATTIVATO PER LA PREPARAZIONE DI VACCINO STABILIZZATO CONTRO L'ECZEMA CONTAGIOSA DI OVINI E CAPRINI (CULTURE CELLULARI))

Rev.	Data di emissione	redattore	verifica responsabile della prima/Responsabile Sanitaria/Offerita	Comunità Qualità	approvazione Responsabile di Struttura
0	.../.../2021	G. Carletti	G. Carletti		M.T. Scatena

Descrizione del motivo della riduzione

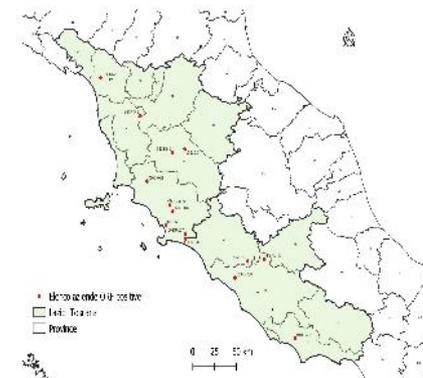
nessun problema (prima emissione)
Preparazione di una stock del virus. Perseguimento via DMV (escluso dall'elenco di pubblicazione su culture cellulari e su vaccino stabilizzato), per la produzione di vaccino stabilizzato.



Relazione finale Progetto IZSLT 11/21 RC: in preparazione e consegna entro il 29/12/2024

Numeri dal progetto (2022-2024)

Prodotti	Num.	Note
Campioni positivi in ME/PCR real time	28 (27 ovino - 1 caprino)	risultati concordanti per le 2 metodiche
Ceppi isolati in coltura	10 (9 ovini - 1 caprino)	n. 7 ceppi (tutti ovini) adattati e coltivati su MDBK per produzione stock virus
Stock virus vaccinali prodotti	6	N.2 inattivazione non riuscita; N. 5 diviso in due sottolotti inattivati con Calore (5C) e BEI (5B)
Lotti vaccinali inattivati e inviati all'OF	6	L.1 - L.3 - L.4 - L.5B - L.5C - L.6
Lotti con esito Favorevole ai controlli	5	Lotto 5B: esito sfavorevole



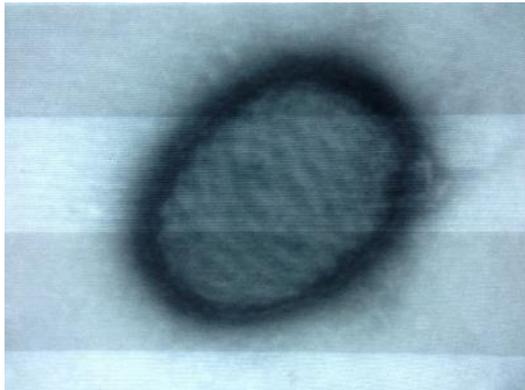
Mappa aziende positive al 01/02/2023

Regione	Aziende			Campioni		
	/	Pos	Neg	/	Pos	Neg
Lazio	6	3	3	8	3	5
Toscana	16	13	3	20	17	3
Totale	22	16	6	28	20	8



Isolamento del virus Orf per la produzione del vaccino dell'ectima

Giusy Cardeti
UOC DO Virologia
IZSLT, Roma



Grazie a tutti voi per l'Attenzione

... a tutte le U.O. del Progetto

... e a Daniele, Marina, Stefania, Katia, Annalisa, Alessia, Antonella,
Gabriele e Alessia per il loro prezioso contributo in laboratorio

