



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

PREPARAZIONE DEI VACCINI STABULOGENI

*Dr. Valerio Mannucci
Tecnico di Laboratorio
Officina Farmaceutica
UOT Toscana Sud – Sezione di Siena*



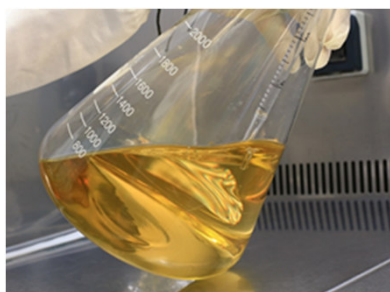
CONFERIMENTO CEPPO, RICHIESTA E RICETTA ELETTRONICA VETERINARIA (REV)



- REV compilata in ogni sua parte
- Ceppo corredato da richiesta



CLONAGGIO DEL CEPPO



Metodo
manuale

Utilizzo di beute di vari
volumi a seconda
della richiesta
da 1 a 10 litri

Metodo
automatico

Utilizzo di
biofermentatore da
banco
Massimo volume di
inoculo 2 litri





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CLONAGGIO DEL CEPPO

Metodo automatico

Utilizzo di bioreattore da banco **MINIFORS Standard®**

- Mantenimento della temperatura
- Mantenimento della pO_2 (pressione parziale di ossigeno)
- Mantenimento del pH
- Monitoraggio in continuo dei parametri
- Possibilità di poter variare i parametri
- Possibilità di poter attivare l'agitazione in cascata a variare della pO_2





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CLONAGGIO DEL CEPPO

Terreno di coltura utilizzato: Trypticasein Soy Broth in polvere, da ricostituire al 3% in acqua distillata.

Aggiunta di NaCl al 2% per i seguenti patogeni:

- Vibrio
- Fotobatterio

Temperatura: 37°C o 25°C a seconda del patogeno

Tempo: 72h con metodo manuale, 24h con metodo automatico

**Tutti i patogeni dei quali viene prodotto il vaccino stabulogeno
crescono in condizioni di AEROBIOSI**





CONTA DEI MICRORGANISMI VIVI

Dopo 72h di fermentazione:

- Prelievo di un campione della brodocoltura per conta dei vivi
- Lettura della densità ottica allo spettrofotometro a 600nm (vivi + morti)

Diluizioni per conta dei microrganismi vivi

- Diluizioni scalari in base 10 in SF
- Semina su AS o terreno di elezione per il patogeno per spatolamento

Fino alla diluzione -9 per *Staphylococcus* e *E. Coli*

Fino alla diluzione -8 per gli altri

Letture dopo 24h in termostato a 37°C o 25°C a seconda del patogeno.



INATTIVAZIONE

Dopo 72h di fermentazione si procede con l'inattivazione della brodocoltura



Tutte le brodoculture sono inattivate utilizzando

**Formaldeide in soluzione acquosa (formalina)
al 4‰ v/v**

**N.B. Tutte le inattivazioni vengono effettuare PRIMA
della diluizione**

In caso di produzione con metodo automatico la brodocoltura viene trasferita in una beuta precedentemente sterilizzata per poi procedere con l'aggiunta di formalina.

Dopo l'inattivazione la brodocoltura viene stoccata in cella frigo a 5°C per 72h ed agitata almeno due volte al giorno sull'agitatore magnetico.



PROVE DI STERILITA'

Dopo 72h ore tra cella frigo ed agitatore magnetico la brodocoltura (**non ancora diluita**) viene sottoposta a prove di sterilità per evidenziare l'avvenuta inattivazione del patogeno e per escludere eventuali contaminazioni da muffe, lieviti, microrganismi anaerobi e contaminanti.

BHI: verifica di inattivazione del patogeno o presenza di contaminanti

THIOL: ricerca di batteri anaerobi (clostridi)

TERRENI DI ELEZIONE: terreno solido in cui il patogeno contro il quale viene allestito il vaccino cresce con caratteristiche e morfologia note

SB: ricerca di muffe e lieviti

AS e **TSA**: ricerca di contaminanti

Per **Vibrio** e **Fotobatterio** il BHI viene sostituito con il **TSB 2% NaCl** per la presenza di sale.



In caso di *Staphylococcus*, *Pasteurellaceae* (anche dei pesci) ed *Aeromonas* l'AS è da considerarsi come terreno di elezione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

PROVE DI STERILITA' – LETTURA PIASTRE

Dopo 24h dall'effettuazione delle prove di sterilità si osservano le piastre
(tranne SB) ed i tubi seminati.

Se si apprezza crescita del patogeno e/o di contaminanti

IL LOTTO VIENE DISTRUTTO

e la lavorazione ricomincia da capo
(indagando su cosa e perché è cresciuto)

Se, al contrario, le piastre sono sterili ed i brodi limpidi si procede con la
diluizione ed i controlli di qualità sul prodotto finito.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

DILUZIONE DELLA BRODOCOLTURA

Diluzione della brodocoltura con **SF**

MA QUANTO POSSO DILUIRE?





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

DILUZIONE DELLA BRODOCOLTURA

Si procede alla diluzione della brodocoltura con **SF** fino a raggiungere una densità ottica di 0,08 – 0,100 a 600nm

Corrispondente ad una concentrazione di circa
 $1,5 \times 10^8$ UFC/ml

Come riportato sul foglietto illustrativo





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CONTROLLO SUL PRODOTTO FINITO

La brodocoltura, della quale abbiamo testato la purezza e l'inattivazione, dopo aver subito il processo di diluizione può iniziare ad essere considerata **PRODOTTO FINITO**.

Se i **CONTROLLI SUL PRODOTTO FINITO** forniranno esito negativo, il vaccino potrà essere commercializzato.

La commercializzazione ha come condizione necessaria il superamento di tutti i controlli di qualità.

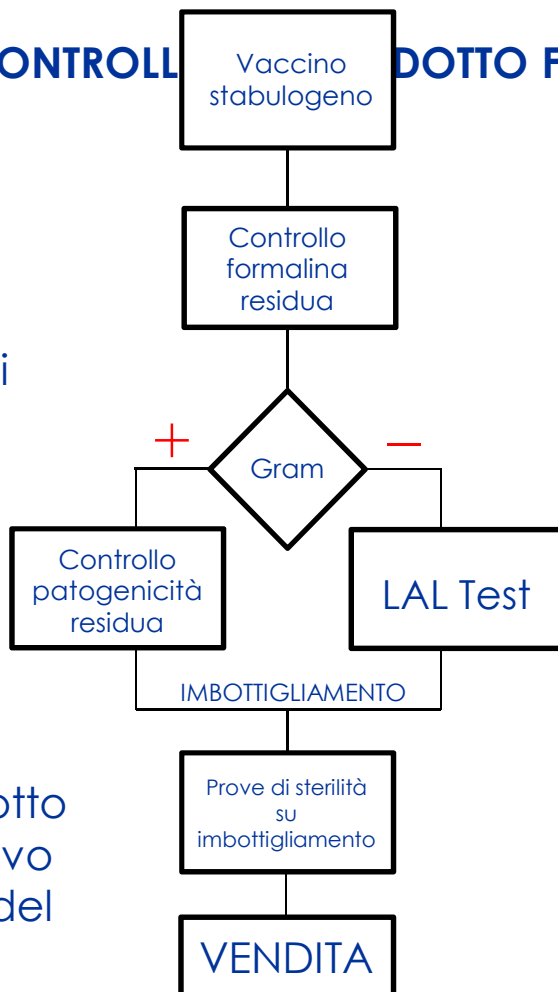
**IN CASO CONTRARIO IL VACCINO DOVRA' ESSERE DISTRUTTO ED IL
PROCESSO DI PRODUZIONE DOVRA' RIPARTIRE DA CAPO**



CONTROLLI PRODOTTO FINITO

I lotti a base di microrganismi Gram + vengono inviati presso l'Università di Tor Vergata per le prove di patogenicità residua su topino.

Se tutti i controlli su prodotto finito danno esito negativo si procede alla vendita del vaccino.



TUTTI i lotti prodotti vengono spediti presso il Lab. Chimico della sezione di Firenze per la quantificazione della formalina residua

I lotti a base di microrganismi Gram - vengono sottoposti a LAL Test presso la Sezione di Siena per la quantificazione delle endotossine batteriche. **AD OGGI SOLO I VACCINI DI PRODOTTO FINITO DA BATTERI GRAM- vengono sottoposti presso il Lab. Diagnostica della sezione di Siena per le prove di sterilità dopo l'imbottigliamento e pH.**



LAL TEST

Limulus Amebocyte Lysate TEST



E' un test di laboratorio che sfrutta la capacità degli amebociti contenuti nel sangue di *Limulus polyphemus* di coagulare in presenza di endotossine batteriche.

Le endotossine batteriche sono composti tossici che si sviluppano nel lipopolisaccaride (LPS) dei batteri gram negativi.



LAL TEST

- Test **cinetico/cromogenico**: lo sviluppo di colore segue la cinetica della reazione
- Sfrutta la capacità del lisato di amebociti di reagire con le endotossine al fine di **quantificarle** nel campione
- Test **quantitativo**: rende il risultato di concentrazione in termini di EU/ml
- **PRO:**
 - alta sensibilità;
 - robustezza;
- **CONTRO:**
 - ubiquitarietà delle endotossine;
 - assenza di una curva standard permanente;
 - costo.



LAL TEST



PRODOTTI



- Fiale da 2 ml per Piodermite del cane
- Flaconi da 100 ml
- Flaconi da 250 ml
- Flaconi da 500 ml

**TUTTI I VACCINI PRODOTTI SONO
CARATTERIZZATI DALL'ASSENZA DI ADIUVANTI**

