

L'immunizzazione delle volpi per via orale

RIASSUNTO

Viene esaminata l'efficacia dell'immunizzazione delle volpi per via orale quale strategia per il controllo della rabbia silvestre. Dopo un esame dei principali problemi legati ai requisiti del vaccino e delle esche che lo veicolano, vengono discussi i risultati di esperimenti di immunizzazione condotti nelle Alpi Svizzere.

Viene evidenziata l'importanza della morfologia naturale ed artificiale del paesaggio nella diffusione dell'attuale epizoozia di rabbia silvestre in Europa; la previsione delle direttrici di contagio permette la creazione di «barriere immuni» mediante trattamento con esche-vaccino in aree relativamente ristrette.

La distribuzione di 12-20 esche-vaccino per km² consente l'immunizzazione di almeno il 50% della popolazione volpina dell'area, e questo pare sufficiente ad arrestare l'avanzata della rabbia silvestre.

SUMMARY

The efficiency of immunizing foxes by mouth as a strategy of control of rabies is looked at. After an examination of the principal problems connected with requirements of the vaccination and with the types of bait to carry it, the results of the immunization experiments carried out in the Swiss Alps are discussed.

The importance of the natural and artificial morphology of the country-side in the diffusion of the present day epizooty of rabies in Europe is highlighted; the foreseeing of the direction of contamination is taking allows the creation of «immune barriers» by making use of vaccine-baits in relatively restricted areas.

The distribution of 12-20 vaccine-baits per km² permits the immunization of at least 50% of the fox population of the area, and this appears to be sufficient to stop rabies spreading.

Strategie per il controllo della rabbia

Per lungo tempo si è pensato che una drastica riduzione della popolazione ospite fosse l'unico mezzo possibile per il controllo delle epizoozie di rabbia. Questo non è del tutto impossibile, ma per molte

ragioni, principalmente di natura ecologica, è difficile raggiungere uno sradicamento della rabbia tramite il controllo della popolazione ospite.

Una strategia alternativa all'abbattimento dell'ospite principale è rappresentata dall'immunizzazione. In molti Paesi del mondo la rabbia canina è stata totalmente o parzialmente sradicata per mezzo di una

immunizzazione di massa dei cani (Bögel et al., 1982). Se fosse possibile anche l'immunizzazione di massa delle altre specie ospiti, questo metodo diverrebbe il più potente strumento per il controllo della rabbia.

Un passo più importante in questa direzione venne compiuto quando si trovò che virus rabbico vivo attenuato era in grado di immunizzare le volpi se somministrato per via orale (Baer et al., 1971; Debbie et al., 1972; Black and Lawson, 1973).

Questa scoperta suggeriva la possibilità di un vaccino per via orale, da somministrare tramite esche.

C'erano, tuttavia, ancora una serie di problemi da risolvere, sia riguardanti il vaccino, sia riguardanti l'esca.

Problemi relativi al vaccino

Il vaccino deve possedere i seguenti requisiti:

- immunogeno per la specie bersaglio, se ingerito per via orale;
- privo di patogenicità per l'uomo, per la specie bersaglio e per le altre specie che possono mangiare l'esca;
- non deve essere espulso dall'organismo;
- geneticamente stabile;
- libero da contaminazioni patogene;
- facilmente immagazzinabile;
- stabile alle temperature ambientali per diversi giorni;
- facile da produrre e poco costoso;
- contenente un marker genetico.

Da principio erano disponibili i tre ceppi attenuati di virus rabbico LEP, HEP e SAD. Tra questi il ceppo SAD divenne rapidamente il più promettente. Infatti, lo stipite SAD prodotto su cellule BHK-21, dopo essere stato passato su cellule renali di cane (Häfliger et al., 1982), soddisfaceva ampiamente ai requisiti a, e, f, g, h, ed i. Anche se una certa variazione genetica del virus è inevitabile, il ceppo SAD non rivirulenta facilmente, come invece accade per l'HEP. Il ceppo SAD presenta una residua patogenicità per i roditori (Wachendörfer et al., 1978) e può essere fatale per animali domestici (e selvatici?) che possiedono alcune carenze del sistema immunitario (per

es.: il cimurro nei cani). Il virus, per essere immunogeno per via orale, deve infettare i tessuti della cavità della bocca o della faringe. Un'escrezione virale potrebbe quindi essere teoricamente possibile, anche se non è stata ancora dimostrata. Comunque, nonostante questi inconvenienti, una diffusione del virus tra i roditori (e altri possibili ospiti) è altamente improbabile per varie ragioni (Steck et al., 1982 a) ed inoltre, non è stata provata in condizioni sperimentali, nel corso di indagini condotte in un'isola lungo un fiume (Wandeler et al., 1982).

Problemi relativi all'esca

Le esche servono per veicolare il vaccino e devono possedere i seguenti requisiti:

- allettanti per la specie bersaglio;
- devono essere mangiate dalla specie bersaglio immediatamente (e non essere respinte);
- rifiutate dalle altre specie, incluso l'uomo (bambini);
- in grado di raggiungere una vasta proporzione della popolazione della specie bersaglio;
- non devono inattivare il vaccino.
- in grado di liberare il vaccino nella cavità della bocca;
- contenenti un marker biologico;
- facilmente disponibili e poco costose.

Tutti i tipi di esca saggiati venivano mangiati da diversi carnivori domestici e selvatici e spesso anche da roditori (Wandeler et al., 1975). Inoltre tutte inattivavano il virus vaccinale.

Mentre non si è riusciti a risolvere completamente il primo problema si è trovata una semplice soluzione per il secondo, utilizzando teste di pollo come esche. Il vaccino, contenente un minimo di 10^7 TCID₅₀/ml veniva suddiviso in aliquote di 1,8 ml in piccole capsule di plastica (Häfliger et al., 1982).

Queste venivano sigillate al calore e fissate tra la scatola cranica e la cute di teste di polli di mattatoio.

Questo sistema di vaccinazione funzionava senza seri problemi in condizioni sperimentali di laboratorio.

Come marker biologico venivano iniet-

tati in ciascuna testa di pollo 150 mgr di clorotetraciclina. Le tetracicline vengono incorporate nelle ossa in accrescimento e nei tessuti dei denti.

Esperimenti sul campo

Nel 1978, il direttore del gruppo svizzero di ricerca sulla rabbia, il defunto Prof. Dr. Franz Steck, decise che non si potevano raggiungere ulteriori progressi, senza tentare alcune sperimentazioni sul campo. Un primo tentativo di vaccinazione antirabbica orale delle volpi sul campo venne condotto nella parte più bassa della Valle del Rodano nel Cantone Vallese, fra le Alpi Svizzere. Venne stabilito di vaccinare una zona all'entrata della valle, profonda circa 60 km. In quest'area vennero disseminate circa 12-20 esche per km quadrato. L'operazione di distribuzione delle esche venne ripetuta ogni primavera e autunno. Un'ondata epizootica che avanzava molto rapidamente non riuscì ad attraversare la zona di vaccinazione (Steck et al., 1982 a, b). Il successo di questa prima prova ci spinse ad ulteriori collaudi di tale metodo in altre parti delle Alpi Svizzere e recentemente anche nella regione più pianeggiante situata sul fronte Nord delle Alpi (per dettagli vedere Steck et al., 1982 a, b). Al fine di raggiungere una regolare densità delle esche su un'ampia area, il personale addetto alle distribuzioni è munito di mappe sulle quali viene indicata la collocazione esatta di ogni esca. Inoltre, il personale addetto riceve ulteriori istruzioni sulle norme di prudenza da seguire nel manipolare le esche e su come collocarle in maniera efficiente (Fig. 1).

Efficacia degli esperimenti sul campo

Nella maggior parte dei casi l'ondata epizootica veniva fermata dalla «barriera immune». A parte queste campagne di immunizzazione ben riuscite, solo in pochi casi si poté constatare che la rabbia penetrava ed attraversava le zone sottoposte a vaccinazione. Tali insuccessi erano chiaramente dovuti alla dispersione di uno scarso numero di esche su terreni particolarmente inaccessibili.

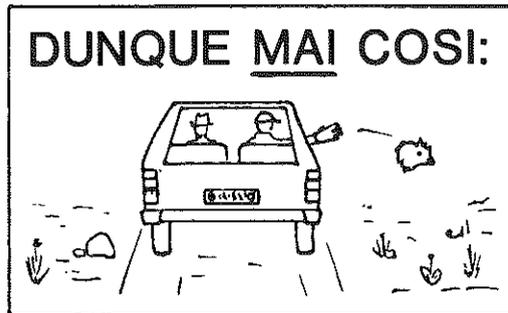
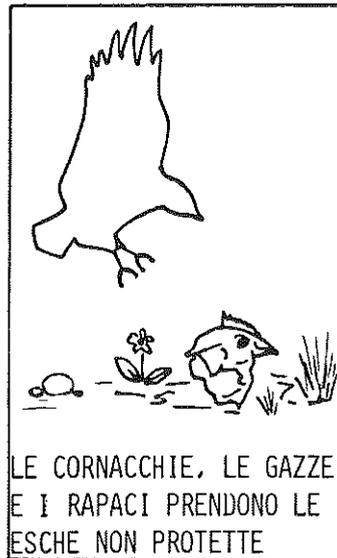
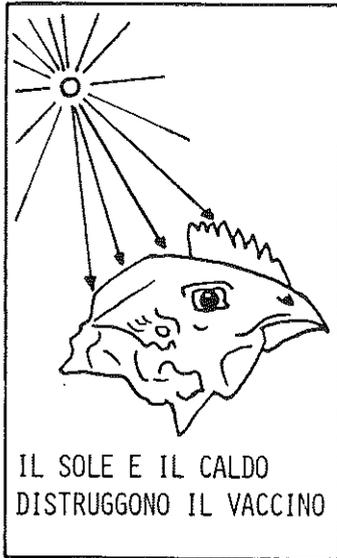
Un'esame delle volpi uccise nelle aree di vaccinazione ha portato ai seguenti risultati:

- nelle zone dove l'immunizzazione orale delle volpi arrestava la diffusione della rabbia, il 60 - 75% degli esemplari uccisi al di sopra dei 6 mesi di età, aveva ingerito l'esca. Solo circa un terzo dei cuccioli e dei giovani, uccisi nel periodo estivo, subito dopo la dispersione delle esche, mostrava depositi di tetraciclina nelle ossa e nei denti;
- come dimostrato da Johnston (1979) e da Johnston e Watt (1982), l'epoca a cui risale l'assunzione delle esche può essere stabilita calcolando il numero delle linee di «Von Ebner» tra il margine della cavità della polpa (tempo della morte) e la linea della tetraciclina (epoca a cui risale l'ingestione dell'esca). La maggior parte delle volpi marcate aveva assunto l'esca entro 5 giorni dalla campagna di vaccinazione. Solo poche esche venivano ancora trovate e mangiate a distanza di 50 giorni e più dalla dispersione;
- campioni di sangue prelevati dagli animali uccisi all'interno delle zone di vaccinazione venivano saggiati per la presenza di anticorpi rabbici neutralizzanti, mediante un test modificato di inibizione rapida dei foci fluorescenti (RFFIT). Circa il 50% dei sieri controllati possedevano attività neutralizzante a diluizioni maggiori di 1:20.

Sicurezza degli esperimenti sul campo

Sono stati fatti tentativi di reisolamento del ceppo SAD da animali ritrovati nelle zone di vaccinazione. I primi metodi utilizzati e i relativi risultati sono descritti da Steck et al., 1982 b. Il virus vaccinale non venne mai rivelato nel corso di tali esperimenti. Dal 1 gennaio 1982 sono state esaminate altre 1067 volpi, 201 differenti carnivori selvatici, 220 gatti, 18 cani, 1108 piccoli roditori e 73 insettivori. Di questi, risultarono positivi all'analisi di fluorescenza per la rabbia, 145 volpi, 11 tassi, 6 faine e 13 gatti. Il virus venne isolato da tutti. I ceppi isolati vennero esaminati con anticorpi monoclonali forniti dal dott. L.

IL SUCCESSO DELLA CAMPAGNA DI VACCINAZIONE CONTRO LA RABBIA DIPENDE ESSENZIALMENTE DAL MODO IN CUI VENGONO COLLOCATE LE ESCHE:



MA:

- SCENDERE E COLLOCARE L'ESCA NEL PUNTO PRESTABILITO, SCEGLIENDO IL POSTO PIÙ APPROPRIATO.
- RICOPRIRE L'ESCA CON FOGLIE, ERBA, ETC. (MAI SOTTERRARLA.).
- TENERE AL FRESCO LE ESCHE NON ANCORA COLLOCATE.
- SEGNARE CON LA MATITA SULLA CARTA GEOGRAFICA I PUNTI PRESTABILITI (COME CONTROLLO).

PRECAUZIONI:

1. Non toccare mai le esche senza guanti.
2. Lavarsi sempre le mani prima di bere, mangiare o fumare.
3. Mai toccarsi il viso o gli occhi con le mani sporche.
4. Quando uno dei sacchetti con il vaccino è difettoso, lavare immediatamente i guanti e le mani.

Schneider (Istituto Federale di Ricerca per le Malattie Virali Animali, Tuebingen, Repubblica Federale Tedesca). Solo un ceppo isolato era rappresentato da virus SAD, originato da un gatto che aveva mostrato sintomi di natura nervosa 3 settimane dopo la dispersione delle esche vaccino nell'area.

Il virus isolato presentava ancora immutate tutte le caratteristiche del ceppo vaccinale attenuato. Sette gatti vennero inoculati per via intramuscolare con il ceppo isolato. Tutti presentarono sieroconversione e non mostrarono mai alcun sintomo clinico.

Considerazioni di natura geografica ed epidemiologica

Durante l'attuale epizoozia di rabbia in Europa è stato ripetutamente osservato che alcune configurazioni naturali o artificiali del paesaggio impedivano la diffusione della malattia. I laghi, le catene montuose di altitudine elevata, fiumi grandi e con forti correnti, autostrade cintate lateralmente da sicure reti metalliche di protezione e le città non vengono facilmente attraversate dalla rabbia. Queste configurazioni di solito separano i diversi «home-range» e deviano la naturale direzione dei movimenti di dispersione - Esistono comunque anche osservazioni in contrario (Lloyd, 1980).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riconosciuto l'importanza di tali ostacoli e ha organizzato due «consultazioni sulle barriere naturali della rabbia silvestre in Europa» (WHO, 1979, 1981). Nel corso di entrambe le conferenze, è stata sottolineata l'importanza di adottare punti di vista biogeografici nel corso di ricerche epidemiologiche. Si consigliava alle Autorità nazionali di valutare il rischio e il successo delle operazioni di controllo prendendo in considerazione la morfologia del paesaggio, nonché l'intensità e le abitudini di caccia.

Per quanto riguarda la Svizzera, noi abbiamo seguito tali raccomandazioni e abbiamo tracciato sulla carta geografica tutte le barriere che potevano in qualche modo fermare od incanalare la diffusione della

rabbia. Così facendo, la Svizzera è stata suddivisa in compartimenti epidemiologici di diverse dimensioni. I confini di tali compartimenti non corrispondevano ai confini delle unità amministrative (Cantoni).

Abbiamo, inoltre, identificato sulle carte geografiche tutti i probabili passaggi d'ingresso dell'epidemia e le scappatoie all'interno dei compartimenti. Abbiamo ritenuto che fosse possibile mantenere libero dalla rabbia un compartimento non infetto, immunizzando la popolazione volpina dell'area attraverso la quale l'epizoozia avrebbe potuto accedere. I primi esperimenti sul campo vennero compiuti nel 1978 (Steck et al., 1982 a, b).

Grazie ad una «barriera immune» la parte superiore della Valle del Rodano veniva protetta dall'ondata epizootica che si diffondeva dalle aree infette dell'estremità orientale del lago di Ginevra. Il successo di questa prima applicazione sul campo di immunizzazione orale delle volpi ha portato alla designazione di altre aree geografiche da sottoporre ad ulteriori prove.

Di conseguenza non solo si è potuto proteggere nuove zone dall'invasione di rabbia, ma è stato anche possibile liberare quelle precedentemente infette. Grazie alla strategia della costruzione di «barriere immuni» all'ingresso dei compartimenti, le aree da sottoporre al trattamento con le esche-vaccino possono essere mantenute di proporzioni relativamente piccole, in confronto alle dimensioni dei compartimenti effettivamente protetti. Queste barriere devono essere mantenute finché esiste una immediata minaccia di invasione di rabbia. Il rapido ricambio della popolazione volpina rende necessaria almeno un'operazione di vaccinazione all'anno per ogni area.

Conclusioni

La distribuzione per chilometro quadrato di 12 - 20 esche, costituite da teste di pollo contenenti vaccino con virus SAD, consente di immunizzare circa il 50% o anche più della popolazione volpina nell'area disseminata di esche. Questo sembra sufficiente ad arrestare l'ulteriore avanzata della rabbia. Con l'utilizzazione del ceppo

SAD come virus vaccinale è inevitabile che si possa raramente verificare la morte di un animale (con carenze immunitarie?) per rabbia vaccinale.

Comunque non è mai stata evidenziata una diffusione del virus vaccinale o una reversione ad una infettività o patogenicità maggiori.

Alcuni di questi problemi potranno essere risolti in futuro o tramite la selezione di mutanti apatogeni utilizzando anticorpi monoclonali, o tramite l'uso di un vaccino privo di infettività. Se si tiene conto dell'esistenza di barriere naturali e dell'effettiva

distribuzione geografica dei casi di rabbia, questo permette di mantenere protetti compartimenti geografici più vasti con la costituzione di zone di controllo (zone di vaccinazione) in posizioni strategiche.

A.I. Wandler, S. Capt, A. Kappeler
Istituto di Batteriologia Veterinaria
Università di Berna (Svizzera)

Manuela Grassi
Borsista della Fondazione Cenci Bolognetti
Istituto Pasteur - Roma (Italia)

BIBLIOGRAFIA

- BAER, G.M., ABELSETH, M.K., and DEBBIE, J.G., 1971. Oral vaccination of foxes against rabies. *Amer. J. Epidemiol.* 93: 487 - 490.
- BLACK, J.G., and LAWSON, K.F., 1973. Further studies of sylvatic rabies in the fox (*Vulpes vulpes*). Vaccination by the oral route. *Can. Vet.* 14: 206 - 211.
- BÖGEL, K., ANDRAL, L., BERAN, G., SCHNEIDER, L.G., and WANDELER, A., 1982. Dog rabies elimination. *Int. J. Zoon.* 9: 97 - 112.
- DEBBIE, J.G., ABELSETH, M.K., and BAER, G.M., 1972. The use of commercially available vaccins for the oral vaccination of foxes against rabies. *Amer. J. Epidemiol.* 96: 231-235.
- HÄFLIGER, U., BICHSEL, P., WANDELER, A., and STECK, F., 1982. Zur oralen Immunisierung von Füchsen gegen Tollwut: Stabilisierung und Köderapplikation des Impfvirus. *Zbl. Vet. Med. B.* 29: 604 - 618.
- JOHNSTON, D.H., 1979. The significance of von Ebner's lines as daily increments of growth in the dentin of carnivores. *Trans. 1975 Eastern Coyote Workshop New Haven, Connecticut*, 55 - 59.
- JOHNSTON, D.H. and WATT, I.D., 1981. A rapid method for sectioning undecalcified carnivore teeth for aging. *The Worldwide Furbearer Conference Proceedings*, 407 - 422.
- LLOYD, H.G., 1980. *The red fox*. Batsford Ltd., London.
- STECK, F., WANDELER, A., NYDEGGER, B., MANNIGLEY, C., and WEISS, M., 1980. Die tollwut in der Schweiz 1967 - 1978. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 122: 605 - 636.
- STECK, F., WANDELER, A., BICHSEL, P., CAPT, S., HÄFLIGER, U., and SCHNEIDER, L., 1982 a. Oral immunization of foxes against rabies. Laboratory and field studies. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 5: 165 - 171.
- STECK, F., WANDELER, A., BICHSEL, P., CAPT, S., and SCHNEIDER, L., 1982 b. Oral immunisation of foxes against rabies. A field study. *Zbl. Vet. Med. B.* 29: 372 - 396.
- WACHENDÖRFER, G., FARRENKOPF, P., LOHRBACH, W., FÖRSTER, U., FROST, J.W. und VALDER, W.A., 1978. Passageversuch mit einer Variante des Tollwut-Impfstammes ERA bei wildlebenden Species (*Ondatra zibethica* und *Rattus norvegicus*). *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 85: 273 - 285.
- WANDELER, A.I., BAUDER, W., PROCHASKA, S., and STECK, F., 1982. Small mammal studies in a SAD baiting area. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 5: 173 - 176.
- WANDELER, A., PFOTENHAUER, P., und STÖCKER, C., 1975. Ueber die Verwendung von Ködern zu biologischen Untersuchungen an Füchsen. *Rev. Suisse Zool.* 82: 335 - 348.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981. Consultation on natural barriers of wildlife rabies in Europe. Berne, Switzerland, 25 - 27 Oct. 1979.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981. Consultations on natural barriers of wildlife rabies in Europe. Vienna, Austria, 28 April - 1 May 1981.