FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE

ATTI DEL CONVEGNO INTERNAZIONALE SU:

LA RABBIA SILVESTRE: RISULTATI E PROSPETTIVE DELLA VACCINAZIONE ORALE IN EUROPA

SIRMIONE - 19-20 OTTOBRE 1987
TRENTO - 21 OTTOBRE 1987

23

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
Via A. Bianchi 1, 25125 Brescia - Tel. 223244-2420569

ATTI DEL CONVEGNO INTERNAZIONALE SU: LA RABBIA SILVESTRE: RISULTATI E PROSPETTIVE DELLA VACCINAZIONE ORALE IN EUROPA

La presente pubblicazione (23° Quaderno della Serie) riporta, per gentile concessione della Rivista *PARASSITOLOGIA*, le relazioni, integrate da alcune notizie, presentate al Convegno Internazionale su "La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa", svoltosi a Sirmione (Brescia) il 19-20 ottobre 1987 ed a Trento — Castel del Buon Consiglio — il 21 ottobre 1987.

Nella stessa Collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1979 - Infezioni respiratorie del bovino
1980 - L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
1980 - Ormoni della riproduzione e Medicina veterinaria
1980 - Gli antibiotici nella pratica veterinaria
1981 - La leucosi bovina enzootica
1981 - La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
1982 - Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
1982 - Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
1983 - Zoonosi ed animali da compagnia
1983 - Le infezioni da «Escherichia coli» degli animali
1983 - Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
1984 - Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
1984 - 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
1985 - 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
1985 - La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
1986 - Immunologia comparata della malattia neoplastica
1986 - 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
1987 - Embryo transfer oggi. Problemi biologici e tecnici aperti e prospettive.
1987 - Coniglicoltura. Tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
1988 - Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
1989 - Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
1989 - Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE

ATTI DEL CONVEGNO INTERNAZIONALE SU:
LA RABBIA SILVESTRE: RISULTATI E PROSPETTIVE DELLA VACCINAZIONE ORALE IN EUROPA

Sirmione (Brescia): 19-20 ottobre 1987
Trento: 21 ottobre 1987

edito a cura della

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA

Sirmione. Cerimonia inaugurale e celebrazione del primo centenario della fondazione dell'Istituto Pasteur di Parigi.

Sirmione. Apertura dei lavori. Relazione del Prof. Rognoni, Presidente della Sezione V del Consiglio Superiore di Sanità.

BILANCIO DEL CONVEGNO E DEL PIANO SPERIMENTALE DI VACCINAZIONE ORALE DELLE VOLPI CONTRO LA RABBIA

Dal 19 al 21 ottobre 1987 si è tenuto a Sirmione ed a Trento il Convegno internazionale di cui ora si pubblicano gli Atti, promosso dalla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia e dall'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti di Roma, con il contributo delle Province di Brescia e di Trento.

Secondo il programma, curato dai Proff. Panina e Biocca e dal Dott. Pecorelli, nella prima giornata Ricercatori provenienti dai Paesi dell'Europa occidentale ed orientale hanno presentato relazioni e discusso su epidemiologia della rabbia, etologia della volpe, vaccinazione orale nel controllo della rabbia silvestre, esperienza italiana, prove sul territorio ed aspetti futuri nelle varie Nazioni europee. Nella seconda giornata l'attenzione è stata rivolta ai nuovi vaccini antirabbici per l'uomo e per gli animali ed alle misure di sicurezza da adottare nella loro applicazione sul territorio. Nel pomeriggio ha avuto luogo la celebrazione del primo centenario della fondazione dell'Istituto Pasteur di Parigi. Il terzo giorno i convenuti si sono spostati a Trento, dove, dopo la visita alle vallate in cui erano state distribuite le esche vaccinali, è stato commemorato il Prof. F. Steck, pioniere della vaccinazione orale delle volpi sul campo nel territorio della Confederazione elvetica.

La pubblicazione degli Atti del Convegno offre l'occasione per una valutazione obiettiva del piano avviato in Valle Camonica dalla Provincia di Brescia nel 1983 con l'Assessore all'Assistenza Sociale e Sanità Rag. Manessi e proseguito poi fino al 1986 dall'Assessore Dott. Armanini.

La proposta di intraprendere la vaccinazione partì dagli ambienti politici della Valle Camonica, sollecitati dai cittadini e stimolati dalle notizie provenienti dalla Svizzera. La Provincia chiese allo scrivente di farsi carico degli aspetti tecnico-amministrativi ed assicurò il finanziamento. Venne costituita una Commissione provinciale formata da uomini politici e da rappresentanti di tutti gli Enti, Istituti, Organizzazioni ed Uffici interessati: Caccia (Assessori Bonomi e Maninetti), Istruzione pubblica (Assessore Minelli), Foreste, Zooprofilattico, USSL interessate, Igiene Pubblica, Ecologia ed organi d'informazione. Si tennero i contatti con la Prefettura e con l'Autorità giudiziaria. Fu sollecitato l'appoggio dei Parlamentari.

Pure utilizzando le notizie e la metodologia apprese in Svizzera (Dott. Wandeler) e trasmesse a Brescia dal Dott. Ruatti di Bolzano, venne scelto come punto di riferimento scientifico iniziale il WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research di Tübingen, diretto dal Prof. Schneider

con la collaborazione del Dott. Müller e del Dott. Cox, per i seguenti motivi: *a)* una deliberazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità prescrive che in Europa l'impiego sperimentale del vaccino orale sul campo venga attuato sotto il controllo del Centro predetto; *b)* il virus-vaccino SAD_{B19} fornito dal Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals di Tübingen offre notevoli vantaggi operativi, perché sopporta senza danno d'essere ricongelato dopo il confezionamento in capsule ed esche presso l'Istituto produttore ed in questo stato mantiene la propria validità anche per 12 mesi, purché sia trasportato e conservato a temperature sempre inferiori a —20°C. Il rappresentante del WHO Centre è intervenuto a tutte le riunioni del Comitato Scientifico di cui si dirà più avanti, recando l'apporto prezioso delle ultime ricerche e delle esperienze raccolte in Europa. I controlli di laboratorio connessi alla prima campagna di vaccinazione sono stati eseguiti in parallelo a Brescia ed a Tübingen.

Per attuare al meglio un piano di vaccinazione orale delle volpi è essenziale poter disporre di una guida scientifica fondata su esperti di sicura affidabilità, di uno o più Istituti che assicurino i controlli di laboratorio richiesti, di una organizzazione seria ed efficiente per la distribuzione ed il controllo delle esche sul campo e di una organizzazione capace di garantire l'indispensabile monitoraggio. Per mettere a punto queste strutture si devono promuovere sinergie interdisciplinari finora scarsamente praticate.

1) La guida scientifica è stata assicurata dal Consiglio Superiore di Sanità, Sezione V, presieduta dal Prof. Romboli e dal suo successore Prof. Rognoni, dall'Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Medicina Veterinaria, con i Proff. Orfei, Ciuchini e Buonavoglia, e dal già citato WHO Centre di Tübingen.

Successivamente il Ministero ha accolto la proposta di istituzione da parte della Regione Lombardia, che aveva approvato ed inoltrato al Ministero della Sanità il piano elaborato dalla Provincia, di un Comitato Scientifico con sede presso l'Istituto Zooprofilattico di Brescia, nel quale, oltre alle istituzioni sopra ricordate, erano rappresentati il Ministero della Sanità, la Regione Lombardia (Servizi di Igiene Pubblica e Medicina Veterinaria), le Università di Milano, Roma e Torino, gli Istituti Zooprofilattici di Brescia, Padova e Torino, l'Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina di Bologna, il Parco Nazionale dello Stelvio e le Province e Regioni interessate all'esperimento. Presidente il Prof. Rognoni, Preside della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano, e Segretario lo scrivente. La Provincia di Brescia si è addossata le spese di funzionamento del Comitato.

2) I controlli di laboratorio sono stati eseguiti dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia, Dott. Civardi e Dott. De Simone, in collaborazione con quello di Padova, Dott. Irsara, sotto la supervisione dell'Istituto Superiore di Sanità.

3) Per la distribuzione delle esche, con punto di riferimento le USSL interessate NN. 36, 37, 39 e 40, si è fatto perno sulle Guardie Forestali, Dott. De Toni, sulle Guardie Venatorie, Dott. Tagliaferri, e sulle Guardie

del Parco Nazionale dello Stelvio, Dott. Martini, con la collaborazione delle Guardie Ecologiche.

L'efficienza organizzativa in questo campo è stata collaudata nella primavera del 1984 con la distribuzione sul territorio di 7000 esche - teste di pollo marcate con l'ossitetraciclina ma prive di vaccino, la cosiddetta «prova in bianco» richiesta dal Ministero della Sanità, il cui costo è stato di L. 5605 per ogni esca distribuita. Sono seguite due distribuzioni di complessive 15.000 esche vaccinali - teste di pollo nel 1984 e nel 1985, con un costo di L. 4800 per esca. Infine, sono state distribuite 16.000 esche vaccinali - saponetta Tübingen nel 1986, con una spesa di L. 2913 per esca. La Regione Lombardia ha sostenuto la spesa d'acquisto del vaccino.

4) Il monitoraggio è impresa meno agevole di quanto si creda, nella quale si sono distinte le Guardie Venatorie della Provincia, coadiuvate da cacciatori esperti.

Come primo risultato, in ambito locale, fin dalla prima campagna vaccinale dell'autunno 1984 è stato bloccato ed estinto in Alta Valle Camonica il focolaio di rabbia ivi in atto.

Per la prima volta è stato introdotto in Italia un metodo, già collaudato in Svizzera ed in Germania Occidentale, che, insieme alle misure di profilassi tradizionali, consente di: *a*) bloccare l'avanzata della rabbia silvestre in una vallata; *b*) aggredire ed estinguere un focolaio in atto in un'area ben circoscritta da barriere naturali con due trattamenti vaccinali eseguiti a distanza di 6 mesi; *c*) aggredire ed estinguere un focolaio insorto in seguito alla penetrazione di volpi infette attraverso una barriera naturale, ottenendo il risultato con un solo trattamento vaccinale se si interviene entro 15-30 giorni dall'accertamento della malattia o con due trattamenti effettuati a distanza di sei mesi se si interviene con maggiore ritardo.

Dal 1987 in Regione Lombardia è cessato lo stato di allarme nei confronti della rabbia silvestre e di conseguenza sono cessati i trattamenti vaccinali post-contagio sistematici delle persone morsicate, che comportavano una spesa annua superiore al miliardo di lire. Inoltre, sono cessate le spese di vaccinazione antirabbica annuale dei cani e sono diminuite drasticamente le spese per i costosi esami diagnostici richiesti all'Istituto Zooprofilattico.

Nel 1986 l'esperienza acquisita in Valle Camonica ha indotto il Ministero della Sanità ad autorizzare l'estensione del metodo al vasto focolaio endemico della provincia di Trento, nella Regione Trentino-Alto Adige. Questo focolaio stava creando problemi anche alle adiacenti vallate bresciane. Pure qui la malattia è scomparsa fin dalla prima campagna vaccinale.

Contemporaneamente il Ministero della Sanità ha autorizzato un piano di pronto intervento vaccinale nella Provincia Autonoma di Bolzano, per il caso che l'infezione dovesse penetrare nuovamente in Italia dal Tirolo austriaco, tuttora infetto. Piani analoghi si potranno predisporre per le altre aree di confine ancora minacciate.

Infine, sulla spinta delle relazioni presentate al Convegno internazionale,

un esperimento di vaccinazione orale delle volpi si effettuerà entro il 1988 in una zona situata a cavallo del confine tra Austria e Jugoslavia. Il focolaio in atto in Jugoslavia minaccia anche le adiacenti regioni italiane.

Concludendo, sono state confermate le grandi potenzialità di un Ente Locale. Sollecitata dalla temibilità di un'emergenza e dalle pressioni dei cittadini, pur in un settore che non rientrerebbe pienamente nelle sue competenze, la Provincia di Brescia ha estrinsecato un tale impulso dinamico di sinergie e disponibilità fra Enti, Istituti, Organizzazioni, Uffici e persone, sia in ambito provinciale che nazionale ed internazionale, da poter considerare questo fatto già di per sé un successo. A tutte queste Istituzioni, Uffici e persone va un ringraziamento vivissimo. Il traguardo prefissato all'inizio è stato raggiunto rapidamente. La ricaduta dei risultati scientifici ed economici è andata ben oltre i confini della Provincia.

Sono confermate anche la costante attenzione e disponibilità della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, presieduta dal Dott. Ghitti e diretta dal Dott. Pecorelli, per la ricerca e per il progresso delle scienze veterinarie. Con la promozione del Convegno e la pubblicazione degli Atti si mette a disposizione di tutti gli interessati il frutto delle nuove importanti esperienze acquisite.

M. S. Ponzanelli
Veterinario Dirigente USSL 41, Brescia

VISITA AI TERRITORI ALPINI: SALUTO DELL'ASSESSORE R. JORI DELLA PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO

Dopo la visita in mattinata nei territori alpini delle Valli Giudicarie, della Valle Rendena e della Val di Sole, oggetto della sperimentazione di vaccinazione orale delle volpi, e la visita all'Abbazia Agostiniana di S. Michele all'Adige, la giornata scientifica e culturale trova la sua chiusura qui a Trento, nella bellissima «Sala Grande» del Castello del Buon Consiglio, resa ancor più suggestiva dall'eco delle note di un quartetto musicale di «corni da caccia» messi gentilmente a disposizione dagli Amministratori della vicina Provincia di Bolzano.

Riallacciandomi alle parole del dott. Capt, che ha ricordato brevemente la significativa figura di ricercatore del dott. Steck, che per primo ha intuito, studiato, elaborato e provato sul campo la vaccinazione orale delle volpi, vorrei dire subito, per restare nel concreto, che l'adozione di metodi di lotta tradizionali e successivamente la sperimentazione di un nuovo metodo di lotta basato sulla vaccinazione orale delle volpi hanno consentito di raggiungere quegli obiettivi che ci eravamo prefissi: bloccare l'epidemia e combatterne cause ed effetti. Oggi possiamo dire con certezza che nessun caso di rabbia si è verificato nella nostra Provincia a partire dall'11 luglio 1986.

Ed è proprio per sottolineare questo risultato che, in accordo con l'Amministrazione provinciale di Bolzano e con la Regione Lombardia, che pure hanno eradicato la malattia sperimentando il nuovo metodo di lotta basato appunto sulla vaccinazione orale delle volpi, è stato promosso questo incontro internazionale, destinato non solo a fare il punto sui risultati ottenuti ma anche e soprattutto ad indicare le prospettive di un'azione che dovrà necessariamente trovare altri momenti di controllo e di confronto.

Quando nell'ormai lontano 1983 l'infezione rabida apparve ufficialmente nel Trentino, fu subito chiaro che ogni azione doveva avere come fine primario la salvaguardia della salute dell'uomo, quella delle popolazioni animali da reddito ed infine, fatto non certo secondario, la salvaguardia dell'immagine turistica del nostro territorio.

Fortunatamente, oggi possiamo guardare al futuro con maggiore sicurezza. Questo incontro internazionale ci ha consentito di sviluppare, attraverso l'esame comparato dei risultati delle esperienze nazionali con le esperienze estere, capitoli più definitivi sulla metodologia di lotta alla rabbia silvestre mediante la vaccinazione orale delle volpi sul campo, e di formulare le prospettive attraverso le quali le diverse modalità di lotta alla epizoozia in parola potranno trovare pratica integrazione ed applicazione.

Per l'esposizione delle conclusioni relative alla nuova metodologia di lotta e la formulazione delle prospettive di integrazione con i metodi tradizionali è stata scelta la città di Trento, cosa di rilievo in quanto pone questa Amministrazione provinciale all'attenzione degli altri Paesi europei per i risultati ottenuti.

Dobbiamo anche giustamente sottolineare come, sulla base delle esperienze condotte dalle Province di Trento, di Brescia e di Bolzano e per i risultati conseguiti, il Ministero della Sanità abbia riconosciuta valida, quale metodo integrativo di lotta, la vaccinazione orale delle volpi.

Infatti i risultati hanno dimostrato come, grazie all'integrazione di metodi tradizionali di lotta con la vaccinazione orale delle volpi, sia stato possibile eradicare nel breve periodo la malattia.

E quindi diciamo che le iniziative di prevenzione, se tempestive e ben organizzate e dirette, danno i loro frutti.

Un pubblico riconoscimento va quindi rivolto:

— ai ricercatori e sperimentatori veterinari stranieri della Svizzera e della Germania, che hanno messo a disposizione i risultati applicativi delle loro ricerche e la loro disponibilità a seguire l'esperienza italiana;
— al Comitato tecnico scientifico interdisciplinare ed interregionale appositamente istituito presso l'Assessorato alla Sanità della Regione Lombardia, che ha coordinato la promozione e la sorveglianza della sperimentazione nei territori delle Province di Trento, di Brescia e di Bolzano;
— al Ministero della Sanità, che attraverso i suoi organismi tecnici ha autorizzato e controllato la sperimentazione;
— ai Servizi veterinari di Provincia ed UU.SS.LL., che hanno promosso, organizzato ed attuato una idonea strategia di lotta, anche sperimentale, raggiungendo in tal modo risultati ottimali;
— all'Associazione Provinciale Cacciatori, al personale del Servizio Foreste, Caccia e Pesca ed ai privati cittadini che, attraverso la prestazione della loro opera, hanno reso possibile l'iniziativa;
— al personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Padova (sede centrale e sezione di Trento) ed all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia, che hanno collaborato per la diagnosi di laboratorio.

Mi pare dunque che, a tirar le somme, possiamo essere soddisfatti del lavoro compiuto, anche se la guardia non va abbassata e la sorveglianza va mantenuta.

Abbiamo avuto occasione di sperimentare un nuovo metodo di lotta, un metodo incruento, ed abbiamo potuto ricercare e sperimentare per la prima volta la disponibilità e la collaborazione dei Servizi Sanitari Europei, dei Servizi Sanitari Interregionali, dei Servizi Pubblici non espressamente ad indirizzo sanitario.

Accanto dunque ai risultati igienico-sanitari, abbiamo avuto modo di creare nuovi collegamenti, nuove forme di collaborazione.

Questo tipo di ricerca e di sperimentazione, nella concreta organizzazione di risorse operanti in settori differenti, ha richiesto spirito di iniziativa,

creatività, quasi un senso di imprenditorialità. I responsabili ed i tecnici sanitari si sono prima impegnati per acquisire le necessarie conoscenze, poi per far accettare questo progetto sperimentale ed infine per tradurlo in operante realtà. Mi pare anche questo un risultato estremamente positivo e certamente non secondario.

È stata in sostanza la dimostrazione del come anche gli enti pubblici, normalmente tanto vituperati, riescano, al di là di azioni puramente burocratiche, a dimostrare iniziativa e creatività, ottenendo, sulla base di una precisa organizzazione e di una collaborazione senza riserve, ottimi risultati.

Sono lieto di darne atto a tutti coloro che hanno impegnato in questa battaglia contro la rabbia silvestre, considerata in un primo tempo una sorta di epidemia inarrestabile, le loro intelligenze e le loro capacità professionali.

Ora dobbiamo guardare avanti, considerare i risultati ottenuti come un primo passo verso obiettivi maggiori, affinché anche questa malattia venga finalmente e per sempre debellata.

Grazie per quanto avete fatto e per quanto ancora farete.

REMO JORI
Assessore alle Attività Sociali e Sanità
della Provincia Autonoma di Trento

CONVEGNO INTERNAZIONALE «LA RABBIA SILVESTRE: RISULTATI E PROSPETTIVE DELLA VACCINAZIONE ORALE IN EUROPA»

(Sirmione e Trento, 19-21 ottobre 1987)

E. Biocca - Nota introduttiva: controllo del vettore ed eradicazione della rabbia silvestre 1

E. Biocca, L. Bellani - La vaccinazione orale nel controllo della rabbia silvestre 3

T. Balbo - Etologia sanitaria della volpe e vaccini antirabbici nell'esperienza italiana 13

A. Ruatti, M. Ponzanelli, M. Allegretti, F. Mengon, C. Costanzi - L'esperienza italiana nel controllo della rabbia: lavoro operativo 19

A. Irsara, A. Civardi, F. De Simone, G. L. Bressan - L'esperienza italiana nel controllo della rabbia: ricerche di laboratorio 29

F. Ciuchini, C. Buonavoglia - L'esperienza italiana nel controllo della rabbia: indagini di laboratorio sul vaccino S.A.D. B19 Tü impiegato nelle campagne vaccinali 35

N. Orsi - Il programma Rhabdovirus dell'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti 49

A. I. Wandeler, S. Capt, H. Gerber, A. Kappeler, R. Kipfer - Rabies epidemiology, natural barriers and fox vaccination 53

T. Vanzetti - Esecuzione pratica della vaccinazione orale delle volpi nel Cantone Ticino 59

C. Ingravallo - Indagini sulla profilassi della rabbia silvestre nella provincia di Roma 67

G. M. Fara, A. Panà, C. Signorelli, S. Mancinelli, M. C. Marazzi, L. Palombi - Contributi per una proposta di modifica delle istruzioni ministeriali per la profilassi antirabbica alla luce dell'esperienza del Centro Antirabbico di Roma 71

E. Scharfen - Wutkrankheit in Österreich 1966-1986 81

L. Hallet - Lutte contre la rage vulpine en Belgique: première campagne de vaccination des renards par voie orale 87

A. Seimenis, O. Manganà, V. Nomicoù - Epidemiology and diagnosis of rabies in Greece 93

K. C. Meldrum - Rabies contingency plans in the United Kingdom 97

J. A Costello - Rabies in Ireland: a precarious freedom 104

J. Kolacz - Animal rabies in Poland: epidemiological situation and methods of control 109
S. G. Veiga - Rabies situation in Portugal 113
J. de Zulueta - Rabies in Spain 115
L. Koltai - Die Tollwut in Ungarn 117
W. W. Müller - Present status of bat-rabies in Europe 121
H. U. R. Nieuwenhuis - The rabies situation in The Netherlands 123
J. Blancou - Nouvelles recherches sur la vaccination orale des animaux sauvages 129
P. Sureau - New vaccines for immunization of man: new approaches towards the prevention of rabies in man 141
P.-P. Pastoret, J. Blancou, B. Brochier, I. Thomas, A. Paquot, J. Debruyn, F. Costy, F. Wolff, M. P. Kieny, B. Languet, J. P. Lecocq, Ph. Desmettre - Expérience de vaccination antirabique du renard par voie orale coordonnée entre plusieurs pays européens et perspectives d'utilisation du virus recombinant vaccine-rage 149

Parassitologia 30: 1-2, 1988

NOTA INTRODUTTIVA: CONTROLLO DEL VETTORE ED ERADICAZIONE DELLA RABBIA SILVESTRE

E. Biocca

Istituto di Parassitologia, Università di Roma «La Sapienza»

Parassitologia, organo ufficiale della Società Italiana di Parassitologia, promuove la pubblicazione di ricerche su: 1) sistematica e biologia di parassiti e vettori di malattie; 2) interazioni ospite-parassita; 3) epidemiologia e controllo di infezioni parassitarie e/o trasmesse da vettori.

Nel definire queste «norme per gli autori» si è cercato non solo di precisare meglio gli scopi che si propone la nostra rivista, ma anche di indicare il «campo ed i confini» che, a nostro avviso, caratterizzano quella disciplina per la quale Giovan Battista Grassi ha proposto il nome di Parassitologia, la quale vede come argomento fondamentale di studio non solo i parassiti, ma anche i vettori animali di malattie ed il controllo delle malattie così trasmesse.

A proposito di animale vettore di malattia ci sembra interessante ricordare quanto ha scritto Vittorio Puntoni, uno dei maggiori igienisti italiani: «Meritano il nome di vettori quegli animali (quasi sempre artropodi) che compiono il triplice compito di: 1) assumere l'agente infettante dall'individuo infetto...; 2) consentire una moltiplicazione dell'agente infettante nell'interno del loro organismo...; 3) provvedere alla reinoculazione dell'agente infettante così moltiplicato nell'individuo sano (*Trattato d'Igiene*, Vol. II: 889-890).

Secondo questa definizione, che nelle sue linee generali viene oggi comunemente accettata, il concetto di animale vettore è sostanzialmente legato alla funzione attiva che l'animale deve svolgere nel meccanismo di trasmissione della malattia. Anche se il maggior numero di vettori conosciuti appartenga, come giustamente ricorda Puntoni, al grande gruppo degli artropodi, esistono numerosi animali vettori di malattie che appartengono ad altri gruppi zoologici, dai molluschi ai mammiferi. La volpe (*Vulpes vulpes*) per esempio è il principale vettore di rabbia silvestre in Europa, così come alcune specie di chirotteri lo sono per la rabbia da pipistrelli segnalata ormai anche in Europa. Gli esempi potrebbero essere numerosi.

Il controllo quindi delle malattie trasmesse da vettori, siano o non siano ad etiologia parassitaria, è inevitabilmente basato sul controllo dell'animale vettore: questo è possibile solo attraverso lo studio della sistematica e della biologia del vettore; delle caratteristiche bio-geografiche del territorio in cui

il vettore è presente; delle metodiche fisiche, chimiche o biologiche destinate ad eliminare o rendere inoffensivo il vettore.

Parassitologia dedica questo suo numero monografico ai lavori del Convegno Internazionale tenutosi a Sirmione e Trento nell'ottobre 1987 su «Rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa». È un Convegno che segna una tappa importante nella lotta alla rabbia silvestre, perché ha documentato come questa malattia sia stata fermata nella sua avanzata, che sembrava ormai inarrestabile in Europa, proprio attraverso lo studio approfondito del vettore (la volpe) e del suo ambiente di vita. È stato infatti possibile, come le relazioni confermano, passare dalla semplice e brutale eliminazione delle volpi — dimostrasi insufficiente da sola ad arginare il dilagare dell'epidemia rabbiosa in Europa — alla trasformazione dell'animale vettore, la volpe, attraverso la sua immunizzazione, in animale non più vettore, ma capace di resistere all'infezione e di difendere il proprio territorio contro la penetrazione e il passaggio dell'onda rabbiosa portata dalle volpi infette.

L'immunizzazione della volpe, cioè di un animale vettore che vive libero nell'ambiente, ha creato una problematica diversa da quella relativa alla vaccinazione dell'uomo e degli animali domestici, sia perché è realizzabile solo attraverso la via orale, sia perché le esche che contengono vaccini antirabbici vivi e modificati — che allo stato attuale sono decisamente più attivi per la via orale rispetto ai vaccini spenti — possono essere ingerite da selvatici non bersaglio (in particolare micromammiferi) con eventuale rivirulentazione del virus. La distribuzione delle esche nel territorio ha reso necessario quindi anche un studio approfondito dell'ambiente e dei selvatici in esso presenti.

Questa impostazione nuova per il controllo della rabbia silvestre, impostazione che ben possiamo chiamare «parassitologica» perché essenzialmente basata sullo studio del vettore e dei rapporti tra vettore e animali selvatici presenti nelle zone colpite o minacciate dall'infezione, ha consentito alla Svizzera, alla Germania Federale e all'Italia (seguita ora da molti altri paesi europei) di ridurre drasticamente i casi di rabbia silvestre: dal luglio 1986 l'Italia, in cui l'epidemia rabbiosa era penetrata profondamente, è così riuscita, primo grande paese in Europa, a non aver più nessun nuovo caso di rabbia segnalato nel proprio territorio.

Con questo nuovo indirizzo di ricerche sono state aperte prospettive importanti non solo per la lotta e, vogliamo sperare, per l'eradicazione anche della rabbia urbana, ma anche di altre malattie dell'uomo e degli animali trasmesse da vettori mammiferi, prima fra tutte l'echinococcosi.

I risultati ottenuti in questa difficile lotta contro la rabbia silvestre, che ha visto un impegno multidisciplinare di dirigenti sanitari, parassitologi, ecologi, immunologi, rappresentano — come è stato affermato nel Convegno Internazionale di Sirmione e Trento e come è stato ripetuto nella riunione celebrativa organizzata dall'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti all'Università «La Sapienza» di Roma — il miglior contributo alla celebrazione del centenario dell'Istituto Pasteur di Parigi e al ricordo di Louis Pasteur.

Parassitologia 30: 3-12, 1988

LA VACCINAZIONE ORALE NEL CONTROLLO DELLA RABBIA SILVESTRE

E. Biocca[1], L. Bellani[2]

[1] *Istituto di Parassitologia, Università di Roma «La Sapienza»*; [2] *Direzione Generale dei Servizi Veterinari, Ministero della Sanità, Roma.*

Abstract. The authors briefly report the results of laboratory and epidemiological investigations on living modified and inactivated antirabies vaccines, started in 1975 and carried out in collaboration with public health authorities and scientific institutions. The antirabies oral vaccination of foxes, using a live and modified vaccine (SAD_{B19} Tüb.) began in Brescia province (Val Camonica) in 1984 and was extended in 1985 to Bolzano and Trento provinces. Since July 1986 no more cases of rabies have been observed in Italy. The problems related to the distribution in the territory of live and modified antirabies vaccines, the immunological value of inactivated vaccines, the connections between sylvatic rabies and bat rabies (or pseudorabies), are discussed.

Key words: sylvatic rabies, foxes, oral vaccination, Italy.

Introduzione

La rabbia silvestre è penetrata, per la prima volta, nel 1977 in territorio italiano dalle frontiere nord-orientali e si è rapidamente estesa in molte province del nostro paese. Nel 1984 è stata iniziata una campagna di vaccinazione in Val Camonica (provincia di Brescia) con vaccino orale vivo e modificato (ceppo SAD_{B19}) di Tübingen, distribuito con esche nel terreno: rapidamente la rabbia è scomparsa da questa grande valle alpina. In seguito a questi risultati è stato deciso di estendere la vaccinazione antirabbica nella provincia di Trento in cui erano attivi numerosi focolai di rabbia silvestre, seguendo una tecnica che tenesse conto delle metodiche e dei risultati ottenuti con la vaccinazione antirabbica orale sia in Svizzera che in Germania Federale: distribuzione di esche vacciniche nell'area della provincia di Trento con focolai attivi (nell'anno 1985 sono stati registrati oltre 100 casi di rabbia silvestre nelle volpi) e contemporanea distribuzione di esche in una vasta area circostante delle province di Trento, Brescia e Bolzano su una superficie programmata di circa 3.000 km^2. Dal luglio 1986 nessun nuovo caso di rabbia è stato più segnalato in Italia.

Questi risultati non sono il frutto del caso o di fortunate condizioni:

sono il frutto di un vasto e articolato piano di collaborazione tra ricercatori di vari paesi e autorità sanitarie nazionali e internazionali.

Da molti anni la rabbia silvestre preoccupava ed era argomento di studio in Italia. Già dal 1974 al 1980 nel Parco Nazionale del Gran Paradiso (di cui uno di noi — E. Biocca — presiedeva la Commissione Scientifica) era iniziato — in collaborazione con il gruppo di T. Balbo — un vasto programma di studio sul comportamento della volpe ai fini della vaccinazione antirabbica per via orale con il contributo iniziale e per conto della Direzione Generale dei Servizi Veterinari del Ministero della Sanità (Direttore Generale L. Bellani) (Ministero della Sanità, 1975).

Partecipavano a queste ricerche, estese anche ad altre malattie trasmesse da volpi, studiosi e tecnici del Parco, dell'Università di Torino, dell'Università e della Provincia di Roma e dell'Università di Oxford (Biocca *et al.*, 1982). Dal 1980 l'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti di Roma dava inizio a un programma sui Rhabdovirus sotto i molteplici aspetti epidemiologici e virologici, in collaborazione anche con l'Istituto Pasteur di Parigi. Venivano condotte ricerche comparate sull'attività di vaccini vivi e modificati (Flury HEP 176) e vaccini spenti ceppo Pasteur (PV RFB) accanto a ricerche virologiche (Atanasiu *et al.*, 1982; Biocca *et al.*, 1982; Taglia, 1982; Capobianchi *et al.*, 1982). Il riassunto delle prime indagini è stato presentato al Convegno internazionale «La rabbia silvestre nell'Arco Alpino», organizzato dall'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti a St. Vincent (Aosta) nel 1981: le successive indagini sono riferite in questo nostro Convegno da N. Orsi.

Nel 1982 veniva presentato da A. Ruatti, A. Irsara, F. Steck e A. Wandeler (Ruatti *et al.*, 1982) un programma di vaccinazione orale della volpe in provincia di Bolzano, da realizzare con vaccino vivo e modificato (SAD_{BHK21} di Berna). Dopo lungo dibattito al Consiglio Superiore di Sanità, l'autorizzazione veniva rimandata; nel 1984, dietro nuova richiesta della Regione Lombardia, veniva concessa — come è stato ricordato — l'autorizzazione di un primo esperimento di vaccinazione in Val Camonica (provincia di Brescia) e Bolzano (Biocca, 1985) — secondo un dettagliato programma discusso e adottato all'unanimità dal Comitato scientifico e approvato dalla Direzione Generale dei Servizi Veterinari e dal Consiglio Superiore di Sanità. È stato utilizzato il virus SAD_{B19} del «WHO Rabies reference Centre» di Tübingen (Schneider e Cox, 1983; Schneider *et al.*, 1983): rappresentanti di questo Centro (L. G. Schneider e collaboratori) hanno partecipato alle riunioni del nostro Comitato scientifico (Presidente E. Rognoni) e collaborato alla elaborazione del programma.

Il significato della vaccinazione antirabbica orale con vaccino vivo e modificato

Dall'esame delle statistiche pubblicate dal *Rabies Bulletin Europe* (compilato ed editato dal «WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research» presso l'Istituto Federale di Ricerca per le Malattie animali da virus,

a Tübingen, RFT) risulta un dato di interesse fondamentale: i casi di rabbia silvestre osservati nei tre paesi (Svizzera, Germania Federale e Italia) sono diminuiti (in Italia non sono stati più segnalati casi di rabbia dal luglio 1986) in seguito alla vaccinazione antirabbica orale delle volpi e dei selvatici con vaccini contenenti virus vivo e modificato (SAD_{BHK21} di Berna e SAD_{B19} di Tübingen): al contrario i casi di rabbia risultano aumentati nei vicini paesi dell'Est e dell'Ovest — in cui la lotta alla rabbia è stata basata solo sui metodi classici *.

Poiché si tratta di paesi tutti ad alto livello organizzativo e politico non ci sembra che possa essere più proponibile l'ipotesi che la scomparsa della rabbia dal nostro territorio e la diminuzione negli altri paesi che hanno attuato la vaccinazione orale possano essere dovuti solo ad un eventuale andamento ciclico della epidemia, o dall'aver la rabbia raggiunto aree geografiche con alta densità umana e bassa popolazione volpina, o dalla riduzione delle volpi dovuta alla caccia o ad altri interventi, ecc., in quanto tutti questi fattori, senza dubbio importanti, non possono essersi verificati solo nei paesi in cui è stata realizzata la vaccinazione.

Il successo, secondo noi, indiscutibile della vaccinazione orale antirabbica delle volpi e dei selvatici con vaccini vivi e modificati, può essere riportabile soprattutto ai seguenti fattori principali.

1) La immunizzazione delle volpi porta a ridurre indirettamente, cioè senza eliminazione fisica, il numero delle volpi suscettibili alla rabbia al di sotto di quel 0,2-0,3 volpi per km^2 valutato attraverso HIPD (Hunting Index Population Density), indice rozzo ma ritenuto valido ai fini epidemiologici. I risultati della vaccinazione divengono rapidamente evidenti quando esistono situazioni di carattere geografico (catene montuose, grandi fiumi, aree scarsamente popolate da volpi, ecc.), che ostacolano o impediscono i facili contatti o gli spostamenti delle volpi e dei mammiferi selvatici, come riteniamo sia avvenuto nelle nostre zone alpine.
2) Le volpi immunizzate, e rese quindi resistenti alla rabbia, continuano ad occupare e difendere il proprio territorio impedendo così quel «risucchio» di volpi da zone vicine in cui esiste la rabbia, risucchio che segue alle brutali decimazioni delle volpi, come da tempo avevano segnalato molti ecologi specialisti.
3) Esiste ancora, a nostro avviso, un altro importante meccanismo di interesse epidemiologico: la probabile eliminazione, in seguito alla vaccinazione, dei lunghi periodi di incubazione e quindi del periodo di ricomparsa di focolai di rabbia tardivi.

---

* La vaccinazione è stata iniziatia nel 1985 in Austria nella provincia di Voralberg che nel primo quadrimestre 1987 non ha segnalato casi di rabbia: sulla vaccinazione in Austria parlerà E. Scharfen.

Anche in Francia, Belgio e Lussemburgo, è iniziato in settembre-ottobre 1986 un primo limitato esperimento di vaccinazione orale delle volpi (Pastoret *et al.*, 1987), di cui è ancora difficile valutare i risultati e di cui parlerà P. Pastoret.

Già F. Steck, A. Wandeler e collaboratori (Steck *et al.*, in preparazione) avevano osservato, e noi abbiamo confermato nelle nostre campagne di vaccinazione in italia, che «within the epidemic focus an effect of the incidence of rabies became noticeable within one or two months after vaccination. In the border zone to the non-vaccinated area, rabies persisted longer and a few scattered cases occurred up to six months... These may be animals with long incubation period». Le recentissime osservazioni di M. Artois e collaboratori in Francia (Artois *et al.*, 1987) e probabilmente anche quelle di B. Brochier e coll. (Brochier *et al.*, 1987) in Belgio sembrano indicare un accorciamento del periodo di incubazione nelle volpi che hanno ingerito esche vacciniche. È noto infine che animali vaccinati possono ammalare e morire di rabbia prima dei controlli, quando sottoposti a infezione con virus rabbico (early death).

Tutte queste osservazioni sembrano confermare le ipotesi a suo tempo avanzate da un grande maestro di veterinaria, il Finzi, di cui uno di noi (L. Bellani) è stato allievo diretto, cioè che la vaccinazione antirabbica possa evitare parzialmente o totalmente le lunghe incubazioni della malattia.

I RISCHI PAVENTATI SULL'USO DEI VACCINI VIVI E MODIFICATI

Le principali obiezioni contro la vaccinazione antirabbica orale con vaccini vivi e modicati da distribuire nel territorio sono state le seguenti.

1) La vaccinazione orale con virus vivi e modificati potrebbe provocare nelle volpi vaccinate una encefalite vaccinale, la quale renderebbe poi impossibile o difficilissima la diagnosi differenziale tra volpi vaccinate e volpi rabbiose. Questa ipotesi, basata soprattutto in Italia su alcuni risultati di laboratorio contraddittori, si è dimostrata poi del tutto infondata: nessun reisolamento del virus vaccinico è stato possibile dal cervello di volpi e di altri mammiferi raccolti in Svizzera, Germania Federale e Italia nelle zone in cui è stata realizzata la vaccinazione.
2) I virus vivi e modificati usati per la vaccinazione orale possiedono — come sappiamo — una certa patogenicità residua in particolare per animali non bersaglio e quindi potrebbero provocare «rabbia da laboratorio» negli animali selvatici, soprattutto micromammiferi, e potrebbero rivirulentarsi o potrebbero verificarsi mutazioni pericolose.

   Queste obiezioni sono senza dubbio importanti e hanno giustamente meritato la massima attenzione.

   I timori del pericolo di patogenicità residua avevano ricevuto forza soprattutto in seguito alle importanti ricerche di Wachendorfer (1976) sul virus SAD-ERA. In occasione del «Joint CNER-WHO Scientific Meeting on animal rabies» (p. 18) del 3-5 giugno 1981 a Nancy e Malzéville (CNER-WHO, 1981) veniva comunicato che l'uso di vaccini vivi per la vaccinazione orale delle volpi era ancora proibito per legge in Francia.

   Nel gennaio 1982, nonostante i risultati dell'esperimento svizzero condot-

to da F. Steck, A. Wandeler e collaboratori, le autorità governative tedesche ritenevano non sufficienti le garanzie per iniziare l'esperimento nel territorio della Germania Federale (Schneider e Cox, documento non pubblicato); nel maggio 1982 anche l'Istituto Superiore di Sanità, al termine di lunghi controlli sul vaccino svizzero, scriveva che le conclusioni favorevoli nei riguardi della virulenza del ceppo esaminato verso la volpe non lo erano altrettanto nei riguardi degli ospiti non bersaglio, che possono infettarsi con possibilità — è detto nella relazione — «di sostituire ad un danno conosciuto, quale è la persistenza della rabbia selvaggia nelle volpi, un danno ancora sconociuto, quale la possibile diffusione di una rabbia cosiddetta «da laboratorio» nella fauna selvatica». Contemporeamente la Sessione Generale dell'Office International des Epizooties (O.I.E.) tenutasi a Parigi il 24-29 maggio 1982 chiedeva la massima prudenza nel concedere autorizzazioni ed esperimenti con questi vaccini sul territorio. Sono quindi ben comprensibili le ragioni che hanno imposto alle autorità sanitarie italiane rigorosi esami di controllo sui vaccini vivi e modificati, ceppi SAD_{BHK21} di Berna e SAD_{B19} di Tübingen, e le lunghe discussioni al Consiglio Superiore di Sanità prima di autorizzare l'esperimento nel territorio italiano, che ha avuto inizio nel novembre 1984 in Val Camonica. In base agli studi dei colleghi tedeschi, il ceppo SAD_{B19} di Tübingen, utilizzato nella vaccinazione in Germania Federale, Italia e ora anche in altri paesi europei, ha una patogenicità residua in ancora circa il 4,5% dei *Mus musculus*, 5,8% dei *Rattus rattus*, non particolarmente diversa da quella osservata da Steck e Wandeler col virus SAD_{BHK21} di Berna (Schneider e Cox, non pubblicato; Steck e Wandeler, 1982). Questa patogenicità residua però — come le ricerche hanno documentato — non ha un reale significato epidemiologico, così come non ha avuto reale significato epidemiologico la ben più elevata patogenicità residua di ceppi virali modificati e ampiamente usati nella vaccinazione di animali domestici, quali per esempio il ceppo SAD-ERA.

Senza entrare nelle ragioni connesse con il difficile passaggio del virus nelle glandole salivari dei micromammiferi, con le difficoltà di incontri in natura tra questi animali che permettano l'istaurarsi di una epidemia, ecc., già gli esperimenti di A. Wandeler in un'isola disseminata di esche vacciniche contenenti il ceppo SAD_{BHK21} Berna, così come i successivi controlli eseguiti con ceppo SAD_{B19} Tübingen, non hanno finora mai permesso il reisolamento del virus vaccinale dai selvatici, né hanno permesso di evidenziare rivirulentazioni del virus vaccinale.

Non riteniamo necessario insistere sull'argomento se, in data 6-8 ottobre 1986, il Comitato di esperti sulla rabbia nel «Report of WHO workshop on oral immunization of wild-life against rabies in Europe» (Ist. Super. Sanità, 1982) riunitosi a Tübingen con la partecipazione dell'O.I.E. ha modificato le posizioni prudenziali del passato e ha concluso affermando che «Laboratory research between 1973-1978 and field trials since 1978 have not indicated a risk of reversion of the virus to virulence, nor an epidemiological significance of residual pathogenicity of the SAD virus

strains used in the Berne and the Tübingen B19 vaccines... No vaccinal rabies has so far been observed after field application of 2.4 million doses of SAD_{B19} vaccine».
La Francia ha quindi revocato la proibizione di vaccinazione orale delle volpi e dei selvatici, con distribuzione di esche contenenti virus vivo e modificato nel territorio e ha iniziato nell'ottobre 1986 al confine col Lussemburgo un primo esperimento di vaccinazione orale delle volpi con vaccino SAD_{B19} di Tübingen su 720 km^2, insieme al Lussemburgo su 2586 km^2 e al Belgio su 1900 km^2, come verrà illustrato dalla relazione di P. Pastoret.

3) Il vaccino antirabbico vivo e modificato può provocare infezione mortale nell'uomo, soprattutto per via nasale. L'episodio verificatosi negli USA nel 1977 con l'infezione del ricercatore Jerome Andrulonis per inalazione di aerosol, avvenuta durante la preparazione di granuli in cui veniva proiettato vaccino antirabbico, (N. Y. Times, 1977), non può e non deve essere dimenticato e impone tutte quelle misure di precauzione, durante la manipolazione dei vaccini vivi e modificati, per evitare che avvengano simili luttuosi episodi.
Per questa ragione sono sempre state da noi richieste rigorose norme di precauzione (vaccinazione, uso di guanti e maschere, ecc.) a tutto il personale scientifico e tecnico coinvolto in queste ricerche.

Vaccini vivi modificati e vaccini spenti

Indubbiamente allo stato attuale la vaccinazione orale antirabbica delle volpi in Europa con vaccini vivi modificati (ceppo SAD_{B19} Tübingen) rappresenta lo strumento più economico ed efficace per arginare e per debellare l'epidemia di rabbia sostenuta da volpi rosse (*Vulpes vulpes*). Tuttavia possono presentarsi problemi nuovi in quelle aree dell'Europa Orientale e delle regioni polari in cui sembrano aver importanza rilevante anche altre specie animali, rispettivamente *Nycteroides procyonoides* e *Alopex lagopus*, poiché la risposta immunitaria ai diversi ceppi virali modificati e ai diversi metodi di vaccinazione può variare anche da specie animale a specie animale: quindi un ceppo virale modificato e ottimo per immunizzare *V. vulpes* potrebbe non esserlo altrettanto per *N. procyonoides* e *A. lagopus*. Le ricerche quindi su nuovi ceppi virali da usare in aree geografiche diverse e in diverse condizioni ambientali non sono certo esaurite.

La vaccinazione antirabbica per via orale con vaccini spenti, che offrono le maggiori garanzie di sicurezza e al cui studio noi stessi (Biocca, Balbo e collaboratori) abbiamo a suo tempo collaborato, non ha dato finora, a nostro avviso, risultati particolarmente validi e costanti in campo sperimentale — neppure somministrando il vaccino protetto con tecniche alquanto complesse in capsule o pillole gastroresistenti — tali da incoraggiare particolarmente in questa direzione, come si era in un primo momento sperato.

Recentemente sono stati preparati vaccini antirabbici completamente nuovi ottenuti introducendo il gene codificante per la glicoproteina del virus della rabbia sul genoma del virus del vaccino (Kieny *et al.*, 1984): le interessanti osservazioni di J. Blancou e collaboratori del 1986 (Blancou *et al.*, 1986), che ascolteremo dalla sua viva voce e dalla voce di P. Sureau, dimostrano come questi vaccini ricombinanti siano attivi per via orale nelle volpi, e aprano nuovi e importanti campi di studio.

Alcune considerazioni sulla rabbia da pipistrelli insettivori

Esistono, ben lo sappiamo, due forme di rabbia da pipistrelli completamente diverse: la rabbia da pipistrelli ematofagi (genere *Desmodus*) in America latina, e la rabbia o «similrabbia» da pipistrelli insettivori che è presente anche in molti paesi europei.

Uno di noi — E. Biocca — ha avuto il privilegio di collaborare scientificamente per anni in Brasile con A. Carini, lo scopritore della rabbia da pipistrelli ematofagi in America latina, e ha avuto la possibilità di osservare la viscida aggressività dei pipistrelli ematofagi soprattutto durante la Spedizione scientifica italiana nella foresta tropicale americana, che ha diretto per conto del C.N.R. Come sappiamo, la rabbia trasmessa da pipistrelli ematofagi attraverso il morso è responsabile della morte di un impressionante numero di bovini ogni anno nell'interno dell'America latina.

La rabbia dei pipistrelli insettivori osservata in Europa è invece ben diversa: non viene di regola trasmessa da pipistrelli ad altri mammiferi e probabilmente la via abituale di infezione non è attraverso il morso, ma attraverso la via inalatoria. Sebbene il reperto di pipistrelli insettivori infetti con virus rabbico (sierotipo Duvenhage) sia sempre più frequente nelle statistiche riportate dal *Rabies Bulletin Europe* e sebbene molti generi e specie di pipistrelli insettivori siano stati trovati infetti in diversi paesi europei (generi *Eptesicus, Myotis, Nyctalus, Rhinolophus, Pipistrellus*) non sembra esistere alcun rapporto tra rabbia silvestre e rabbia da pipistrelli insettivori, né dal punto di vista etiologico né da quello epidemiologico. Probabilmente sarebbe più opportuno, per evitare confusione soprattutto nel campo epidemiologico, chiamare la virosi provocata da pipistrelli insettivori «similrabbia», lasciando il termine rabbia a quella da pipistrelli ematofagi e a quella silvestre e urbana.

La rabbia da pipistrelli insettivori è un capitolo nuovo di biopatologia di eccezionale interesse scientifico che forse potrà coinvolgere in futuro ancor più la salute pubblica, ma che dovrebbe essere, a nostro avviso — almeno fin quando non si avranno chiare indicazioni contrarie — tenuto ben separato, anche nelle statistiche, dalla rabbia silvestre e dalla rabbia urbana.

Alcune considerazioni conclusive

Desideriamo, prima di concludere, fare alcune considerazioni di carattere generale. La vaccinazione antirabbica orale delle volpi e dei selvatici con vaccino

vivo e modificato, in esche distribuite nell'ambiente, è un metodo di vaccinazione doppiamente rivoluzionario, perché protegge il vettore e coinvolge l'ambiente. Viene così capovolta in questo caso la concezione classica della lotta alle malattie attraverso la distruzione del vettore. Non più infatti distruzione brutale spesso indiscriminata di volpi e altri selvatici per portare le volpi sotto quel livello di 0,2-0,3 per km^2 ritenuto necessario per fermare l'epidemia, ma protezione immunitaria delle volpi per portare sotto il livello di 0,2-03 volpi per km^2 solo le volpi non vaccinate e quindi suscettibili all'infezione. La distribuzione delle esche nell'ambiente ha dato un ruolo fondamentale all'ambiente stesso per la lotta alla rabbia silvestre e probabilmente anche per la lotta alla rabbia urbana e ad altre malattie trasmesse da vettori. La possibilità di eradicare la rabbia, sia silvestre che urbana, con questa metodica non è più da considerare come una possibilità lontana o irrealizzabile.

I risultati oggi raggiunti in questa dura lotta, che coronano anni di studio e di impegno di ricercatori e di autorità sanitarie sono forse il contributo più significativo che possiamo portare oggi al genio di Luigi Pasteur, nel centenario della fondazione dell'Istituto Pasteur.

Questi risultati, di cui noi italiani siamo orgogliosi, non sarebbero stati ottenuti così rapidamente se non ci fosse stato il primo grande esperimento di vaccinazione svizzero e poi quello tedesco, e se il lavoro dei ricercatori non fosse stato da circa 15 anni coordinato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (Dr. K. Bögel) attraverso convegni e riunioni di eccezionale interesse. Il *Rabies Bulletin Europe*, diretto da Schneider, è stato ed è uno strumento prezioso e ormai indispensabile.

Vogliamo ricordare, iniziando questo Convegno sui risultati e le prospettive della vaccinazione orale della rabbia, il collega E. Steck che più di ogni altro ha contribuito per questa vittoria della scienza e della Sanità Pubblica. Egli con A. Wandeler e con gli altri colleghi svizzeri, col coraggio che lo ha accompagnato fino al sacrificio della sua vita, ha superato tutte le critiche e le facili obiezioni contro la vaccinazione con vaccini vivi modificati distribuiti nell'ambiente, che gli venivano anche da massimi specialisti e da importanti risoluzioni di convegni internazionali, e ha assunto la piena responsabilità delle sue decisioni con la forza che viene dalla sicurezza del pensiero scientifico. Gratitudine dobbiamo anche alle autorità sanitarie svizzere che, di fronte alla gravità dei problemi provocati dalla diffusione della rabbia silvestre, hanno concesso l'autorizzazione per lo storico esperimento in territorio elvetico con vaccino vivo e modificato fin dal 1978, quando ancor molti lo consideravano un esperimento rischiosissimo.

Infine un'ultima considerazione: le vie seguite dalla rabbia silvestre per la penetrazione nel territorio italiano sono state nei secoli le stesse vie seguite dalle armate straniere per scendere dal Nord in Italia: Valle Aurina, Val Venosta, Val Camonica. In queste valli gli uomini si sono scontrati e si sono uccisi. Nell'ossario sopra a Ponte di Legno là dove termina la Val Camonica e là dove è stata fermata la rabbia silvestre sono accumulati e riposano resti umani in celle sovrapposte, in ognuna delle quali è scritto «10 soldati italiani»

senza nome, «10 soldati austriaci» senza nome e così via, lungo un gelido muro di pietre, a testimonianza di un'assurda follia criminale, la guerra.

Ebbene, in queste stesse valli ricercatori italiani e tedeschi e, oggi, in questo Convegno ricercatori di gran parte dei paesi europei a struttura socio-economica diversa si sono incontrati e lottano insieme in difesa della vita e dell'uomo. È questo un esempio che vorremmo fosse meditato e seguito anche dai rappresentanti politici e militari di tutti i paesi.

Riassunto. Vengono schematicamente riferiti i risultati delle ricerche di laboratorio su vaccini vivi e su vaccini inattivati per la profilassi della rabbia silvestre, iniziate in Italia fin dal 1975 in collaborazione tra autorità sanitarie (Ministero Sanità, Direzione Generale Servizi Veterinari) e Istituzioni scientifiche (Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti, Università «La Sapienza» di Roma; Institut Pasteur di Parigi; Cattedra di malattie parassitarie, Facoltà di Veterinaria dell'Università di Torino). Vengono inoltre ricordate le osservazioni sulla etologia ed ecologia delle volpi (*Vulpes vulpes*), condotte parallelamente in Piemonte, Val d'Aosta e Lazio. La vaccinazione orale delle volpi con vaccino vivo e modificato (ceppo SAD_{B19} Tübingen) iniziata nelle zone colpite da rabbia della provincia di Brescia nel 1984 è stata estesa alle province di Trento e Bolzano nel 1985. A partire dal luglio 1986 nessun nuovo caso di rabbia è stato segnalato in Italia, primo grande paese europeo ad essersi liberato da questa tremenda malattia attraverso un sistema di profilassi che non si propone di eliminare l'animale vettore (la volpe), ma di immunizzarlo, rendendolo così resistente all'infezione. Vengono quindi discussi, in base ai risultati ottenuti, i molti problemi sollevati nel mondo scientifico e nel mondo sanitario dalla distribuzione nell'ambiente di vaccini antirabbici vivi e modificati, dalla valutazione del significato immunizzante per via orale di vaccini antirabbici inattivati, dai rapporti tra rabbia silvestre e rabbia (o «pseudorabbia») da pipistrelli.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Artois M., Challaïd T., Maillot E., Rigal P. & Blancou J. (1987). Première campagne de vaccination antirabique du renard per voie orale menée en France. Contrôles d'efficacité chez le renard et d'innocuité chez les micromammifères. *Ann. Méd. Vét. 131*: 457-462.

Atanasiu P., Biocca E., Balbo T., Metianu T., Panà A. (1982). Vaccination orale rabique des renards avec un vaccin à virus inactivé. Résultats préliminaires. *Rendic. Ist. Pasteur - Fond. Cenci Bolognetti 1*: 80-84.

Biocca E. (1985). Programma operativo di lotta alla rabbia silvestre nell'Arco Alpino italiano. *Discussione informale, - Comitato scientifico controllo rabbia silvestre della Regione Lombardia, Brescia.*

Biocca E., Balbo T., Lanfranchi P., Peracino V. (1982). Ricerche di etologia sanitaria della volpe ai fini della vaccinazione antirabbica per via orale: esche, segnalazioni acustiche e metodi di cattura. *Rendic. Ist. Pasteur - Fond. Cenci Bolognetti 1*: 84-125.

Biocca E., Balbo T., Metianu T., Atanasiu P. (1982). Vaccination orale rabique des renards avec un vaccin à virus vivant atténué. *Rendic. Ist. Pasteur - Fond. Cenci Bolognetti 1*: 71-77.

Blancou J., Kieny M. P., Lathe R., Lecocq J. P., Pastoret P.P., Soulebot J. P., Desmettre P. (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature 322*: 373-375.

Brochier B., Iokem A., Ginter A., Lejeune E., Costy F., Marchal A., Preharpre D., Couvreur J. M., Dufey J., Kalpers Leonard M., Baudouin B., Desmecht M., Schneider L. G., Pastoret P. P. (1987). Première campagne de vaccination antirabique du renard par voie orale menée en Belgique. Contrôles d'efficacité et d'innocuité chez le renard roux (*Vulpes vulpes* L.) *Ann. Méd. Vét. 131*: 463-472.

Cancrini A., Jori A., Costantini R., Salniccia R., Bagalino S., Persiani A., Ortis M., Corselli A. (1982) Indagini preliminari sulla distribuzione della Trichinelliasi silvestre in 589 volpi della Provincia di Roma. *Parassitologia 24*: 185-189.

Capobianchi M. R., Cioè L., D'Arca S. U., Degener A. M., Divizia M., Dolci A., Mastromarino P., Orsi N., Panà A., Perez-Berkoff R., Rita G., Seganti L., Sinibaldi L. (1982). Per-

spectives of biological and immunological research on rabies virus. *Rendic. Ist. Pasteur - Fond. Cenci-Bolognetti 1*: 19-27.

CNER-WHO (1981). *Joint Scientific Meeting on animal rabies*, on the occasion of the 10th Anniversary of the Centre National d'études sur la rage. Nancy et Malzéville, June 3-5.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (1982). Profilassi della rabbia. Vaccinazione della volpe con vaccino vivo e attenuato per via orale. *24462/14*: 1229 (22.5.1982).

KIENY M. P., LATHE R., DRILLIEN R., SPEHNER D., STORY S., SCHMITT D., WIKTOR T., KOPROWSKI H., LECOCG J. P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccina virus. *Nature 312*: 163-166.

MINISTERO DELLA SANITÀ, Direzione Generale dei Servizi Veterinari *cap. 408*, D.M. 31.12.1975.

N. Y. TIMES (1977). *Genetist's rabies baffles colleagues*. (20.5.1977).

PASTORET P. P., FRISCH R., BLANCOU J., WOLFF F., BROCHIER B., SCHNEIDER L. G. (1987). Campagne internationale de vaccination antirabique du renard par voie orale menée au Grand Duché de Luxembourg, en Belgique et en France. *Ann. Méd. Vét. 131*: 441-447.

RUATTI A., IRSARA A., STECK F., WANDELER A. (1982). Model of a comprehensive plan for a field-trial on oral immunization of foxes. *Informal Discussion, WHO*, Genève sept. 20-22.

SCHNEIDER L. G., COX J. H. Un esperimento sul campo di immunizzazione per via orale delle volpi contro la rabbia nella R.F.T. *Ist. Fed. Ricerca Malattie virali animali, Tübingen* (Documento dattiloscritto, non pubblicato).

SCHNEIDER L. G., COX J. H. (1983). Ein Feldversuch zur oralen Immunizierung von Füchsen gegen die Tollwut in der Bundesrepublick Deutschlands. I. Umschädlichkeit, Wirksamkeit und Stabilität der Vakzine SAD_{B19}. *Tierärtzl. Umschau 38*: 315-324.

SCHNEIDER L. G., WACHENDÖRFER G., SCHMITTDIED E., COX J. H. (1983). Ein Feldversuch... II Plannung, Durchführung und Auswertung des Feldversuchs. *Tierärtzl. Umschau 38*: 476-480.

STECK F., WANDELER A. (1982). Viral characteristics, residual virulence and potential of transmission of the SAD_{BHK21} strain of rabies virus in foxes and non target species. *Informal Discussion, WHO*, Genève sept. 20-22.

STECK A., WANDELER A., BICHSEL P., CAPT S., SCHNEIDER L. Oral immunization of foxes against rabies. A field study (dattiloscritto non pubblicato).

TAGLIA L. (1982). Metodologia anestesiologica e chirurgica per inoculazione intraintestinale di vaccino antirabbico in canidi (*V. vulpes* e *C. familiaris*). *Rendic. Ist. Pasteur - Fond. Cenci Bolognetti 1*: 67-70.

WHO (1987). *Report of a workshop on oral immunization of wild life against rabies in Europe (Intoral)*, with participation of O.I.E. Tübingen oct. 9-10.

Parassitologia 30: 13-17, 1988

ETOLOGIA SANITARIA DELLA VOLPE E VACCINI ANTIRABBICI NELL'ESPERIENZA ITALIANA

T. BALBO

Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Via Nizza 52, 10126 Torino.

Abstract. In order to contribute to the planning of antirabies oral vaccination of foxes a series of ethological and ecological investigations have been carried out. The results obtained are briefly summarized and discussed together with experimental data on antirabies immunization of dogs and foxes with different vaccines.

Key words: ethology, ecology, foxes, antirabies vaccination, Italy.

INTRODUZIONE

Nel quadro delle esperienze italiane ai fini del controllo della rabbia silvestre, il mio intervento si riferisce a fatti ed acquisizioni che precedono di alcuni anni le campagne di vaccinazione antirabbica per via orale nella volpe realizzate nelle province di Brescia, Bolzano e Trento. Questo breve sguardo indietro è volto a dimostrare come gli incoraggianti successi ottenuti in queste campagne abbiano le loro premesse in un lavoro scientifico portato avanti per anni anche nel nostro Paese.

Infatti, nel febbraio del 1975, e precisamente due anni prima che la rabbia silvestre penetrasse sul suolo italiano, l'Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma ed il settore Malattie Parassitarie - Parassitologia Veterinaria dell'Università di Torino presentavano alla Direzione Generale dei Servizi Veterinari del Ministero della Sanità un programma di ricerca sul ruolo giocato dalla volpe come vettore di zoonosi, tra le quali in primo luogo era contemplata la rabbia. Questo programma rappresentava già a quel tempo un momento di sintesi di un lavoro sul campo da anni portato avanti congiuntamente dai proponenti, cioè il Prof. Biocca e chi scrive con i propri collaboratori.

Immediatamente dopo l'approvazione del programma da parte del Ministero, le ricerche hanno subìto un sensibile impulso e sono state portate su un piano di collaborazione interdisciplinare, in quanto già avevamo maturato la convinzione che l'approccio più corretto alle problematiche del controllo della rabbia silvestre, malattia a forte caratterizzazione ambientale, era condi-

zionato da un'esauriente presa di coscienza della pluralità di con-cause che regolano l'epidemiologia dell'infezione.

Così, già nel 1976, dietro nostro invito, sono venuti nel Parco Nazionale Gran Paradiso (PNGP) il biologo David McDonald dell'Università di Oxford ed il Prof. Luigi Boitani dell'Università di Roma «La Sapienza», con il compito di studiare l'etologia della volpe nel contesto territoriale che costituiva il principale teatro delle nostre ricerche. Nello stesso anno, noi coinvolgevamo nel programma altri collaboratori, che per un verso o per l'altro risultavano buoni conoscitori della fauna selvatica e delle problematiche ad essa connesse: sono stati soprattutto il Corpo Guardaparco del PNGP ed il Corpo Guardacaccia della Provincia di Roma ad offrire la partecipazione più incisiva e continuativa nel tempo. Negli anni successivi, il proseguimento del programma di ricerche, di volta in volta patrocinato dal Ministero della Sanità, dal PNGP e dalla Fondazione Istituto Pasteur-Cenci Bolognetti dell'Università di Roma, ci ha indotti, per la dilatazione delle problematiche comportate, a lavorare in collaborazione con il Centre International d'Etudes su la Rage dell'Istituto Pasteur di Parigi e con l'Istituto d'Igiene dell'Università di Roma «La Sapienza».

Complessivamente, queste ricerche sono state portate avanti lungo le seguenti due direttive principali.

1) Ricerche etologiche ed ecologiche finalizzate alla vaccinazione antirabbica per via orale della volpe.
2) Prove in laboratorio di vaccinazione antirabbica di cani e di volpi, usando vaccini di differente formulazione, veicolati in differenti supporti e somministrati per differente via.

Riassumiamo brevemente qui di seguito i principali risultati ottenuti con questo lavoro, inviando il lettore agli Atti del Simposio Internazionale sulla Rabbia Silvestre di Saint Vincent (1981), nei quali la maggior parte di essi è stata descritta nei dettagli.

Ricerche etologiche ed ecologiche finalizzate alla vaccinazione antirabbica per la via orale della volpe

Fin dal primo momento del nostro lavoro su campo, abbiamo avuto chiara percezione che, se l'etologia della volpe poteva portare un contributo anche prezioso alla conoscenza del principale vettore della rabbia, tuttavia, ai fini immediati di un intervento di vaccinazione su campo, era di maggiore utilità lo studio del comportamento della volpe di fronte alle manipolazioni dell'ambiente legate appunto a questo intervento; studio che, proprio per la sua peculiare finalizzazione è stato da noi denominato «etologia sanitaria». Abbiamo, perciò, immediatamente dato inizio a ricerche finalizzate ai seguenti due obiettivi:

a) Studio del comportamento delle volpi di fronte ad esche di differente natura e collocate in differenti condizioni ambientali e sperimentali.

b) Studio di diversi sistemi di cattura e loro impatto sul comportamento della volpe.

Nello studio di cui al punto *a*) sono state usate esche di differente natura (teste di pollo, pesce affumicato, frutta secca, cioccolato, formaggio, micromammiferi ed uccelli vivi), sperimentando in differenti situazioni, cioè collocando un solo tipo di esca per ogni area di studio, oppure più tipi di esca abbinati nella stessa area; nascondendole con fogliame o con terra, oppure legandole ad arbusti o tronchi d'albero; collocandole solo lungo sentieri, oppure sull'intera area di studio; distribuendole in differenti ore della giornata ed in differenti stagioni; ecc.

Questa sperimentazione ed il rilevamento e l'interpretazione dei dati da essa scaturiti hanno comportato un lungo lavoro su campo, da noi portato avanti con la collaborazione di alcuni tecnici faunistici per più anni, dopo il quale abbiamo acquisito alcuni elementi conoscitivi di grande importanza per un intervento su larga scala di vaccinazione antirabbica dei carnivori selvatici nell'ambiente. In modo particolare, meritano di essere sottolineate le seguenti osservazioni.

— Fondamentalmente la volpe si abitua a qualsiasi tipo di esca e comunque essa venga collocata: soltanto la copertura con uno spesso strato di terra può ritardarne l'asportazione. Questa osservazione è di grande importanza, perché sappiamo che il tipo di esca utilizzato è in grado di interferire sia sul potere antigene sia sulla stabilità dei vaccini.
— Nella maggiore parte delle situazioni ecologiche ed atmosferiche la asportazione delle esche avviene in tempi abbastanza brevi. Infatti, nei primi tre giorni ne viene asportato il 40-50% ed in 6-7 giorni il 90-100%. Ad assuefazione avvenuta, il che si verifica in una settimana circa, questi tempi si riducono fino al prelievo di tutte le esche in 24-48 ore.
— La distribuzione lungo i sentieri comporta la rapida asportazione di un maggior numero di esche, il che lascia presumere che un solo animale possa essere il responsabile del prelievo di più esche, per cui ai fini della vaccinazione è preferibile la distribuzione casuale di queste.
— Esiste una competizione tra volpe, carnivori selvatici e domestici (randagi) e corvidi per queste esche, però con una netta predominanza della volpe.

Anche lo studio di cui al punto *b*), cioè quello dei mezzi di cattura più ideonei per il controllo dell'immunizzazione della volpe, ha richiesto alcuni anni di lavoro su campo ed in officina. Il fine ultimo di questa sperimentazione era quello di individuare un sistema di monitoraggio che fosse efficiente, economico e non traumatizzante l'emotività pubblica. Abbiamo, pertanto, studiato comparativamente più mezzi di cattura in differenti situazioni: trappole a cassetta, trappole a ganasce, lacci a scorrimento bloccato, tiro di notte, ecc. I lacci a scorrimento bloccato sono stati approntati nell'officina dell'Università di Roma «La Sapienza» e sperimentati su campo sia in zona di alta montagna che in zona di pianura o collina.

I risultati a cui siamo pervenuti con questo lavoro possono essere riassunti come segue.

— Le trappole a cassetta non sono di facile utilizzazione per la cattura di un numero considerevole di volpi, perché sono troppo ingombranti (quelle di legno) o perché vengono evitate dalle volpi (quelle di metallo).
— Le trappole a ganasce sono da evitare perché troppo traumatizzanti.
— I lacci a scorrimento bloccato possono consentire, soprattutto se usati in zone ricche di vegetazione arborea o cespugliosa, la cattura degli animali senza provocare loro traumi, per cui non determinano impatto sull'emotività pubblica, ma richiedono una collaudata esperienza nella collaborazione, cioè richiedono personale adeguatamente specializzato.
— Il tiro con il fucile, soprattutto se effettuato di notte, consente un campionamento esauriente per ogni area di studio, ma richiede la collaborazione delle associazioni venatorie o la disponibilità di un sufficiente numero di tecnici (guardacaccia): nell'un caso e nell'altro, ma soprattutto nel primo, esso provoca impatto sull'emotività pubblica.
— Questi mezzi di cattura, ad eccezione del fucile, interferiscono più o meno profondamente sul comportamento della volpe, tanto da dissuaderla dal prelievo delle esche alle quali era perfettamente abituata fino al giorno prima dell'attivazione dei mezzi stessi, oppure da indurla ad abbandonare con la cucciolata la tana in vicinanza della quale essi sono stati collocati.

Immunizzazione antirabbica di cani e volpi con vaccini di differente formulazione, veicolati in differenti supporti e somministrati per differente via

La scelta di un vaccino da impiegare su larga scala per l'immunizzazione antirabbica della volpe in natura costituisce il momento più delicato della pianificazione dell'intervento, perché a tutt'oggi non è ancora stato individuato il vaccino ideale, cioè il vaccino che assomma in sé un sicuro potere antigene, un'assoluta innocuità per tutti i potenziali fruitori presenti nell'ecosistema ed una incondizionata resistenza agli agenti atmosferiti; e delicata questa scelta appariva soprattutto negli anni '70, quando la sperimentazione sui vaccini antirabbici attivi per via orale era ancora confinata nei limiti perimetrali dei laboratori.

È appunto sul finire di questo decennio che noi, in collaborazione con l'Istituto Pasteur di Parigi e l'Istituto d'Igiene dell'Università di Roma «La Sapienza», abbiamo dato inizio ad una sperimentazione volta a:

1) studiare l'efficacia del vaccino antirabbico attenuato ottenuto dal ceppo Flury HEP 176/BHK e somministrato per via orale a volpi e cani;
2) studiare l'efficacia di un vaccino antirabbico ottenuto dal ceppo Pasteur (PV/RFB), inattivato con betapropiolattone, incorporato in capsule o pillole gastro-resistenti e quindi somministrato per via orale;
3) studiare comparativamente il titolo di sieroconversione ottenuto in 26 cani con la somministrazione attraverso differenti vie (intradermica, nasale, intramuscolare) del vaccino.

Tutte le prove sono state effettuate nei laboratori dell'Istituto di Parassitologia dell'Universrità di Roma «La Sapienza» e la sieroconversione è stata valutata presso l'Istituto d'Igiene dell'Università di Roma «La Sapienza» e, per alcune prove, anche presso l'Istituto Pasteur di Parigi.

Le ricerche di cui al punto 1) hanno dimostrato che il vaccino attenuato da noi usato, portato a contatto della mucosa orale, determinava una sieroconversione dose-dipendente, cioè più elevata usando titoli virali più elevati.

Dalle ricerche di cui al punto 2) è emerso che il vaccino inattivato da noi usato, dotato di elevato potere antigene se somministrato intramuscolo, era anche in grado di provocare nella volpe (meno regolarmente nel cane) una significativa sieroconversione quando veniva somministrato per via orale racchiuso in capsule o pillole gastro-resistenti.

Le ricerche di cui al punto 3), tuttora in corso, hanno mostrato l'interesse della via intradermica di somministrazione del vaccino per la profilassi della rabbia.

Parassitologia 30: 19-28, 1988

L'ESPERIENZA ITALIANA NEL CONTROLLO DELLA RABBIA. I. LAVORO OPERATIVO

A. RUATTI[1], M. PONZANELLI[2], M. ALLEGRETTI[3], F. MENGON[4], C. COSTANZI[3]

[1] *Direzione dei Servizi Veterinari, Bolzano*; [2] *Servizio Provinciale Coordinamento, Brescia*; [3] *Direzione dei Servizi Veterinari, Trento*; [4] *USL C5, Valle dell'Adige.*

Abstract. Oral vaccination of foxes associated with their control has been shown to be a rapid and safe method to estinguish enzootic foci of sylvatic rabies and to prevent the entry and spreading of this zoonosis in free zones of Italy. Domestic animals' vaccination with live modified vaccines in zones with sylvatic rabies has proved to be highly effective in limiting the cases, recorded only in non-vaccinated animals.

Key words: foxes, control, antirabies vaccination, domestic animals, Italy.

EPIZOOLOGIA

L'Italia è stata interessata dall'epizoozia di rabbia silvestre dal febbraio del 1977 fino al giugno del 1986. Per prima è stata investita la provincia di Bolzano dall'ondata epizootica proveniente dall'Austria, dalla regione di Salisburgo. Si è costituito un fronte epizootico che ha interessato due province (Bolzano e Belluno) e che si è estinto nel 1979. Il secondo fronte epizootico, anche questo proveniente dall'Austria, dalla Carinzia, si è costituito nel 1978 nella regione Carnica in provincia di Udine. Questo fronte nel 1981 si è congiunto con un fronte epizootico proveniente dalla Jugoslavia e che investì le province di Trieste e Gorizia. Questo secondo fronte si è esaurito nel corso del 1984.

Nel 1980 dal Tirolo austriaco è penetrato in Italia un nuovo fronte epizootico che ha interessato nuovamente la provincia di Bolzano e nel 1983 la provincia di Trento. Questo focolaio nella parte più a sud (Trentino) si è estinto nel 1986. Nel 1981 dalla Svizzera (Cantone dei Grigioni) è penetrato nella Lombardia un nuovo fronte di rabbia silvestre che si è estinto nel 1985. Nel 1984 infine, un fronte epizootico penetrato dalla Francia nella Valle d'Aosta si è estinto dopo qualche mese dalla sua apparizione.

Lotta all'epizoozia di rabbia silvestre

Profilassi diretta

In Italia fino 1984 la lotta per combattere l'epizoozia di rabbia silvestre si è basata quasi esclusivamente sulla profilassi diretta sviluppatasi attraverso lo sfoltimento della volpe rossa.

Il diradamento di questo selvatico nelle diverse regioni italiane interessate dalla rabbia è stato effettuato quasi esclusivamente con il fucile. Sono stati usati anche veleni (stricnina, cianuro di potassio) ma in misura modesta in quanto mezzi pericolosi e per lo più proibiti. L'uso di trappole è stato molto limitato. Generalmente la caccia alla volpe è stata effettuata dai guardiacaccia ma in talune regioni è stato decisivo l'intervento dei cacciatori. Ogni regione ha organizzato la lotta a questo selvatico autonomamente, in base ad un calendario venatorio stabilito dalle rispettive autorità competenti per la caccia. La caccia alla volpe è stata incentivata in ogni regione mediante la concessione di un premio che andava da un minimo di Lire 20.000 per ogni animale abbattuto ad un massimo di Lire 100.000.

In talune regioni una maggiore incentivazione è stata tuttavia attuata nelle zone interessate dall'epizoozia ed in quelle direttamente minacciate nei mesi di novembre, dicembre, gennaio e febbraio per motivi profilattici intesi a disincentivare il commercio di pelli di volpe, potenzialmente pericolose per l'uomo e per colpire maggiormente questo selvatico nella stagione degli amori. Nei mesi di giugno e luglio, in coincidenza con la presenza delle cucciolate, nelle stesse zone, il premio veniva nuovamente aumentato per stimolare la caccia nel momento cruciale della vita della volpe.

È risultato infatti di grandissima importanza la caccia nell'epoca delle cucciolate, momento in cui si ha il passaggio dell'infezione da una generazione all'altra (dalla madre ai cuccioli). L'abbattimento dei cuccioli è inoltre importante in quanto, eliminandoli, si provoca un invecchiamento naturale della popolazione volpina restante e con esso un suo conseguente sfoltimento fisiologico per cause naturali. In pari tempo si ha una minore spinta espansiva dell'epizoozia per mancanza di volpacchiotti in cerca del proprio territorio di vita. Per questi motivi il momento più intenso della lotta alla volpe in alcune regioni avveniva nei mesi di giugno e luglio.

Il lato debole di questo metodo di lotta alla rabbia silvestre sta nel fatto che la caccia è basata sul volontarismo e dipende dalla disponibilità e dall'impegno non solo delle singole sezioni di cacciatori ma anche di quella del singolo cacciatore. Inoltre entrano in gioco altri fattori, come la presenza di parchi naturali dove la caccia alla volpe viene in genere ostacolata, l'estensione e la natura dell'ambiente, nonché altre cause imponderabili. Per questo il metodo della caccia alla volpe, dove si è potuto applicare, pur essendo risultato ottimo se attuato in forma razionale e costante, presenta i suoi limiti e non offre sempre quella sicurezza a cui aspira l'autorità sanitaria allorché deve affrontare una grave malattia diffusiva. Altro grave limite di questo metodo per avere un successo sicuro è l'impiego di tempi imprevedibili, generalmente

molto lunghi. Si è constatato comunque che esso resta pur sempre, anche quando non riesce a bloccare prontamente l'epizoozia, un metodo capace di ridurne la virulenza, diminuendo sul territorio la presenza di serbatoi diffusori di virus e conseguentemente i problemi da essi derivanti.

È qui importante far rilevare che il diradamento della volpe causato naturalmente dall'epizoozia di rabbia e dalla caccia organizzata non ha avuto conseguenze durature. Si può affermare che questo selvatico attualmente è presente nelle zone già interessate dall'epizoozia di rabbia silvestre nella stessa densità di prima dell'epizoozia.

Profilassi indiretta

La profilassi diretta è stata accompagnata in tutti i territori interessati dall'epizoozia, da una intensa profilassi indiretta che si è esplicata attraverso la vaccinazione antirabbica obbligatoria degli animali domestici ivi presenti, intesa a creare una barriera di animali immunizzati attorno all'uomo.

La vaccinazione dei cani è stata effettuata nei territori interessati dall'epizoozia e in quelli ad essa adiacenti usufruendo del vaccino Flury Lep e del vaccino ERA. La vaccinazione degli equini, bovini, ovini e caprini è stata effettuata con il ceppo ERA solo nelle zone invase dall'epizoozia ed in quelle direttamente minacciate. Essa veniva effettuata immediatamente prima della stagione del pascolo al fine di assicurare all'animale un'efficiente protezione dato che lo stato immunitario tende a diminuire con il passare del tempo.

L'uso del vaccino ERA ha dato luogo a sporadici casi di complicazioni di tipo nervoso sia in cavalli che in bovini. Questi fenomeni apparsi dopo il 20°-24° giorno dalla vaccinazione talvolta si sono risolti spontaneamente; talvolta invece sono stati seguiti da paralisi di tipo irreversibile che hanno costretto ad abbattere l'animale. Gli esami di laboratorio hanno messo in evidenza con anticorpi monoclonali il virus vaccinale nel cervello di uno solo di questi animali. Tale virus non è stato però mai isolato dalle ghiandole salivari.

È comunque da ricordare che il vaccino ERA con il quale sono stati vaccinati oltre due milioni di animali nel periodo in cui è stata presente la rabbia silvestre in Italia, e cioè dal 1977 al 1986, ha dimostrato una buona attività immunizzante limitando in maniera significativa l'insorgenza di casi di rabbia fra gli animali domestici (Tabella 1).

Non sono certamente i pochi casi di complicazioni causate dal virus vaccino che hanno importanza bensì la difesa immunizzante complessiva che questo vaccino ha saputo dare agli animali vaccinati ed indirettamente alla tutela della salute dell'uomo.

Vaccinazione della volpe per via orale

I buoni risultati ottenuti in Svizzera dal prof. Steck e dal dott. Wandeler dell'Istituto di Microbiologia di Berna, nella sperimentazione di vaccinazione antirabbica della volpe per via orale, effettuata nel Vallese fra il 1978 ed

TABELLA 1 - Rabbia silvestre in Italia. Ultimo caso di rabbia-positivo: 11 luglio 1986.

Anni Animali positivi	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	Totale	%
Selvatici												
Volpi	82	203	60	10	319	290	403	315	101	22	1805	(87,3)
Mustelidi	5	25	10	1	36	43	31	28	15	5	199	(9,7)
Erbivori	12	21	7	1	7	5	4	2	2	1	62	(3,0)
Roditori	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	(0,0)
Totale	99	249	77	12	362	338	439	345	118	28	2067	(98,4)
Domestici												
Cani	—	—	—	—	—	4	4	4	1	—	13	(38,2)
Gatti	—	1	1	—	2	3	3	2	2	—	14	(41,2)
Ovicaprini	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	2	(5,9)
Bovini	—	—	—	—	2	—	—	1	1	—	4	(11,8)
Equini	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	(2,9)
Totale	—	1	1	—	4	8	9	7	4	—	34	(1,6)
Totale generale	99	250	78	12	366	346	448	352	122	28	2101	(100)

il 1982 usando il vaccino vivo attenuato SAD_{BHK21}, hanno indotto in quel tempo la provincia di Bolzano a programmare ed a organizzare sul proprio territorio una sperimentazione analoga. Venne quindi approntato un programma, elaborato in seno all'O.M.S., con la collaborazione del prof. Steck e del dott. Wandeler, che venne inviato per la relativa autorizzazione al Ministero della Sanità. L'autorizzazione venne subordinata ad un controllo sull'efficacia e sull'innocuità del ceppo vaccinale SAD_{BHK21}. Furono pertanto avviati questi controlli da parte dell'Istituto Superiore di Sanità che vennero completati entro il 1983 e che verranno illustrati a parte con apposita relazione da parte dei ricercatori di quell'Istituto.

Nel frattempo però il fronte epizootico si spostò dalla provincia di Bolzano verso sud, interessando la provincia di Trento. Venne a mancare quindi la possibilità di effettuare in maniera significativa questa sperimentazione in provincia di Bolzano. In pari tempo la provincia di Brescia interessata dal fronte epizootico di rabbia silvestre penetrato dalla Svizzera attraverso la Valtellina, inoltrò al Ministero della Sanità per la prescritta autorizzazione, un programma di sperimentazione da effettuarsi nella Valle Camonica, con lo scopo di arrestare verso sud questa epizoozia.

A seguito dell'autorizzazione avuta in data 5 novembre 1984, preceduta dai pareri favorevoli del Consiglio Superiore di Sanità del 22 febbraio e del 6 settembre, venne effettuata la prima sperimentazione della vaccinazione antirabbica della volpe per via orale in Italia.

La programmazione in provincia di Brescia venne impostata sulla base delle possibilità operative offerte dal vaccino SAD_{B19} dell'Istituto Federale di Ricerche di Tübingen, sotto la supervisione del centro di referenze per la rabbia dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

Programmazione

La programmazione ha previsto un periodo preparatorio, un periodo esecutivo ed un periodo postesecutivo di controllo.

Periodo preparatorio

Durante il periodo preparatorio della durata di 6 mesi circa, si è dovuto organizzare nei dettagli tutta l'operazione sperimentale:

— Autorizzazione del Ministero della Sanità.
— Istituzione del Comitato coordinatore della sperimentazione del quale fanno parte Organi ed Enti che partecipano alla sperimentazione.
— Nomina della direzione tecnico-organizzativa.
— Indicazione dell'Istituto o degli Istituti predisposti per il controllo della sperimentazione stessa.
— Indicazione dell'impianto frigo per il deposito delle esche vaccinali.
— Indicazione dei centri operativi per il trasporto e la distribuzione delle esche.
— Scelta del territorio della sperimentazione (fronte epizootico, zona preepizootica).
— Domanda al Ministero della Sanità e relativa autorizzazione ad importare il vaccino dalla Germania Federale.
— Suddivisione dell'area di sperimentazione in zone operative in ognuna delle quali deve agire una équipe.
— Indicazione dei centri di raccolta dei selvatici trovati morti o abbattuti nelle zone di sperimentazione.
— Richiesta delle esche vaccinali all'Istituto produttore.
— Predisposizione delle operazioni doganali per l'importazione del vaccino.
— Preparazione del materiale necessario per la distribuzione delle esche (guanti, borse termostatiche, cartine topografiche) da consegnare alle diverse équipes.
— Preparazione dell'attività divulgativa mediante: *a*) informazione ed istruzione dei veterinari e dei medici igienisti della zona di sperimentazione; *b*) informazione dei Sindaci, Comandi di polizia, Comandi forestali, Associazioni cacciatori della zona di sperimentazione; *c*) informazioni alla popolazione della zona di sperimentazione; *d*) manifestini da distribuire agli allievi delle scuole elementari e medie, residenti nelle zone di sperimentazione; *e*) manifesti da affiggere nei comuni di sperimentazione.
— Scelta e preparazione tecnica della équipe.
— Preparazione delle carte topografiche (1:25.000) indicando sulle stesse i punti dove depositare le esche, nonché le zone di controllo.
— Predisposizione di un automezzo-frigo per il prelievo e trasporto delle esche vaccinali.

— Scelta della data dell'azione.
— Delimitazione della zona di sperimentazione con appositi avvisi.
— Attuazione in questa zona di un periodo di lotta intensa al randagismo dei cani e dei gatti.
— Trasporto delle esche dall'Istituto produttore al deposito.
— Distribuzione ad ogni équipe del materiale necessario (guanti, carta topografica, ecc.).

Fase esecutiva

Mattino: distribuzione delle esche in contenitori termoisolanti. Posa delle esche secondo l'apposito schema distribuito alle équipes.
Sera: raccolta delle carte topografiche delle diverse équipes con le indicazioni in esse delle esche posate.

Fase postesecutiva di controllo

1) Controllo della percentuale di esche asportate in 4ª, 8ª e 14ª giornata.
2) Controllo della stabilità del virus vaccino mediante la raccolta di esche in 4ª, 8ª e 14ª giornata.
3) Raccolta dei selvatici nelle zone della sperimentazione ed in quelle confinanti ad esse da iniziarsi al 30° giorno dopo la posa delle esche per i seguenti controlli: *a*) numero di volpi che hanno assunto l'esca mediante la ricerca della sostanza marcatrice (clorotetraciclina); *b*) numero di volpi che risultano immunizzate attraverso il controllo del titolo anticorpale (RFFIT); *c*) tipizzazione dei virus isolati dalle volpi, da altri selvatici o da animali domestici raccolti nelle zone della sperimentazione; *d*) ricerca della presenza del virus vaccinale nei micromammiferi raccolti nella zona di sperimentazione.
4) Valutazione dalla sperimentazione attraverso: *a*) la stima della percentuale di volpi che hanno assunto l'esca e rispettivamente delle volpi che sono state effettivamente vaccinate; *b*) l'influenza dell'azione vaccinale sul decorso dell'epizoozia; *c*) la registrazione degli inconvenienti incontrati durante la sperimentazione; *d*) il miglioramento organizzativo dell'azione vaccinale; *e*) l'analisi dei costi e dei benefici.

Le azioni vaccinali effettuate in Italia hanno seguito questo schema organizzativo.

Inoltre la programmazione tenne conto dei risultati di una precedente prova in bianco portata a termine in Val Camonica, su disposizione del Ministero della Sanità, per collaudare le operazioni relative alla sperimentazione stessa. Per controllare la sperimentazione, la regione Lombardia nominò un Comitato tecnico-scientifico multidisciplinare, di cui faveva parte un rappresentante dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Questo Comitato, sulla base dei dati forniti dal Centro di referenza dell'O.M.S., propose l'uso del vaccino SAD_{B19} di Tübingen, soprattutto per la sua stabilità in campo, legata allo stipite vaccinale, clonato dal SAD_{BHK21} di Berna. Venne stabilito che

la vaccinazione oltre che essere effettuata davanti al fronte epizootico per costituire una barriera alla sua progressione, venisse effettuata anche nel territorio interessato dall'epizoozia con lo scopo di provocarne una rapida estinzione.

La prima campagna vaccinale in provincia di Brescia, diretta operativamente dal dott. Mario Ponzanelli del Servizio Provinciale Coordinamento Tecnico, è avvenuta dal 27 al 30 novembre 1984 distribuendo, con l'intervento di 36 squadre, 7.500 esche su una superficie di 700 km^2 comprendenti 45 comuni. Il vaccino, importato dall'Istituto Federale di Ricerche di Tübingen (Germania Federale), confezionato in capsule, è stato previamente controllato (titolo virale ed innocuità) dall'Istituto Superiore di Sanità. Le esche-vaccino, costituite da teste di pollo, sono state preparate presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia la sera antecedente la distribuzione. Nella cavità oro-faringea di ogni testa di pollo è stata inserita la capsula vaccinale e nella cavità retro-orbitale sono stati iniettati 150 mg di sostanza marcante (ossitetraciclina). L'intervento di posa delle esche-vaccino è stato preceduto da un'ampia azione informativa e da una particolare lotta al randagismo, condotte dal Servizio Veterinario delle UU.SS.LL. interessate coordinata dal Servizio Provinciale Coordinamento Tecnico per la Medicina Veterinaria. L'informazione ha avuto carattere precauzionale per la popolazione residente e la lotta al randagismo ha avuto lo scopo di eliminare potenziali antagonisti nell'assunzione delle esche. L'esecuzione dell'azione vaccinale è stata seguita da una rappresentanza del Comitato Tecnico Scientifico mediante sopralluoghi sul campo.

Terminate le operazioni di posa, si è proceduto alla valutazione della sperimentazione stessa attraverso le seguenti operazioni:

a) Rilievo percentuale di assunzione delle esche mediante accertamento della loro asportazione in campo.
b) Recupero di esche dal campo per il controllo della stabilità del virus-vaccino esposto alle condizioni ambientali.
c) Monitoraggio postvaccinale delle volpi:
- Abbattimento di una volpe ogni 10 km^2 circa.
- Esame mediante immunofluorescenza per l'evidenziazione di virus rabido (da strada o vaccinale).
- Prova biologica su topino e reisolamento su coltura di tessuto.
- Rilievo della presenza di tetraciclina nelle ossa dei soggetti monitorati per il calcolo dell'indice di assunzione delle esche.
- Rilievo dell'indice di sieroconversione mediante RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) per valutare lo stato immunitario raggiunto dai soggetti monitorati a partire dalla 4ª settimana e sino alla 24ª dalla posa delle esche.
- Cattura dei microroditori sul campo per la ricerca di virus vaccinale.

Questa prima campagna vaccinale venne seguita sempre nella Val Camonica da una seconda sperimentazione per consolidare l'ottimo successo conseguito con la prima. Infatti, l'ultimo caso di rabbia venne accertato in Val Camonica il 21.12.1984 (Malonno) alcuni giorni dopo la conclusione della posa sul campo delle esche vaccinali. La seconda campagna vaccinale, effettua-

ta alla fine di maggio 1985, venne ripetuta nella stessa zona dove si effettuò la prima, seguendo le medesime modalità.

Dopo questa sperimentazione, conclusasi positivamente sia dal lato organizzativo che dal lato tecnico, un analogo intervento venne esteso alla regione Trentino-Alto Adige dove, nella provincia di Trento, era attivo l'ultimo fronte epizootico di rabbia in Italia. Venne quindi autorizzata dal Ministero della Sanità, in data 7 maggio 1986, una nuova sperimentazione con lo scopo di estinguere questo focolaio che minacciava di spostarsi a sud verso le province di Verona e di Brescia. Venne programmata una vasta operazione vaccinale all'interno del focolaio ed attorno allo stesso. A questo scopo nel mese di maggio e di giugno nel 1986 sono state portate a termine in maniera autonoma, ma coordinate dal Comitato Tecnico Scientifico, le operazioni vaccinali nelle province di Trento, Bolzano e Brescia.

L'ultimo caso di rabbia in quest'ultimo fronte epizootico si ebbe l'11 luglio 1986, alcuni giorni dopo la conclusione della posa delle esche vaccinali. Il consolidamento di questo risultato venne fatto con la ripetizione in provincia di Trento della sperimentazione nei mesi di marzo ed aprile 1987.

La programmazione e le varie fasi della sperimentazione portata a termine per la prima campagna vaccinale in provincia di Brescia sono state eseguite nelle stessa forma anche per quelle successive effettuate in provincia di Trento e di Bolzano. A partire dalla terza campagna vaccinale di Brescia (1986)

TABELLA 2 - Campagne di vaccinazione contro la rabbia per via orale nella volpe.

Provincia	BS	BS	BS	BZ	TN	TN
Giorni Mese Anno	27-30 nov. 1984	28-31 maggio 1985	26-30 maggio 1986	20-23 maggio 1986	16-19 giugno 1986	23 marzo 18 aprile 1987
Comuni N.	45	45	73	3	89	73
km^2	700	700	1350	78	1800	764
Esche N.	7500	7500	16000	1108	18284	9955
Squadre N.	36	36	111	4	83	—
Assunzione esche	61%	85%	67%	83%	50%	50,81%
a 4 giorni	26	32	22	25	18	17,9
a 8 giorni	16	36	25	28	15	16,8
a 14 giorni	19	17	20	30	17	16,0
Esche per controllo virus a 4-8-14 gg.	10	10	16	3	15	11
Volpi catturate N.	46	21	81	10	142	89

e dalla prima di Trento e Bolzano, è stata utilizzata una nuova serie di vaccino confezionato direttamente dall'Istituto Federale di Ricerca di Tübingen, in esche-saponette a base di farina di pesce e grassi animali.

L'evoluzione epizoologica nelle zone di sperimentazione è stata continuamente seguita da un accurato monitoraggio diagnostico. Nell'ambito della sperimentazione è stato effettuato anche un controllo a campione di micromammiferi catturati in prossimità della dislocazione delle esche al fine di ricercare l'eventuale presenza di virus vaccinale nel cervello. Nella tabella 2 sono riassunti i dati delle campagne vaccinali antirabbiche della volpe.

La spesa complessiva delle azioni vaccinali antirabbiche delle volpi, sostenuta dalle relative province, ammonta complessivamente a lire 267.669.385, di cui 175 milioni per la provincia di Brescia, dove sono state distribuite nelle rispettive tre azioni vaccinali 31.000 esche; lire 95.169.385 per la provincia di Trento, dove sono state distribuite in due azioni vaccinali 28.239 esche; e lire 2.500.000 per la provincia di Bolzano, dove sono state distribuite 1.108 esche. Per ogni esca distribuita la spesa è stata di lire 5.645 per la provincia di Brescia, di lire 3.370 per la provincia di Trento e di lire 2.256 per la provincia di Bolzano. La differenza dei costi dipende in gran parte dalla spesa del personale. Dove le operazioni si sono svolte con personale della pubblica amministrazione (Dipartimento delle Foreste, Guardiacaccia dell'Amministrazione provinciale e della Federazione Caccia) le spese sono risultate inferiori.

Conclusioni

L'epizoozia di rabbia silvestre è penetrata in Italia nel 1977 e si è estinta nel 1986. Il monitoraggio è stato fondamentale per impostare la profilassi diretta intesa a diminuire il serbatoio diffusore del virus rabido e ad impostare le campagne di profilassi vaccinale degli animali domestici e quelle delle volpi mediante un vaccino orale.

Con il diradamento della popolazione volpina si è riusciti in alcune regioni ad arrestare ed estinguere l'epizoozia (Valle d'Aosta, Friuli Venezia Giulia, Veneto, provincia di Sondrio, Como, Bergamo e provincia di Bolzano); in altre invece si è avuto lo stesso successo associando allo sfoltimento nelle volpi, la loro vaccinazione per via orale. In definitiva con l'immunizzazione attiva delle volpi si è riusciti ad annullare in maniera rapida il potenziale diffusivo insito in questo selvatico che non si era riusciti ad eliminare con il loro diradamento.

La vaccinazione della volpe per via orale effettuata in zone alpine confrontabili a quelle elvetiche, associata allo sfoltimento di questo selvatico, ha quindi indicato la strada più veloce per estinguere i focolai enzootici di rabbia silvestre e per impedire la penetrazione di questa epizoozia in zone indenni.

La vaccinazione antirabbica degli animali domestici mediante vaccini vivi attenuati ha dimostrato di essere un metodo efficace, riducendo i casi di rabbia a danno di questi animali ad un numero trascurabile. Praticamente in

questi 9 anni in cui l'Italia è stata interessata dall'epizoozia di rabbia silvestre sono stati accertati 34 casi di rabbia in animali domestici pari all'1,6% e 2067 in animali selvatici pari al 98,4% dei casi di rabbia accertati. Di questi 34 animali domestici risultati infetti da rabbia, si deve sottolineare che i 14 gatti, l'equino, i 4 bovini, i 2 ovini e 10 cani su 13 non erano stati mai vaccinati. Dei 3 cani vaccinati uno era stato vaccinato con il Flury Lep e due erano stati vaccinati una sola volta con vaccini di cui non è risultato il tipo.

Riassunto. Nel 1986 si è estinta la rabbia silvestre penetrata in Italia nel 1977. In alcune regioni si è riusciti a controllare ed estinguere questa epizoozia mediante lo sfoltimento delle volpi. La vaccinazione della volpe per via orale, la cui sperimentazione è iniziata a partire dal 1984, associata allo sfoltimento delle volpi, ha indicato il metodo più veloce e più sicuro per estinguere i focolai enzootici di rabbia silvestre e per impedire la penetrazione di questa zoonosi in zone indenni. La vaccinazione antirabbica degli animali domestici mediante vaccini vivi attenuati nelle zone interessate dalla rabbia silvestre ha dimostrato di essere un mezzo altamente efficace limitando in queste zone i casi di rabbia a danno di questi animali solo a quelli non vaccinati.

Parassitologia 30: 29-34, 1988

L'ESPERIENZA ITALIANA NEL CONTROLLO DELLA RABBIA. II. RICERCHE DI LABORATORIO

A. IRSARA[1], A. CIVARDI[2], F. DE SIMONE[2], G. L. BRESSAN[1]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova*; [2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia.*

Abstract. Diagnoses of rabies have been performed at the Zooprophylactic Institutes of Brescia and Padua since 1977. 5,765 foxes have been examined and 1,805 (31.30%) resulted positive. The same Institutes have performed also the laboratory tests in order to control the presence of Tetracycline, the serum conversion and the presence of wild or attenuated viruses in the nervous tissue of foxes and other wild animals in occasion of the oral vaccination campaigns of foxes.

Key words: rabies, foxes, oral vaccination, Italy.

INTRODUZIONE

Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) hanno avuto un ruolo fondamentale nel controllo della rabbia fin dal 1977, anno di comparsa della malattia sul territorio nazionale.

La quasi totalità dei focolai è stata osservata nelle zone alpine delle Venezie e della Lombardia; perciò, gli Istituti competenti per territorio, l'IZS delle Venezie e l'IZS della Lombardia e dell'Emilia, hanno prontamente istituito ed organizzato strutture diagnostiche efficienti ed adeguate.

L'attività diagnostica, riferita esclusivamente alla specie volpe ed alle zone infette, si è svolta su una superficie di 13.000 km^2 dove sono state complessivamente esaminate 5765 volpi di cui 1805, ossia il 31,30%, risultavano positive. Nella Tab. 1 si riportano il numero dei Comuni infetti, la rispettiva superficie, l'indice volpi monitorate/km^2, l'indice volpi monitorate positive/km^2; qust'ultimo dato risulta piuttosto omogeneo e prova che il monitoraggio è stato eseguito correttamente.

I centri diagnostici degli IZS di Brescia e Padova hanno svolto un'opera preziosa anche in occasione delle campagne sperimentali di vaccinazione orale della volpe. Questa operazione, articolata e complessa, è stata eseguita dal 1984 al 1987 secondo le direttive di un Comitato Scientifico costituito «ad hoc» e sotto l'egida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

Le campagne vaccinali hanno interessato aree limitate della provincia di Brescia (1984, 1985, 1986), di Trento (1986, 1987) e di Bolzano (1986).

TABELLA 1 - Indici di densità delle volpi nelle zone infette. Superficie dei comuni infetti: km² 13.000. Volpi monitorate: 5765. Volpi positive: 1805 (31,30%).

Anno	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986
Comuni n.	13	28	17	8	52	77	108	107	36	12
km²	1261	3012	1510	866	3950	3975	5834	3936	1412	463
Volpi monitorate	321	696	140	177	1177	993	1259	713	254	35
Ind. km²	0,254	0,231	0,092	0,204	0,297	0,249	0,215	0,181	0,179	0,075
Volpi positive	82	203	60	10	319	290	403	315	101	22
Ind. km²	0,065	0,067	0,039	0,011	0,080	0,072	0,069	0,080	0,071	0,047

Negli anni 1984 e 1985 la vaccinazione è stata eseguita utilizzando come esche teste di pollo in cui veniva inserita la capsula contenente il virus vaccinale vivo ed attenuato unitamente a 150 mg di tetraciclina come sostanza tracciante. In queste occasioni le esche sono state preparate presso il Centro Diagnostico dell'IZS di Brescia.

Al fine di preservare al massimo l'attività vaccinale del virus, piuttosto termolabile, le esche venivano preparate solamente qualche ora prima della distribuzione sul territorio; per motivi precauzionali questo lavoro veniva eseguito dal personale del Centro Diagnostico che, essendo regolarmente vaccinato e controllato, forniva le massime garanzie. Nel corso delle due campagne sono state preparate complessivamente 15.000 esche.

Il maggior contributo degli IZS di Padova e Brescia in occasione delle campagne di vaccinazione riguarda il monitoraggio delle volpi catturate, uccise o trovate morte e provenienti da zone di campionamento prestabilite; in casi particolari le indagini di laboratorio sono state estese anche ad altri animali selvatici.

Gli esami servivano a determinare la percentuale di volpi che avevano assunto le esche; a misurare il livello anticorpale e quindi valutare il grado di immunità raggiunto; a sorvegliare che il virus vaccinale non mutasse le sue caratteristiche di attenuazione.

VALUTAZIONE DELLA ASSUNZIONE DI ESCHE

La percentuale di assunzione di esche è indicata nella Tab. 2 ed ha presentato, nelle varie campagne, valori compresi tra 50 e 85%. Si può notare che l'assunzione è avvenuta gradualmente: infatti le percentuali nella fase iniziale, centrale e finale del periodo di monitoraggio risultano omogenee. Queste percentuali derivano da conte fatte su aree prestabilite da parte di personale opportunamente addestrato. L'indice di assunzione rappresenta la percentuale di esche mancanti rispetto a quelle distribuite e perciò assunte sia da volpi

TABELLA 2 - Campagne di vaccinazione orale contro la rabbia nella volpe: esami per tetraciclina.

Provincia	BS	BS	BS	TN	BZ	TN
Giorni	27-30	28-31	26-30	16-19	20-23	23 mar.
Mese	nov.	mag.	mag.	giu.	mag.	18 apr.
Anno	1984	1985	1986	1986	1986	1987
Assunzione delle esche						
a 4 giorni	26	32	22	18	25	17,9
a 8 giorni	16	36	25	15	28	16,8
a 14 giorni	19	17	20	17	30	16,0
%	61	85	67	50	83	50,81
Fluor. tetrac. su osso	46	21	114	112	10	109
Esito positivo	29	9	40	53	5	38
%	63	43	35	48	50	35

che da altri animali selvatici, randagi o domestici oltre a quelle disperse o distrutte per altri motivi.

Una valutazione più specifica delle esche assunte da volpi può essere fatta con sufficiente precisione utilizzando sostanze marcatrici; tra queste è particolarmente comodo l'antibiotico tetraciclina. Una volta ingerita, la tetraciclina passa nel circolo sanguigno e si lega alle aree di osteogenesi rendendole evidenti all'indagine microscopica. La caratteristica fisico-chimica di questo antibiotico è quella di reagire con il catione Ca^{++} originando molecole complesse, calcio-chelati, scarsamente solubili, che vengono difficilmente eliminate nei substrati biologici.

La formazione di chelati tetraciclinici si verifica nei tessuti duri nella fase di mineralizzazione, quando il calcio è disponibile nella sua fase ionica. La fissazione delle molecole tetracicliniche con l'ortofostato di calcio forma un complesso a lentissimo riassorbimento e l'entità del deposito varia in funzione della dose, della via di somministrazione, del grado di mineralizzazione del substrato, ecc. Questi chelati depositati si fissano nelle cellule degli osteoni in accrescimento ed assumono perciò forme circolari caratteristiche ben evidenziabili con la luce fluorescente.

Le ossa più adatte per l'esame sono la mandibola ed il femore. A mezzo di lame diamantate si eseguono sezioni trasversali di osso dello spessore di circa 50μ; le sezioni vengono deposte su un vetrino ed esaminate al microscopio a fluorescenza usando appositi filtri per selezionare radiazioni ultraviolette di lunghezza d'onda opportuna. La presenza di tetraciclina è denunciata da anelli fluorescenti di color giallo-arancio identificabili con sicurezza pressoché assoluta.

Nella Tab. 2 sono riportati i risultati. Le percentuali di positività risultano piuttosto variabili passando da un minimo del 35 ad un massimo del 63%.

Queste discrepanze potrebbero essere attribuite al fatto che le vaccinazioni eseguite non sono mai state ripetute in modo esattamente sovrapponibile sia per zona che per data e pertanto possono aver giocato un ruolo i differenti fattori geografici, climatici, ecc.

Valutazione della sieroconversione

La sieroconversione è un parametro fondamentale per la valutazione del buon esito della vaccinazione poiché evidenzia sia il numero degli animali venuti in contatto con il virus vaccinale sia l'entità della risposta immunitaria e quindi l'effettiva protezione acquisita.

Il materiale d'esame, per l'impossibilità di un normale prelievo, era costituito dal liquido che si raccoglie nella cavità toracica dei cadaveri o ricavato per spremitura del coagulo presente nella cavità cardiaca. A volte era impossibile reperire anche questo materiale oppure esso non era esaminabile per l'elevata citotossicità: per questo motivo il numero di esami per anticorpi è in genere inferiore al numero degli animali monitorati.

La ricerca degli anticorpi è stata eseguita con la tecnica RFFIT, acronimo di Rapid Fluorescent Foci Inhibition Test. Questa prova serve a dimostrare sia quanti anticorpi esistono in un siero in esame sia a valutare che questi possiedono la capacità di neutralizzare l'attività infettante del virus. Vale la pena di ricordare che i virus vaccinali differiscono da quelli selvaggi per la nulla o limitata virulenza verso l'ospite mentre la loro struttura antigenica è perfettamente in grado di indurre la formazione di anticorpi capaci di neutralizzare anche i virus patogeni.

Nella prova citata si sfrutta la capacità del virus della rabbia di infettare colture di cellule BHK-21 *in vitro*. Le cellule infettate dal virus possono essere evidenziate con un anticorpo, diretto verso il virus della rabbia, al quale viene legata una molecola di fluorocromo che rende possibile la sua localizzazione utilizzando un microscopio dotato di un idoneo apparato di illuminazione.

È possibile perciò identificare e contare le cellule infettate dal virus. Questo,

Tabella 3 - Sieroconversione in volpi campione catturate nelle aree di vaccinazione.

Provincia	BS	BS	BS	TN	BZ	TN
Giorni	27-30	28-31	26-30	16-19	20-23	23 mar.
Mese	nov.	mag.	mag.	giu.	mag.	18 apr.
Anno	1984	1985	1986	1986	1986	1987
RFFIT su N. sieri	30	8	81	121	10	107
Positivi	12	6	21	32	3	45
%	40	75	26	26,4	30	42

se neutralizzato dagli anticorpi del siero in esame, non è più in grado di infettare le cellule. Maggiore è perciò la quantità di particelle virali infettanti neutralizzate e minore sarà il numero delle cellule fluorescenti, ossia infette, contate. In tal modo è possibile determinare quale diluzione (ossia titolo) di un siero in esame è in grado di ridurre di una quantità prestabilita il numero delle cellule infettate. Il tutto viene sempre controllato e riferito all'attività virus-neutralizzante di un Siero Standard Internazionale a contenuto noto di Unità. I risultati degli esami sierologici sono riportati nella Tab. 3. Anche in questo caso la percentuale di volpi positive per anticorpi è piuttosto variabile passando da un minimo del 26 ad un massimo del 75%; quest'ultimo valore però è ricavato da un basso numero di campioni probabilmente poco significativo.

Valutazione della stabilità antigenica del virus

Il virus utilizzato per la vaccinazione può venire in contatto con svariate specie animali non bersaglio, uomo compreso; è importante quindi controllare che le sue caratteristiche antigeniche e di attenuazione rimangono costanti. Per questo motivo è consigliabile il monitoraggio dei tessuti del sistema nervoso centrale di animali provenienti dalle zone di vaccinazione. In questi tessuti potrebbe essere presente sia il virus rabido selvaggio, facilmente identificabile con i normali antisieri fluorescenti policlonali, sia il virus di origine vaccinale che, per mutazione delle sue caratteristiche, avesse colonizzato e fosse quindi presente in questi tessuti nervosi.

I sieri policlonali fluorescenti non sono in grado di distinguere fra virus selvaggio e virus vaccinale. A tal fine tutti gli animali (volpi, altri selvatici e micromammiferi) sono stati esaminati con anticorpi monoclonali in grado di reagire con stipiti attenuati in modo assolutamente specifico. Gli anticorpi monoclonali (gentilmente forniti dall'Istituto Federale di Tübingen, RFT) sono il W 187 e il W 239. Mentre il monoclonale W 187 reagisce solo con i ceppi attenuati, il monoclonale W 239 reagisce con tutti i ceppi.

La reazione di identificazione è una immunofluorescenza (IF) indiretta eseguita su impressioni di tessuti del S.N.C. degli animali in esame. Su due distinte impressioni fatte su uno stesso vetrino vengono deposti, uno per ciascuna, gli anticorpi monoclonali. In seguito, previo lavaggio del preparato, si fa reagire una anti-IgG di topo fluorescente. In caso di virus selvaggio si avrà reazione solo col monoclonale W 239. Se l'IF risultasse positiva anche col monoclonale W 187 allora si tratterebbe di animale infetto da virus attenuato e perciò di origine vaccinale.

Nessuno degli animali campione esaminati ha mostrato di reagire con l'anticorpo W 187. L'esame, per maggiore scrupolo è stato eseguito anche su campioni già risultati negativi alla normale IF con anticorpo policlonale. Nella prima campagna di vaccinazione l'indagine con anticorpi monoclonali è stata eseguita anche su un consistente numero (138) di micromammiferi provenienti dalle zone di distribuzione delle esche.

I dati raccolti finora indicano l'assoluta incapacità del virus vaccinale di replicare nei tessuti del sistema nervoso centrale sia nella volpe che in altre specie esaminate.

Riassunto. Presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali di Brescia e di Padova sono state eseguite le diagnosi di rabbia dal 1977. Sono state esaminate 5.765 volpi di cui 1.805 (31,30%) positive alla malattia. Negli stessi Istituti sono state eseguite le prove di laboratorio relative al controllo delle campagne di vaccinazione orale delle volpi. Queste ricerche riguardavano la presenza di Tetraciclina, la sieroconversione, la differenza tra virus vaccinale e virus rabido selvaggio mediante anticorpi monoclonali.

Parassitologia 30: 35-47, 1988

L'ESPERIENZA ITALIANA NEL CONTROLLO DELLA RABBIA. III. INDAGINI DI LABORATORIO SUL VACCINO SAD_{B19} TÜ IMPIEGATO NELLE CAMPAGNE VACCINALI DELLA VOLPE

F. CIUCHINI, C. BUONAVOGLIA

Laboratorio di Medicina Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Abstract. Results of laboratory investigations on the SAD_{B19} Tü vaccine used for oral vaccination of fox show: 1) the need to check the vaccine efficacy before its application in the field; 2) the importance of monoclonal antibodies to distinguish sylvatic from vaccinal virus strains in the diagnosis of rabies during the vaccination campaigns; 3) the relevance of a careful evaluation of the epidemiological risk encountered when releasing baits containing activated vaccine.

Key words: rabies, oral vaccination, fox, monoclonal antibodies, Italy.

INTRODUZIONE

Nell'ambito dell'esperimento di vaccinazione orale della volpe rossa contro la rabbia silvestre, le indagini di laboratorio sul vaccino SAD_{B19} Tübingen, impiegato in Italia, hanno avuto i seguenti obiettivi:

1) Effettuare il controllo di qualità sul vaccino fornito dal Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals di Tübingen, RFT.
2) Verificare lo stato di conservazione delle esche vaccinali prima dell'azione di posa in campo, relativa a ciascuna campagna vaccinale.
3) Determinare la stabilità in campo del vaccino confezionato in esche, esposte a temperature ambientali tipiche dei territori di vaccinazione.
4) Tipizzare mediante l'uso di anticorpi monoclonali gli eventuali stipiti rabidi isolati nel corso dell'esperimento.
5) Valutare i rischi epidemiologici legati allo stipite SAD_{B19} Tü, attivo modificato, mediante ricerche di laboratorio su animali «bersaglio» e «non bersaglio», sani o immunosoppressi con corticosteroidi.

Queste indagini sono state affidate al Laboratorio di Medicina Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma dall'apposito Comitato scientifico per la rabbia che ha promosso, organizzato e strutturato l'esperimento nelle province di Brescia, Trento e Bolzano.

L'esperimento si è sviluppato attraverso quattro campagne vaccinali, effettuate rispettivamente nel novembre 1984, maggio 1985, maggio-giugno 1986, marzo-aprile 1987.

Controllo di qualità sul vaccino SAD_{B19} Tü

Questo controllo, non ancora codificato a livello farmacopee, è stato organizzato secondo i criteri generali che regolano il controllo dei presidi immunizzanti antirabbici attualmente in uso in campo veterinario. Esso prevedeva un sistema di saggi su ogni serie vaccinale importata allo scopo di verificare la sterilità, l'assenza di virus estranei, il titolo virale, la termostabilità, l'innocuità, l'immunogenicità, il pH ed il volume della dose in capsula, nonché l'identità del virus.

Tabella 1 - Risultati relativi al controllo di qualità sul vaccino SAD B19 Tü impiegato nelle campagne vaccinali italiane. BHK-21 = Baby Hamster Kidney, linea 21. U.I. = Unità Infettanti cellule. DL_{50} = Dose Letale cinquanta. T. amb. = Temperatura ambientale di Roma (escursione termica: 5-19°C).

Saggi	Vaccino SAD B19 Tü Serie 10102			Vaccino SAD B19 Tü Serie 10109		
Sterilità batterica e micotica Assenza di virus estranei	Non sono stati evidenziati batteri, muffe e virus estranei.					
Titolo virale: — su BHK-21 — su topini lattanti — su topini impuberi	 $3,5 \times 10^7$ U.I./dose $10^{8,02}$ DL_{50}/dose $10^{7,28}$ DL_{50}/dose			 $4,5 \times 10^7$ U.I./dose $10^{7,08}$ DL_{50}/dose $10^{7,53}$ DL_{50}/dose		
Termostabilità	a 4° C	a T. amb.	a 37° C	a 4° C	a T. amb.	a 37° C
Titoli su BHK-21 in U.I./ml dopo						
— 24 ore	$2,5 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^7$	—	—	—
— 48 ore	$1,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	—	$2,5 \times 10^7$
— 72 ore	$3,0 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	—	—	—
— 96 ore	$2,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	—	$1,5 \times 10^6$
Innocuità su topini impuberi assuntori *per os* di 0,2 ml di vaccino veicolato	*Mortalità*: 4/60 (6,6%)			*Mortalità*: 3/80 (3,7%)		
Immunogenicità su volpi rosse "in cattività"	31 soggetti trattati con esche "teste-pollo". *Sieroconversione*: 29/31 (93,5%)			8 soggetti trattati con esche "saponetta". *Sieroconversione*: 8/8 (100%)		
pH	$7,1 \pm 0,2$			$7,1 \pm 0,3$		
Volume dose	1,8 ml			1,8 ml		

È noto che questo tipo di controllo trae origine dall'assunto scientifico che per ogni serie vaccinale potrebbero cambiare alcuni parametri fondamentali di qualità del vaccino, legati strettamente alle tecniche di produzione e di conservazione.

I risultati del controllo a campione vincolavano ogni autorizzazione ministeriale all'importazione del vaccino, nonostante fosse accompagnato da uno specifico certificato di controllo elaborato dall'Istituto produttore. E questo è nelle regole istituzionali del nostro Paese che vede appunto interprete il nostro laboratorio.

I risultati del controllo sono riportati nella Tab. 1.

Osservazioni

Il vaccino SAD_{B19} Tü veniva fornito dal Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals di Tübingen, RFT, (Schneider e Cox, 1983), confezionato in capsule per le prime due campagne vaccinali che prevedevano l'allestimento di esche teste di pollo in cui le capsule vaccinali, attraverso il becco, venivano spinte forzatamente in cavità oro-faringea nella quale si bloccavano con gli appositi spigoli della base. Per la III e IV campagna vaccinale, il vaccino veniva fornito predisposto in particolare esche «saponetta». Il vaccino era preparato con lo stipite SAD_{B19} ottenuto per clonazione dallo stipite SAD «standard» (Berna) (Steck *et al.*, 1982) coltivato su BHK-21 in presenza di anticorpi monoclonali antiglicoproteici. Il vaccino era stabilizzato con il 10-15% di tuorlo d'uovo per evitare l'inattivazione termica ambientale. Il titolo dichiarato per le due serie vaccinali importate non doveva essere inferiore a 2-3 $\times$ 10^7 U.I./ml (20-30 milioni di Unità Infettanti cellule), la dose di 1,8 ml ed il vaccino doveva essere conservato a —20°C.

Dai risultati riportati nella Tab. 1 possiamo osservare quanto segue:

— I saggi di sterilità batterica e micotica, il saggio per l'assenza di virus estranei, effettuati secondo le direttive ufficiali per il controllo di sicurezza, hanno risposto favorevolmente.
— I titoli virali medi determinati su tre substrati diversi sono stati ritenuti in accordo con i titoli dichiarati dall'Istituto produttore.
— La termostabilità del vaccino è stata confermata dalla omogeneità dei titoli virali riscontrati nelle capsule vaccinali esposte a 4°C e nelle capsule esposte a temperature ambientali di laboratorio che oscillavano da un minimo di 5°C ad un massimo di 19°C. L'esposizione del vaccino a 37°C per 4 giorni faceva registrare una diminuzione del titolo intorno ad 1 log.
— I saggi di innocuità hanno sempre rivelato una patogenicità residua che non si discostava dalla supposta soglia del 10-15% per micromammiferi di laboratorio, trattati per via orale con vaccino assunto spontaneamente. Una somministrazione forzata per instillazione orale comporta quasi sempre un contagio delle prime vie respiratorie che potrebbe indurre di conseguenza una mortalità piuttosto elevata. È stata comunque osservata una

certa variabilità della percentuale di mortalità per rabbia vaccinale tra una serie e l'altra.

— La percentuale di sieroconversione rilevata con la tecnica di estinzione rapida dei foci fluorescenti su colture BHK-21 in micropiastra su emosieri di volpi «in cattività» trattate ciascuna con un'esca vaccinale (1 dose), è stata sempre al di sopra del 90% dei soggetti vaccinati. È stata tuttavia osservata una certa variabilità dei titoli anticorpali siero-neutralizzanti legata verosimilmente alla reattività individuale. I titoli oscillavano da 1:40 a 1:1280. Il picco della risposta anticorpale si osservava a 20-30 giorni dalla vaccinazione. La sieropositività perdurava fino al termine dell'esperienza (90 giorni).

La risposta anticorpale nella volpe può valere senz'altro come misura della protezione vaccinale contro la rabbia in quanto è stata dimostrata la correlazione lineare tra i due parametri (Schneider e Cox, 1983).

Verifica dello stato di conservazione delle esche vaccinali prima dell'azione di posa in campo relativa a ciascuna campagna vaccinale

È stato opportuno indagare sullo stato di conservazione del vaccino in quanto ogni serie vaccinale importata è stata impiegata per due campagne vaccinali distanziate tra di loro. La I e la II campagna vaccinale in Valcamonica venivano effettuate a distanza di sei mesi circa, la III e la IV a distanza di quasi un anno.

La prima serie vaccinale (10102) veniva conservata presso l'Istituto zooprofilattico di Brescia, la seconda serie (10109) presso strutture veterinarie

Tabella 2 - Titoli virali rilevati sul vaccino alcuni giorni prima della azione di posa in campo, in funzione dei substrati utilizzati. U.I. = Unità Infettanti cellule. DL_{50} = Dose letale cinquanta.

Titolo (Substrato)	Campagne di vaccinazione			
	I - Nov. 1984	II - Mag. 1985	III - Mag.-Giu. 1986	IV - Mar.-Apr. 1987
U.I./dose (BHK-21)	$3,5 \times 10^7$	$8,4 \times 10^6$	$4,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
DL_{50}/dose (Topini neonati)	$10^{8,02}$	$10^{7,54}$	$10^{7,08}$	$10^{7,01}$
DL_{50}/dose (Topini impuberi)	$10^{7,28}$	$10^{6,64}$	$10^{7,20}$	$10^{6,05}$

della provincia di Trento. Per la verifica dello stato di conservazione veniva effettuata una serie di titolazioni virali del vaccino adottando tre substrati diversi; ciò non tanto per eccesso di rigore quanto per apprezzare al contempo la sensibilità dei substrati allo stipite vaccinale in esame. I risultati sono riportati nella Tab. 2.

Osservazioni

Una prolungata conservazione del vaccino alla temperatura di —20°C non ha influenzato negativamente il titolo virale.

Il topino neonato ha permesso di rilevare titoli virali dello stesso ordine di quelli rilevati su BHK-21 ed anche leggermente superiori. Il topino impubere sembra essere il substrato meno adatto in quanto i titoli virali diminuivano nell'ordine di 1 log. Secondo alcuni Autori il titolo su topino potrebbe risultare da 2 a 5 logaritmi inferiore al titolo su cellule dopo adeguata correzione.

Le nostre indagini hanno rilevato una similarità dei titoli sui diversi substrati.

Durante i saggi di titolazione virale non si è avuta alcuna interferenza legata all'alta concentrazione virale: cioè la sintomatologia rabida, la infettività e la mortalità indotte dal virus vaccinale SAD_{B19} scomparivano progressivamente con l'aumentare del fattore di diluizione.

Stabilità in campo del vaccino SAD_{B19} Tü in esche esposte a temperature ambientali tipiche dei territori di vaccinazione

Le indagini sulla stabilità in campo del vaccino impiegato nelle campagne di vaccinazione hanno permesso di valutare l'azione stabilizzante del tuorlo d'uovo (10-20%) sul virus vaccinale esposto all'influsso di temperature ambientali tipiche dei territori di vaccinazione delle province di Brescia, Trento e Bolzano.

Le indagini hanno avuto inoltre il compito di monitorare il titolo del vaccino in uno dei momenti più critici dell'azione vaccinale, e cioè dalla distribuzione delle esche al momento della possibile assunzione da parte degli animali. Questo periodo sembrerebbe aggirarsi intorno alla prima settimana post-distribuzione, come risulta da uno studio effettuato durante la cosiddetta «prova in bianco», condotta con esche prive di vaccino in alcune zone di vaccinazione, prima di iniziare l'esperimento.

Per le indagini sulla stabilità è stato necessario che durante la fase di distribuzione alcune esche venissero poste in luoghi non accessibili agli animali e ben segnalate in modo da permetterne un facile recupero, avvenuto successivamente a 4, 8 e 14 giorni dalla distribuzione delle esche. Le indagini sulla stabilità comportavano il rilievo del titolo virale del vaccino su tutte le esche recuperate, mediante titolazioni su cellule BHK-21.

I risultati sono riportati nella Fig. 1, che amplifica e visualizza le correlazioni grafiche tra i titoli virali medi rilevati nelle esche vaccinali recuperate

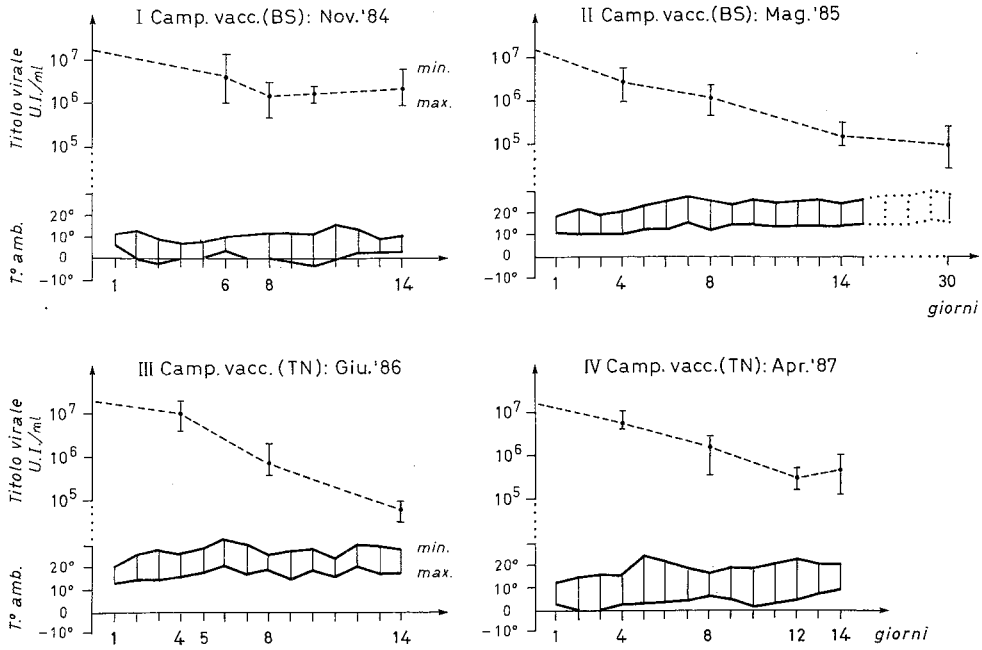


Fig. 1. Stabilità in campo del vaccino SAD_{B19}.

a vari giorni dalla distribuzione e le temperature minime e massime rilevate dalle stazioni meteorologiche di zona. Sono riportate in ascissa le giornate di recupero e in ordinata le escursioni termiche in associazione con i titoli virali medi, ottenuti da almeno 4 o 5 esche vaccinali.

Osservazioni

La diminuzione dei titoli virali nei primi 8 giorni post-distribuzione non è stata mai superiore a 1 log; cioè i titoli non erano mai inferiori ad 1 milione di unità infettanti per ml che assicurano ancora una eccellente efficacia vaccinale (Schnedier e Cox, 1983).

La I campagna vaccinale in Valcamonica si è svolta in condizioni di temperatura ambientale ottimali in quanto le oscillazioni termiche erano comprese tra —2 e + 16°C ed i titoli virali medi non scendevano mai al di sotto di 10^6 U.I./ml, fino alla 14ª giornata dalla distribuzione.

Nella II campagna vaccinale, effettuata nel maggio 1985, si rilevava una caduta di titolo intorno a 1 log in 8ª giornata e di 2 log in 14ª giornata, caduta di titolo che non influenzava l'efficienza dell'azione vaccinale, confermata dalla percentuale di sieroconversione rilevata in fase di monitoraggio post-vaccinale sulle volpi, dall'IZS di Brescia. Nella II campagna vaccinale la temperatura ambientale oscillava tra 10 e 29°C; nonostante ciò venivano

rilevati titoli intorno a 10^5 U.I./ml in esche recuperate a 30 giorni dalla distribuzione. Questo dato dimostra da un lato la stabilità del vaccino, dall'altro il perdurare di uno stato «a rischio» legato alle esche con vaccino attivo.

La III campagna vaccinale si è svolta in condizioni ambientali non ottimali in quanto si è protratta in giugno inoltrato con temperature ambientali che oscillavano da un minimo di 12°C ad un massimo di 31°C. Queste condizioni hanno influito negativamente sui titoli virali che diminuivano fortemente dalla 7ª giornata. Non venivano comunque compromesse le condizioni di efficienza vaccinale della campagna in quanto è noto che nei primi 5 o 6 giorni vengono rimosse il 63-78% delle esche distribuite (Wandeler *et al.*, 1975; Biocca *et al.*, 1981).

La IV campagna vaccinale si è svolta in condizioni di temperature ambientali che oscillavano da —0,1°C a +24°C. Il titolo dopo l'8ª giornata scendeva sotto 10^6 U.I./ml: titolo che viene considerato come la soglia minima che assicura l'efficacia del vaccino.

Osservando il grafico della II e IV campagne vaccinali, effettuate ambedue con vaccino conversato da 6 a 12 mesi a —20°C, si può avanzare l'ipotesi che l'effetto temperatura ambientale sia più profondo in esche vaccinali conservate abbastanza a lungo.

Queste indagini sulla stabilità in campo sono previste da ogni protocollo sperimentale relativo alla vaccinazione orale della volpe in quanto predicono l'efficienza vaccinale, legata al titolo virale, in uno dei passaggi più delicati di tutto il sistema di vaccinazione, ristretto tra l'azione di posa e l'assunzione delle esche, come precedentemente detto.

Le indagini sulla stabilità in campo del vaccino sottolineano l'importanza del periodo di intervento vaccinale che dovrebbe avvenire, per le nostre aree, possibilmente in autunno o primavera onde evitare le alte e basse temperature: le alte temperature potrebbero inattivare il vaccino mentre le basse potrebbero congelarlo. Il vaccino dovrebbe essere ingerito allo stato liquido per facilitare l'adsorbimento sulle mucose orali e tonsillari. Vale ricordare che il vaccino SAD_{B19} ha un punto di congelamento nell'esca di alcuni gradi sotto lo zero.

Alcune esche di recupero (N. 9) sono state somministrate ad altrettante volpi nelle quali si rilevava una sieroconversione positiva con titoli individuali tra 1-15 U.I./ml (Unità Internazionali sieroneutralizzanti).

Tipizzazione di stipiti rabidi mediante l'uso di anticorpi monoclonali

Tutti gli stipiti rabidi isolati nelle zone di vaccinazione orale della volpe dovrebbero essere tipizzati con gli anticorpi monoclonali (Mo-Abs) che consentono di discriminare gli stipiti vaccinali da quelli selvaggi.

Durante le nostre campagne vaccinali non c'è stata in pratica questa necessità in quanto nel periodo post-vaccinale non sono stati rilevati casi positivi per rabbia.

Nel nostro laboratorio venivano comunque messe a punto le tecniche per questo tipo di analisi, seguendo le direttive del Wistar Institute of Anatomy and Biology di Philadelphia, che ci forniva i «panels» di anticorpi monoclonali per la caratterizzazione del nucleocapside e della glicoproteina. Nel collaudare queste tecniche sono stati analizzati 20 stipiti di virus rabido isolati in Italia nel periodo 1984-'85 in zone al di fuori delle aree di vaccinazione.

Dopo propagazione degli stipiti virali su cellule NA (neuroblastoma) e su cellule BHK-21, quando almeno il 50% delle cellule risultava infetto, si procedeva all'analisi del nucleocapside con Mo-Abs antinucleocapside. Effettuato il contatto per 30' a 37°C tra Mo-Abs antinucleocapside e cellule colturali infette con virus da tipizzare, si procedeva a due successivi lavaggi, indi la specifica fissazione dei monoclonali veniva rilevata con la tecnica di immunofluorescenza indiretta aggiungendo γ-globuline antitopo coniugate con fluoresceina, secondo la tecnica di Wiktor (1980).

Nella Tab. 3 riportiamo soltanto i dati relativi all'analisi del nucleocapside in quanto è l'analisi che consente di discriminare gli stipiti vaccinali dai selvaggi.

Osservazioni

Raffrontando i risultati della caratterizzazione del nucleocapside (Tabella 3) con i quadri classici riportati da Schneider (1982) per gli stipiti selvaggi circolanti in Europa, possiamo affermare che dei 20 stipiti saggiati 17 sono riferibili allo stipite «Wild type Fox I» di virus rabbia per la negatività nei confronti degli Mo-Abs antinucleocapside 364-11, 590-2 e 422-5, mentre soltanto 2 stipiti virali sono riferibili allo stipite «Wild type Fox II» di virus rabbia per la negatività nei confronti degli Mo-Abs antinucleocapside 364-11, 590-2, 102-27, 422-5.

Questa distinzione viene considerata attualmente supeflua in quanto le differenze tra Fox I e Fox II sono in effetti basate unicamente sul determinante 102-27. Risultati dubbi sono stati ottenuti per un solo stipite. Il «panel» adottato consente di discriminare gli stipiti selvaggi da quelli vaccinali e dagli stipiti «rabbia-correlati». In futuro il «panel» sarà ridotto ad appena 9 monoclonali, in questo senso sembrano orientati gli esperti del settore.

Valutazione dei rischi epidemiologici legati alla distribuzione in campo dello stipite vaccinale SAD_{B19}

È noto che la diffusione nell'ambiente di un virus rabido attivo modificato, come il SAD_{B19}, comporta rischi epidemiologici di vario ordine legati alla patogenicità residua, al possibile recupero di virulenza nonché alla teorica selezione di varianti antigeniche di virus selvaggio in presenza di inadeguate pressioni immunitarie. È quindi chiaro quanto sia importante una sorveglianza oggettiva di tali rischi sugli animali «bersaglio» e «non bersaglio» della vaccinazione orale di campo.

TABELLA 3 - Risultati della caratterizzazione di 20 stipiti di virus rabbia mediante anticorpi monoclonali antinucleocapside. + = Reazione positiva. — = Reazione negativa. ⊕ = Reazione dubbia.

Ordine stipiti secondo la specie animale d'origine e relativa area geografica		N. stipiti	502-2	103-7	206-1	209-1	229-1	590-2	515-3	104-4	111-2	111-14	239-10	389-1	377-7	102-27	222-9	237-3	120-2	364-11	714-3	422-5	Totale stipiti
Bovino	(TN)	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	17
Tassi	(TN)	3	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Gatto	(TN)	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Capriolo	(TN)	1	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Volpi	(TN)	4	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Capriolo	(UD)	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Volpe	(CO)	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Volpi	(BZ)	3	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Volpe	(SO)	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Cane	(BS)	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Volpe I	(AO)	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	2
Gatto	(TN)	1	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	
Volpe II	(AO)	1	+	+	+	+	+	⊕	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	⊕	+	—	1
Wild Type Fox I			+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	
Wild Type Fox II			+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	
ERA/SAD			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	

La valutazione dei rischi epidemiologici in questione ha richiesto una serie di prove di innocuità su volpi «in cattività», micromammiferi da laboratorio, cani e gatti; alcuni di questi animali venivano vaccinati sotto effetto corticosteroide per rendere più severe e rigorose le prove stesse, usando acetato di metilprednisolone o desametazone per via intramuscolare. Il vaccino veniva somministrato per diverse vie; quindi si valutavano gli indici di mortalità per rabbia conclamata su micromammiferi; la sieroconversione, la latenza e diffusione del virus rabido vaccinale negli organi d'elezione della replicazione virale di volpi, cani e gatti.

Tutte le prove di innocuità comportavano osservazioni cliniche e necroscopiche di ogni soggetto trattato, indagini sierologiche con tecniche di sieroneutralizzazione su cellule, ed indagini virologiche mediante le usuali tecniche di immunofluorescenza diretta e di reisolamento su colture cellulari (NA, BHK-21), topini neonati ed impuberi. Le indagini virologiche sono state effettuate con reperti di distretti encefalici, di ghiandole salivari (sottomascellari, parotidi) e tonsille.

I risultati sono riportati in sintesi nelle Tabb. 4 e 5.

TABELLA 4 - Risultati delle prove di innocuità su animali di diversa specie, alcuni dei quali sotto effetto corticosteroide. [1] = reciproco titolo siero; [2] = peso topini 10-12 g; [3] = peso ratti 100-150 g; *os* = per via orale con vaccino veicolato su tuorlo d'uovo; Cort. = cortisonizzati; tons. = tonsille; cerv. = cervello; N. = numero; gg. = giorni; i.m. = intramuscolo; i.p. = intraperitoneale; — = negativo; n.d. = non determinato; Ag = antigene.

Specie	N. soggetti	Dose vaccino	Mortalità per rabbia	Siero conversione (Titoli)	Rilievo Ag virale)	Reisolamento virus vaccinale
Volpe (*Vulpes vulpes* L.)	31	1 esca	—	37/39 = 94% (20-1280) [1]	—	2/31 a 7 gg. da tonsille
	6	10 esche	—	6/6 = 100% (640-2560) [1]	—	—
	3	1,8 ml v. nasale	—	3/3 = 100% (320-1280) [1]	—	—
	15 Cort.	1 esca	—	14/15 = 93% (20-1280) [1]	—	2/15 a 7-14 gg. da tons.-cerv.
Cane (*Canis familiaris*)	7	1 dose	—	6/7 = 85% (20-160) [1]	—	—
	3	10 dosi	—	3/3 = 100% (80-2560) [1]	—	—
Gatto (*Felis catus*)	17	1 dose *os*	—	11/17 = 64% (10-40) [1]	—	—
	2	10 dosi *os*	—	2/2 = 100% (10-40) [1]	—	—
	6 Cort.	1 dose *os*	—	5/6 = 83% (10-40) [1]		
	2 Cort.	10 dosi *os*	—	2/2 = 100% (10-40) [1]	—	—
Topino Swiss [2] (*Mus musculus*)	140	0,2 ml *os*	7/140	n.d.	7/7	n.d.
	12	0,3 ml i.m.	0/12	12/12	n.d.	n.d.
	12	0,3 ml i.p.	0/12	12/12	n.d.	n.d.
Ratto Wistar [3] (*Rattus norvegicus*)	23	0,5 ml *os*	5/23	23/23	5/5	n.d.
	4	0,5 ml i.m.	0/4	4/4	n.d.	n.d.
	4	0,5 ml i.p.	0/4	4/4	n.d.	n.d.
	30 Cort.	0,5 ml *os*	7/30	30/30	7/7	7/7

OSSERVAZIONI

Durante il periodo di osservazione delle prove d'innocuità, le volpi, i cani ed i gatti non hanno presentato sintomi clinici di tipo neurologico o d'altro tipo associabili ad effetti propri o collaterali del vaccino. L'esame anatomopatologico dei soggetti abbattuti per eutanasia non ha rilevato lesioni a carico del sistema nervoso centrale.

Il reisolamento del virus vaccinale da 2 volpi sane a 7 giorni dalla assun-

TABELLA 5 - Risultati prove «recupero virulenza» su volpi e prove «cannibalismo forzato» su topini e ratti. N. = numero; Ag = antigene; d.e. = distretti encefalici; gh. sal. = ghiandole salivari (sottomascellari, parotidi); c.s. = come sopra; n.d. = non determinato; g = grammi.

N. animali	Contaminazione per via orale	Mortalità per rabbia	Accertamento Ag virale	Reisolamento virus-vaccino
1 volpe	Con 15 teste-topi morti di rabbia vaccinale indotta	—	negativo su d.e., gh. sal., tonsille	negativo da d.e, gh. sal., tonsille
2 volpi	Con 35 teste-topi morti di rabbia vaccinale indotta	—	c.s.	c.s.
20 topini adulti	Con teste-topi morti di rabbia vaccinale indotta	2/20	positivo su d.e.	n.d.
10 ratti (100-200 g)	Con 5 teste-ratti morti di rabbia vaccinale indotta	0/10	negativo	n.d.

zione del vaccino è stato effettuato soltanto da tonsille mediante prove biologiche su topini neonati di 4-6 giorni. Le prove su BHK-21 e su topini impuberi sono risultate negative. Le due volpi al momento dell'eutanasia per il recupero dei reperti encefalici, ghiandole salivari e tonsille per le prove di evidenziazione dell'antigene virale e di reisolamento, non presentavano sintomi clinici riferibili a rabbia.

In pratica i reisolamenti di virus vaccinale da volpi sane vaccinate per via orale con esche dimostrano l'attiva replicazione del virus in sede tonsillare.

I reisolamenti di virus vaccinale da due volpi immunosoppresse con acetato di metil-prednisolone, avvenuti da reperti tonsillari e parotidi per il soggetto abbattuto a 7 giorni dalla vaccinazione, da tonsille e cervello per il soggetto abbattuto a 14 giorni dalla vaccinazione, dimostrano un certo effetto del trattamento glicocorticosteroide sulla diffusione del virus nell'organismo (Ciuchini *et al.*, 1986). Questi reisolamenti sono stati ottenuti da volpi vaccinate con il SAD «standard», progenitore del B19, durante le esperienze interlocutorie (Ciuchini *et al.*, 1985) svolte per esprimere un parere sulla vaccinazione orale della volpe: parere che il Laboratorio di Medicina Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità doveva formulare in sede di Consiglio Superiore di Sanità.

Le prove d'innocuità su volpi vaccinate con super-dosaggi (10 dosi) dimostrano il grado di attenuazione dello stipite vaccinale; così pure le prove su volpi trattate per via nasale: una via particolarmente elettiva per il virus rabido che attraverso il nervo olfattorio può raggiungere facilmente il cervello.

Le percentuali di mortalità per rabbia conclamata nei topini e ratti, trattati con il vaccino per via orale, confermano gli indici di patogenicità residua rilevati in esperienze similari da altri Autori (Schneider e Cox, 1983; Steck *et al.*, 1982): una patogenicità residua, tra l'altro, non trasmissibile spontaneamente da roditore a roditore se non come evento sporadico (Wandeler *et al.*, 1982).

L'immunosoppressione dei ratti con corticosteroidi non ha spostato significativamente l'indice di mortalità indotta dallo stipite SAD_{B19} e non ha influenzato la sieroconversione, risultata positiva al di sopra di 1:60 per tutti i soggetti trattati. Le prove su gatti sani o cortisonizzati hanno evidenziato il buon grado di attenuazione dello stipite virale per questa specie «non bersaglio», risultando per contro scarsamente immunogeno.

La negatività delle prove di «recupero virulenza» hanno sottolineato l'inesistente rivirulentazione dello stipite vaccinale dopo un primo passaggio su topino.

Le prove di «cannibalismo forzato» su topini hanno evidenziato che la possibilità di trasmettere rabbia vaccinale in senso orizzontale per contaminazione con tessuti infetti è una evenienza sporadica che si è verificata solo in particolari condizioni sperimentali e che pertanto dovrebbe escludere il temuto instaurarsi, nella pratica, di cicli di rabbia vaccinale in colonie di micromammiferi roditori.

Conclusioni

In generale possiamo concludere che dai risultati delle indagini di laboratorio condotte sul vaccino SAD_{B19} Tü, emergono i seguenti punti:

— l'indispensabile conferma delle qualità dichiarate;
— l'importanza della funzione monitorante delle indagini effettuate;
— la necessità etica di proseguire ricerche critiche volte a perfezionare questo singolare sistema di vaccinazione che esemplifica la profilassi medica negli animali selvatici.

Riassunto. Gli AA. riportano i risultati delle indagini di laboratorio sul vaccino SAD_{B19} Tü impiegato nella vaccinazione orale della volpe. I risultati dimostrano l'indispensabilità di confermare in laboratorio l'efficacia del vaccino prima della sua utilizzazione in campo, l'importanza dell'uso degli anticorpi monoclonali per discriminare gli stipiti selvaggi dagli stipiti vaccinali nel corso di diagnosi per rabbia effettuate durante le campagne di vaccinazione, ed infine l'interesse di un'attenta valutazione dei rischi epidemiologici legati alla distribuzione in campo di esche contenenti vaccino attivo ad alto titolo virale.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Biocca E., Balbo T., Lanfranchi P., Peracino V. (1982). Ricerche di etologia sanitaria della volpe ai fini della vaccinazione antirabbica per via orale: esche, segnalazioni acustiche e metodi di cattura. *Rendiconti «Rabbia silvestre nell'arco alpino»*, Simposio Internazionale, Saint Vincent 1981.

CIUCHINI F., PESTALOZZA S., BUONAVOGLIA C., DI TRANI L., ORFEI Z. (1985). Ricerche su di un vaccino allestito con lo stipite SAD/BHK-21 (Berna) del virus della rabbia da impiegare per la vaccinazione della volpe. *La Clinica Veterinaria 108*: 219-230.

CIUCHINI F., PESTALOZZA S., BUONAVOGLIA C., DI TRANI L., ORFEI Z. (1986). Effects of corticosteroids mediated immunosuppression on the distribution of rabies vaccine virus in red fox orally immunized against rabies. *J. Vet. Med. B. 33*: 628-631.

SCHNEIDER L. G. (1982). Antigenic variants of rabies virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 5*: 101-107.

SCHNEIDER L. G., COX J. H. (1983). Ein Feldversuch zur oralen Immunisierung von Füchsen gegen die Tollwut in der Bundesrepublik Deutschland-I. Unschädliehkeit, Wirksamkeit und Stabilität der Vakzine SAD_{B19}. *Tierärztl. Umschau 38*: 315-324.

STECK F., WANDELER A., BICHSEL P., CAPT S., SCHNEIDER L. G. (1982). Oral immunization of foxes against rabies. A field study. *Zbl. Vet. Med. B. 29*: 372-396.

WANDELER A., BANDER W., PROCHASKA S., STECK F. (1982). Small mammal studies in a SAD baiting area. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 5*: 173.

WANDELER A., PFOTENHAUER I., STOEKER C. (1975). Über die Verwendung von Ködern zu Biologischen UnterSuchungen en Füchsen. *Revue Suisse Zool. 82*: 335-348.

WIKTOR T. J. (1980). Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infections and differentiation of rabies and rabies-related viruses. *J. Virol. Methods 1*: 33-46.

Parassitologia 30: 49-52, 1988

IL PROGRAMMA RHABDOVIRUS DELL'ISTITUTO PASTEUR - FONDAZIONE CENCI BOLOGNETTI

N. Orsi

Istituto di Microbiologia, Università «La Sapienza» di Roma.

Abstract. Studies carried out under the research program on Rhabdovirus sponsored by the Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti are reviewed. The program was mainly focused to investigate biologically relevant characteristics of this virus and to evaluate epidemiological and prophylactic aspects involved in sylvatic rabies control measures.

Key words: rabies virus, vescicular stomatitis virus, sylvatic rabies.

L'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti dell'Università di Roma «La Sapienza», nel quadro delle sue attività nel campo pasteuriano, ha promosso nel corso degli ultimi anni un programma di ricerche sui rhabdovirus. Questo programma ha avuto per oggetto sia lo studio di alcune fra le più interessanti caratteristiche biologiche di questo gruppo di virus, sia ricerche epidemiologiche, etologiche e profilattiche indirizzate soprattutto alla difesa nei confronti della rabbia silvestre.

Le ricerche biologiche di laboratorio hanno in particolare riguardato la suscettibilità di tipi di cellule filogeneticamente assai diverse alla infezione da rhabdovirus, i recettori cellulari coinvolti, i meccanismi di penetrazione nell'interno delle cellule, l'instaurazione di infezioni persistenti e l'azione antivirale di composti chimici e di inibitori biologici.

Le ricerche «sul campo» sono state invece indirizzate allo studio del comportamento delle volpi che rappresentano la specie più importante per la diffusione della rabbia silvestre, alla messa a punto di sistemi di vaccinazione di volpi e cani da impiegare per l'immunizzazione attiva di animali allo stato selvaggio e ad un sistematico controllo di cervelli di volpi catturate al fine di accertare l'eventuale diffusione della rabbia silvestre a zone ancora indenni.

Altre ricerche sono state condotte in tema di vaccinazione antirabbica nell'uomo, sia per quanto riguarda la valutazione dell'efficacia del vaccino allestito su cellule diploidi umane, sia la patogenesi di alcuni fenomeni indesiderati verificatisi nel corso di vaccinazioni umane.

Per quanto riguarda le ricerche strettamente biologiche sui rhabdovirus è stata studiata la permissività all'infezione da rhabdovirus di cellule umane,

aviarie, di pesce e di artropode. Lo studio dei recettori cellulari implicati nel legame con i rhabdovirus (virus della stomatite vescicolare o VSV, ceppo Indiana, virus rabbico fisso, ceppo CVS) è stato condotto secondo diversi approcci sperimentali rappresentati da: *a*) pretrattamento di cellule sensibili con vari enzimi (proteasi, lipasi, glicosidasi) prima del contatto con i virus; *b*) studio della competizione per il legame con i virus da parte di varie lactine; *c*) estrazione ed identificazione dei componenti recettoriali da tessuti o membrane cellulari; *d*) studio dell'effetto inibente di lipoproteine, gangliosidi e fosfolipidi.

Con il prettrattamento delle cellule sensibili con vari tipi di enzimi è stato dimostrato che componenti lipidici e glucidici della membrana cellulare partecipano alla interazione fra rhabdovirus e cellule ospiti. Gli esperimenti di competizione per il legame con i virus da parte di varie lectine aggiunte a cellule permissive o ad emazie di specie agglutinabile hanno dimostrato il coinvolgimento di acido sialico, N-acetilglucosamina e mannosio nei recettori cellulari per i rhabdovirus. L'estrazione e l'identificazione di componenti recettoriali da tessuto nervoso, da membrane di cellule permissive e da eritrociti, hanno dimostrato la capacità di fosfolipidi e gangliosidi di competere con i recettori cellulari nel legame con i virus. In particolare è stato dimostrato che lipoproteine sieriche a bassa e bassissima densità (LDL e VLDL), gangliosidi altamente sialilati (GQ1B e GT1B) e la fosfatidilserina impediscono l'attaccamento dei virus. Di conseguenza il sito di legame per i rhabdovirus appare essere una struttura piuttosto complessa che coinvolge vari componenti cellulari superficiali tra i quali svolgono un ruolo preminente fosfolipidi e gangliosidi.

Lo studio del meccanismo di penetrazione dei rhabdovirus in vari tipi di cellule permissive è stato effettuato a mezzo di indagini ultrastrutturali e biochimiche. Per le prime, in particolare, usando cellule filogeneticamente diverse, è stato dimostrato che il VSV penetra per endocitosi e dopo l'attaccamento il virus può essere ritrovato in «coated pits», «coated vesicles» e endosomi e/o lisosomi.

L'approccio biochimico è stato effettuato a mezzo di sostanze lisosomotropiche capaci di accumularsi negli endosomi e lisosomi cellulari aumentandone il pH ed impedendo così la reazione di fusione dell'involucro virale con la membrana endosomiale. Infatti agenti lisosomotropici quali l'amantadina, il cloruro di ammonio e la clorochina hanno dimostrato una notevole attività antivirale nei confronti sia del virus rabbico che del VSV. Tale attività antivirale non si esplica direttamente sul virus né durante la fase di attaccamento, ma nel periodo dell'infezione virale corrispondente all'internalizzazione, dimostrando così la penetrazione dei virus per endocitosi.

Un'ultima indagine è stata rivolta all'effetto di inibitori metabolici cellulari sulla moltiplicazione di rhabdovirus. L'impiego di sostanze quali la colcemide e la citocalasina che agiscono sull'organizzazione del citoscheletro ha dimostrato che i microfilamenti, e non i microtubuli, sono coinvolti negli eventi precoci della moltiplicazione virale.

L'impiego di inibitori della fosforilazione ossidativa (dinitrofenolo e azi-

de sodica) e della glicolisi (2-deossi-D-glucosio) ha dimostrato inoltre l'inibizione della moltiplicazione dei virioni già legati alle cellule.

È stato anche condotto uno studio, mediante sonde molecolari, del ruolo che diverse proteine del citoscheletro quali spettrine (subnità α e β), banda 3 e ankirina hanno nel processo di penetrazione di Rhabdovirus. Gli mRNA per tali proteine sono stati clonati da una genoteca in vettori d'espressione usando un sistema immunologico. I rispettivi cDNA, marcati con ^{32}P, sono stati usati come sonde in saggi di ibridazione molecolare con RNA totali estratti da cellule ai primissimi stadi dell'infezione con VSV (1 ora dopo adsobimento). Esperimenti eseguiti usando RNA totale non hanno dimostrato marcate differenze sulle quantità degli mRNA per le sopracitate proteine del citoscheletro in seguito a penetrazione con VSV.

Nel quadro delle ricerche condotte sulla vaccinazione antirabbica nell'uomo è stato effettuato uno studio sistematico dell'efficacia del vaccino allestito su cellule diploidi umane usando come parametri comparativi il dosaggio degli anticorpi circolanti a mezzo di immunofluorescenza diretta e l'attivazione dei linfociti circolanti secondo il test di Ten Napel. Sempre in tema di vaccinazioni umane, al fine di chiarire la patogenesi di alcuni aspetti indesiderati verificatisi nel corso della vaccinazione con vaccino allestito con cellule diploidi umane e con vaccino su embrione di anatra, sono stati sistematicamente valutati i livelli sierici di IgE e gli immuno-complessi circolanti.

Infine gli studi sul campo in merito alla diffusione della rabbia silvestre ed al suo contenimento mediante vaccinazione con virus viventi sugli animali selvaggi hanno avuto per oggetto da una parte il controllo sistematico di animali selvatici nell'ambito della regione Lazio e dell'altra un insieme di ricerche a largo respiro in zone dell'Italia settentrionale già colpite dalla diffusione della rabbia silvestre.

Queste ultime ricerche, che rappresentano il contributo dell'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti al programma di eradicazione della rabbia silvestre in Italia condotto dalle nostre autorità sanitarie di concerto con varie istituzioni scientifiche italiane, sono state comunque già ampiamente illustrate nella precedente relazione dei professori Biocca e Bellani.

Riassunto. Viene presentata una breve relazione sull'attività dell'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti nell'ambito di un programma di ricerche sui Rhabdovirus. Gli studi condotti hanno interessato alcune fra le più interessanti caratteristiche biologiche di questo virus e, parallelamente, indagini epidemiologiche e profilattiche indirizzate alla difesa nei confronti della rabbia silvestre.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Cioè L., Laurila P., Meo P., Krebs K., Goodman S., Curtis P. J. (1987). Cloning and nucleotide sequence of a mouse erythrocyte B-spectrin cDNA *Blood 70*: 915-920.

Conti C., Matromarino P., Tsiang H., Orsi N. (1985). Solubilization and characterization of cell membrane receptors for Rhabdoviruses. In: *Abstracts of the International Meeting on Advances in Virology*. Catania, p. 68.

Conti C., Superti F., Divizia M., Panà A., Tsiang H., Orsi N. (1987). Involvement of cell structures and functions in rabies infection. *Abstracts VII International Congress of Virology*. Edmonton, p. 76.

CONTI C., SUPERTI F., TSIANG H. (1986). Membrane carbohydrate requirement for rabies virus binding to CER cells. *Intervirology 26*: 164-168.

CONTI C., TSIANG H. (1985). Effect of Concanavalin A on the early event of rabies virus infecton of CER cells. *Intervirology 24*: 166-169.

DEMUTH D., SHOWE L. BALLANTINE M., PALUMBO A., FRASER P., CIOÈ L., ROVERA G., CURTIS P. J. (1986). Cloning and structural characterization of a novel nonerythroid band 3 protein expressed in human K562(s) cells. *EMBO J. 5*: 1205-1214.

MASTROENI I., VESCIA N., DE CAROLIS A., D'ARCA S. U., TARSITANI G. (1986). Rilievo della incidenza delle complicanze da vaccini DEV e HDCV. *Boll. Ist. Sieroter. Milan. 65*: 494-501.

MASTROMARINO P., CONTI C., CIUFFARELLA G., HAUTTECOEUR B., GOLDONI P., ORSI N. (1985). Attività recettoriale per il VSV di componenti di membrana di eritrociti di oca. In: *Riassunti XXI Congresso Nazionale di Microbiologia*, vol. II, p. 406.

MATROMARINO P., CONTI C., GOLDONI P., HAUTTECOEUR B., ORSI N. (1987). Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J. Gen. Virol. 68*: 2359-2369.

MASTROMARINO P., CONTI C., MORUCCI A., ORSI N. (1985). Role of phospholipids and glycolipids in VSV-induced hemolysis and hemagglutination . In: *Abstracts of the International Meeting on Advances in Virology*, Catania, p. 56.

MASTROMARINO P., CONTI C., ORSI N. (1986). Effect of concanavalin A on early interaction of Sindibis virus with goose erythrocytes and BHK 21 cells. *Microbiologica 9*: 295-303.

RAYSSIGNIER C., CIOÈ L., WITHERS E., WUNNER W. H., CURTIS P. J. (1986). Cloning of rabies virus matrix protein mRNA and ist amino acid sequence. *Virus Res. 5: 188-190.*

SEGANTI L. (1985). Interactions précoces entre les Rhabdovirus et les cellules hôtes. In: *XIV Conseil des Directeurs des Instituts Pasteur et associés*, Roma.

SEGANTI L., SUPERTI F., GIRMENIA C., MELUCCI L., ORSI N. (1985). Attachment and penetration of vesicular stomatitis virus in cell lines from different animal species. In: *Abstracts of the International Meeting on Advances in Virology*. Catania, p. 51.

SEGANTI L., SUPERTI F., GIRMENIA C., MELUCCI L., ORSI N. (1986). Study of receptors for vesicular stomatitis virus in vertebrate and invertebrate cells. *Microbiologica 9*: 259-267.

SINIBALDI L., GOLDONI P., SEGANTI L., SUPERTI F.. TSIANG H., ORSI N. (1985). Gangliosides in early interactions between vesicular stomatitis virus and CER cells. *Microbiologica 8*: 355-365.

SUPERTI F., CONTI C., HAUTTECOEUR B., MORELEC M. J., TSIANG H. (1987). Involvement of gangliosides in the cellular receptor-complex. *Abstracts VII International Congress of Virology*. Edmonton p. 76.

SUPERTI F., CONTI C., TSIANG H., ORSI N. (1985). Partecipazione dei carboidrati di membrana alla struttura recettoriale per il virus rabbico. In: *Riassunti XXI Congresso Nazionale di Microbiologia, vol. II*, p. 405.

SUPERTI F., GIRMENIA C., SEGANTI L., ORSI N. (1986). Role of sialic acid in cell receptors for vesicular stomatitis virus. *Acta Virologica 30*: 10-18.

SUPERTI F., HAUTTECOEUR B., MORELEC M. J., GOLDONI P., BIZZINI B., TSIANG H. (1986). Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J. Gen. Virol. 67*: 47-56.

SUPERTI F., SEGANTI L., DIVIZIA M., PANÀ A., ORSI N. (1987). Relationship between rabies virus attachment to different cells and their susceptibility to infection. *Abstract VII International Congress of Virology*. Edmonton, p. 323.

SUPERTI F., SEGANTI L., RUGGERI F. M., TINARO A., DONELLI G., ORSI N. (1985). Penetration of vesicular stomatitis virus into different cell lines. In *Abstract of ASM Conference on virus attachment and entry into cells*. Philadelphia, p. 11.

SUPERTI F., SEGANTI L., TINARI A., RUGGERI F. M., DONELLI G., ORSI N. (1987). Entry pathway of vesicular stomatitis virus into different host cells. *J. Gen. Virol. 68*: 387-399.

VESCIA N., MASTROENI I., CRISCIOTTI C., CELESTINO D., ADRIANI E., BONINI S. (1985). IgE e vaccinazione antirabbica. In *17° Congresso Soc. Ital. Allerg. Immunol. Clin.* Milano.

VESCIA N., MASTROENI I., D'ARCA S. U., TARSITANI G., SIMONETTI D'ARCA A., BUONAVOGLIA C. (1985). Influenza di pregressi trattamenti antirabbici con vaccino tipo Fermi sulla risposta anticorpale ad una dose di HDCV. *Boll. Ist. Sieroter. Milan. 64*: 269-273.

VITI D., SINIBALDI L., SUPERTI F., MELUCCI L., ORSI N. (1985). Partecipazione dei lipidi di membrana nell'interazione del VSV con cellule sensibili. In: *Riassunti XXI Congresso Nazionale di Microbiologia*, vol. II, p. 407.

VITI D., SINIBALDI L., SUPERTI F., MELUCCI L., ORSI N. (1987). VSV binding to lipids from different cell lines. *Arch. Virol. 93*: 279-285.

Parassitologia 30: 53-57, 1988

RABIES EPIDEMIOLOGY, NATURAL BARRIERS AND FOX VACCINATION

A. I. WANDELER, S. CAPT, H. GERBER, A. KAPPELER, R. KIPFER

Swiss Rabies Centre and WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Viral Zoonoses, Institute of Veterinary Virology, University of Berne, Switzerland.

Abstract. Rabies in Central Europe is maintained and spread by red foxes (*Vulpes vulpes*). The epidemiology is explained by a variety of parameters of the main host. Certain natural and artificial topographic features may function as barriers to the spread of the virus within fox populations. Taking into account epidemiological barriers greatly facilitated the strategic application of oral immunization of foxes for freeing Switzerland from rabies.

Key words: rabies, epidemiology, oral immunization, barriers, Central Europe.

THE EPIDEMIOLOGY OF FOX RABIES IN CENTRAL EUROPE

The rabies epizootic presently expanding in Central Europe originated in Eastern Europe nearly 50 years ago. For the understanding of the epidemiology and for the application of control measures the following observations may be of importance.

— The first rabies cases registered in newly invaded areas are almost always foxes (Kauker, 1966; Wandeler *et al.*, 1975*a*).
— The frontwave moves into new areas with a speed of approximately 25 to 60 km/year (Kauker, 1966; Moegle *et al.*, 1974; Kauker, 1975; Bögel *et al.*, 1976; Toma and Andral, 1977).
— Rivers, lakes, and high mountains function as natural barriers. Rivers are usually crossed where bridges are available (Steck *et al.*, 1980).
— Very intensive fox control may result in areas of low fox density. Such areas may also stop the spread of rabies.
— The case density in the frontwave is very high. In areas with good surveillance up to 2 rabid foxes per km^2 and year are recovered (Wandeler et al., 1974*a*).
— Foxes constitute the majority (60 to 85%) of all diagnosed rabies cases.
— In animals grouped according to conditions under which they are collected (shot by hunters, road kills, found dead, killed because of abnormal be-

haviour, etc.), the proportion of rabid ones is always higher in foxes than in similarly grouped categories of other species (Wandeler *et al.*, 1974*a*).

— In an area of a few hundred km^2 the frontwave epizootic lasts not more than one or two years after which rabies may disappear for several years.

— Where rabies itself and fox control reduce fox population density below a certain level, rabies disappears not only in foxes, but also in all other terrestrial species. The same observation is made in areas from which rabies disappears as a consequence of oral fox immunization. Only bat rabies is independent from the occurrence of the disease in foxes.

— Only foxes and badgers (*Meles meles*), but no other species, are reduced in population density by the event of a rabies epizootic.

— An area that becomes free from rabies may be reinvaded after a few years from adjacent infected regions. This is explained by rapid recovery of fox populations during the rabies-free years (Wandeler *et al.*, 1974*c*). The same may occur in areas freed by fox vaccination due to the rapid population turnover bringing the herd immunity below the threshold needed.

— 93% of the foxes with demonstrable rabies antigen in their brain have also infectious virus in their salivary glands. This percentage is lower in other European wild carnivores (Wandeler *et al.*, 1974*b*).

— None of about 1000 brain negative foxes from rabies infected areas revealed any virus in their salivary glands (Wandeler *et al.*, 1974*b*).

— Low titers of rabies neutralizing activity is found in a low percentage of sera taken from rabies negative foxes from areas with rabies or where rabies has recently passed through (Wittmann and Kokles, 1967; Wandeler *et al.*, 1974*b*). Titers may not always be specific. They are usually too low to be interpreted as the result of survivorship of clinical disease. The prevalence of neutralizing activity increases to over 50% in areas with oral fox immunization (Steck *et al.*, 1982*a*).

— Intensive search for virus and antibody in other species, especially in small mustelids, insectivores, and rodents did not reveal any indication of a rabies reservoir outside foxes (Steck and Wandeler, 1980). In the same species also no indication was found for a spread of the vaccine virus used for oral fox immunization (Wandeler *et al.*, 1982).

— The virus circulating in Central Europe in foxes is antigenically relatively uniform. It is clearly distinct from the virus occurring in bats in Northern Europe.

Crucial for the survival of rabies is that the virus is transmitted by an infected fox during the short period of virus excretion to enough susceptible individuals. The rate of infectious contacts is density-dependent. Rabies transmission ceases, when population density drops below a certain level or when herd immunity reaches a (density-dependent) threshold. Rabies spread through a landscape probably goes from territory to territory, and only rarely over longer distances. It is most likely the product of the abnormal territorial behaviour of clinically ill foxes getting in conflict with healthy, non-immune individuals. Such situations may arise, when a sick (disoriented) individual intrudes into the territory of a neighbour.

Barriers to the spread of rabies

During the present rabies epizootic in Europe it was repeatedly observed that certain natural and artificial features of the landscape impeded the spread of the disease. Not readily crossed over by rabies are lakes, high altitude mountain ranges, large and rapidly flowing rivers, freeways lined with game proof fences, and cities (Steck *et al.*, 1980). These features usually separate home ranges and divert dispersal movements of foxes. Such obstacles may be taken into account for planning and executing rabies control campaigns. For the area of Switzerland all barriers possibly stopping or channeling the spread of the epizootic were mapped. By doing this Switzerland was divided into epidemiological compartments of different sizes. The boundaries of the compartments are not identical with the boundaries of administrative units (cantons). On the maps we also identified all likely epidemiological entryways and loopholes into compartments. We demonstrated that it is possible to keep uninfected compartments free from rabies by immunizing the fox population of the area by which the epizootic could gain access to it.

Epidemiological barriers and vaccination campaigns

Coworkers of the Swiss Rabies Centre and the Vertebrate Biology Unit of the Zoological Institute of the University of Berne had carried out a number of field and laboratory studies aimed at the development of a system of oral fox vaccination applicable in the field. Franz Steck directed this research until his untimely death in 1982. A cloned derivative of a particular SAD strain meeting closest safety and immunogenicity requirements (Steck *et al.*, 1982*a* and *b*; Wandeler *et al.*, 1982) had been chosen. Chicken heads were used as baits. A vaccine container delivering the vaccine into the mouth cavity of a fox chewing the bait was developped (Häfliger *et al.*, 1982). The immunizing capabilities of this system proved to be excellent in laboratory trials. By 1978 the Rhone Valley, which is lined by high mountain chains of the Swiss Alps, was threatened by a front of fox rabies advancing along the lake of Geneva toward the valley entrance. This appeared to be an epidemiological situation ideal for testing the efficacy of oral fox immunization. Permission for a first field trial in the lower Rhone valley was given by all administrations concerned. Mid October of 1978, 4050 vaccine baits were deposited in an area of 335 km^2 in the area of Martigny, VS. The disease did not cross the barrier consisting of a population of about 60% immune foxes. In order to maintain a herd immunity sufficient to inhibit the spread of rabies, vaccination campaigns were repeated in spring and autumn of the following years. Since there was no direct proof that the rabies spread was stopped by the presence of immune individuals, the experiment had to be repeated in other similar situations, where an «immune barrier» could be built in the expected pathway of an epizootic frontwave. In no instance the barrier was crossed by the epizootic. It was also observed that fox immunization in in-

fected Alpine valleys brought the disease to disappear within a few months. This allowed to plan rabies eradication from larger areas.

Between 1978 and 1982 the repetition of field trials in Alpine valleys freed large areas in the Swiss Alps from rabies. In 1982 a concept for the eradication of the disease in Switzerland was developped. The country was divided into epidemiological compartments according to the description given above. Compartment after compartment was treated twice yearly with 12 to 15 baits per square kilometer. In some Alpine areas with reduced accessibility additional baits were dropped from helicopters. But most baits were placed by hand in predetermined places in order to achieve an even distribution and to reduce the chances that passers-by pick them up. Vaccine baiting was discontinued in a comparment when the disease had disappeared from it. Today the country is free from rabies, except for the nontreated areas bordering highly endemic zones abroad.

Conclusions

The most important conclusions from these first field applications of vaccine baits in Switzerland can be summarized as follows. It is possible to minimize by bait enough freeliving foxes in order *i*) to stop the spread of the disease into rabies free areas; *ii*) and it is also possible to eradicate the disease from an enzootic area.

In areas where this goal was achieved, more than 50% and less than 80% of all foxes were immunized. These figures are based on the demonstration of antibody in serum, and tetracycline in bone, of killed foxes. In areas freed from fox-rabies, rabies also disappears from all other species. The disease does not reappear spontaneously from an undetected reservoir after fox vaccination campaigns are discontinued, so rabies may reinvade a fox population becoming non-immune.

REFERENCES

Bögel K., Moegle H., Knorpp F., Arata A., Dietz K., Diethelm P. (1976). Characteristics of the spread of a wildlife epidemic in Europe. *Bull. Wld Hlth Org. 54*: 433-447.

Häfliger U., Bichsel P., Wandeler A., Steck F. (1982). Zur oralen Immunisierung von Füchsen gegen Tollwut: Stabilisierung und Köderapplikation des Impfvirus. *Zbl. Vet. Met. B 29*: 604-618.

Kauker E. (1966). Die Tollwut in Mitteleuropa von 1953 bis 1966. *Heidelberger Akad. Wiss., Math.-naturw. Kl. 4.*

Kauker E. (1975). Vorkommen und Verbreitung der Tollwut in Europa von 1966-1974. Sitzungsber. *Heidelberger Akad. Wiss., Math.-naturw. Kl. 2*: 49-84.

Moegle H., Knorpp F., Bögel K., Arata A., Dietz K., Diethelm P. (1974). Zur Epidemiologie der Wildtiertollwut: Untersuchungen im sudlichen Teil der Burdesrepublik Deutschland. *Zbl. Vet. Med. B 21*: 647-659.

Steck F., Wandeler A. (1980). The epidemiology of fox rabies in Europe. *Epid. Rev. 2*: 71-96.

Steck F., Wandeler A., Nydegger B., Manigley C., 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., Schneider L. (1982*a*). Oral immuniza-

tion of foxes against rabies. Laboratory and field studies. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 5*: 165-171.

STECK F., WANDELER A., BICHSEL P., CAPT S., SCHNEIDER L. (1982*b*). Oral immunisation of foxes against rabies. A field study; *Zbl. Vet. Med. B 29*: 372-396.

TOMA B., ANDRAL L. (1977). Epidemiology of fox rabies. *Adv. Virus. Res. 21*: 1-36.

WANDELER A. I., BAUDRE W., PROCHASKA S., STECK F. (1982). Small mammal studies in a SAD baiting area. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 5*: 173-176.

WANDELER A. I., MÜLLER J., WACHENDÖRFER G., SCHALE W., FÖRSTER U., STECK F. (1974*c*). Rabies in wild carnivores in Central Europe. III. Ecology and biology of the red fox in relation to control operations. *Zbl. Vet. Med. B 21*: 765-773.

WANDELER A. I., PFOTENHAUER P., STOCKER C. (1975). Ueber die Verwendung von Ködern zu biologischen Untersuchungen an Füchsen. *Rev. Suisse Zool. 82*: 335-348.

WANDELER A., WACHENDÖRFER G., FÖRSTER U., KREKEL H., SCHALE W., MÜLLER J., STECK F. (1974*a*). Rabies in wild carnivores in Central Europe. I. Epidemiological studies. *Zbl. Vet. Med. B 21*: 735-756.

WANDELER A., WACHENDÖRFER G., FÖRSTER U., KREKEL H., SCHALE W., MÜLLER J., STECK F. (1974*b*). Rabies in wild carnivores in Central Europe. II. Virological and serological examinations. *Zbl. Vet. Med. B 21*: 757-764.

WITTMANN W., KOKLES R. (1967). Weitere Untersuchungen zur Frage der latenten Tollwutinfektion bei Füchsen. *Arch. Exp. Vet. Med. 21*: 165-173.

Parassitologia 30: 59-66, 1988

ESECUZIONE PRATICA DELLA VACCINAZIONE ORALE DELLE VOLPI NEL CANTONE TICINO

T. VANZETTI

Veterinario Cantonale, Dipartimento dell'Economia Pubblica, Sezione Veterinaria Cantonale, CH-6501 Bellinzona, Svizzera.

Abstract. The oral fox vaccination campaigns in 1984/85 in canton Tessin in Switzerland are described in detail. An area of 197 km ^{2} was treated 4 times with 2260 baits in order to prevent the invasion of a rabies epizootic from abroad. A comparison is made to the rest of Switzerland, where from 1978 to 1986 a total of 545,399 baits were distributed. An evaluation of the campaigns in 10 cantons revealed that the total costs varied between 2.17 Sfr (1.54 $) and 5.84 Sfr (4.16 $) per bait.

Key words: rabies, oral vaccination, costs, Switzerland.

INTRODUZIONE

Porgo agli organizzatori e a tutti i convenuti il saluto più cordiale mio e a nome dei signori dott. Gafner e dott. Riggenbach dell'Ufficio federale di veterinaria, che non hanno potuto presenziare al convegno di oggi e scusano la loro assenza. Ho il piacere di rappresentare in questa circostanza l'Ufficio federale in qualità di veterinario cantonale del Cantone Ticino, del quale va opportunamente evidenziata la particolarità di appartenere politicamente alla Confederazione elvetica, ma geograficamente e culturalmente all'area lombarda.

Benché più volte minacciato da varie ondate di rabbia provenienti dal nord e dal nord-est, il Ticino è rimasto finora indenne dalla malattia, ciò che costituisce in Svizzera una situazione di grande privilegio.

Nel 1982-83 numerosi focolai disseminati di rabbia si sono verificati in Valtellina e lungo i pendii che costeggiano il Lago di Como, spingendosi fino a pochi chilometri dal confine tra le province di Sondrio e di Como e il Cantone Ticino. Ritenuto reale e incombente il pericolo di diffusione della malattia nelle regioni meridionali del nostro Paese, il Cantone Ticino ha organizzato, in collaborazione con il Cantone Grigioni e sotto la direzione tecnica della Centrale svizzera della rabbia, una campagna di vaccinazione orale delle volpi.

Aspetti geografici

Il Ticino è percorso, nella parte settentrionale, dalla catena delle Alpi che lo separa geograficamente dal resto della Svizzera. I principali passi alpini si situano attorno ai 2000/2400 metri s/m (San Gottardo, Lucomagno, Novena). Verso meridione esso confina con l'Italia (Fig. 1):

— Ad est con la provincia di Sondrio, dalla quale è separato dalle propaggini alpine, la cui altitudine è compresa tra i 1500 e i 2000 metri s/m (Passo San Jorio, Passo San Lucio). Queste formazioni montagnose sono però interrotte dal bacino principale del Lago Ceresio.
— A sud si apre in zona collinare sulle province di Como e di Varese.
— Ad ovest confina con la provincia di Novara in zona prealpina e lacustre (Lago Maggiore).

Fig. 1. Posizione geografica del Cantone Ticino.

Situazione epidemiologica prima della campagna di vaccinazione

Il Ticino rientra tra i pochi Cantoni Svizzeri finora risparmiati dalla rabbia. Le ragioni di questa favorevole situazione vanno almeno in parte attribuite alla barriera naturale costituita dalla catena alpina, che con ogni probabilità ha ostacolato la propagazione dei vari fronti epizootici provenienti dal nord nella seconda metà degli anni settanta e all'inizio di questo decennio (Cantoni

Grigioni, Uri e Vallese) rispettivamente dall'est negli anni 1982-84 (Valtellina). D'altra parte va evidenziato che le formazioni alpine costituiscono una barriera solo relativa al diffondersi della rabbia, in particolare quando l'altitudine dei valichi è inferiore ai 2000 metri s/m.

La situazione di maggiore pericolo per il Cantone Ticino è venuta a crearsi negli anni 1982-84 quando, nelle province italiane confinanti di Sondrio e di Como, furono registrati numerosi casi di rabbia silvestre. Molti comuni ubicati in Valtellina, nel piano di Chiavenna e lungo i due versanti del Lago di Como furono dichiarati infetti e sottoposti dalle competenti autorità sanitarie alle necessarie misure di polizia epizootica. Il focolaio più vicino al confine si verificò nella località di Garzeno, a circa 6 km dal passo San Jorio (2014 metri s/m). Un'eventuale ulteriore propagazione dell'epizoozia verso occidente avrebbe raggiunto con ogni probabilità il Ticino, verosimilmente attraverso i Passi San Jorio, San Lucio (1542 metri s/m) o lungo il versante settentrionale del bacino principale del Lago Ceresio (Fig. 2).

D'intesa con l'Ufficio federale di veterinaria, sotto la direzione tecnica della Centrale svizzera della rabbia e in collaborazione con il Cantone dei Grigioni fu deciso, nell'autunno 1983, di organizzare una campagna di vaccinazione orale antirabbica delle volpi. La zona di vaccinazione fu scelta a ridosso del confine italo-svizzero nelle seguenti regioni: Val Mesolcina, Val Calanca, Valle Riviera, Bellinzonese, Valle Morobbia, Piano di Magadino fino al Lago Verbano, parte del Gambarogno, Alto Vedeggio, Val Colla e Valle Capriasca. Scopo della vaccinazione fu quello di impedire un'eventuale diffusione della rabbia lungo le valli superiori del Ticino. Occorre qui evidenziare che, per motivi d'ordine geografico, una protezione del Ticino meridionale non è attuabile senza la compartecipazione delle province italiane confinanti.

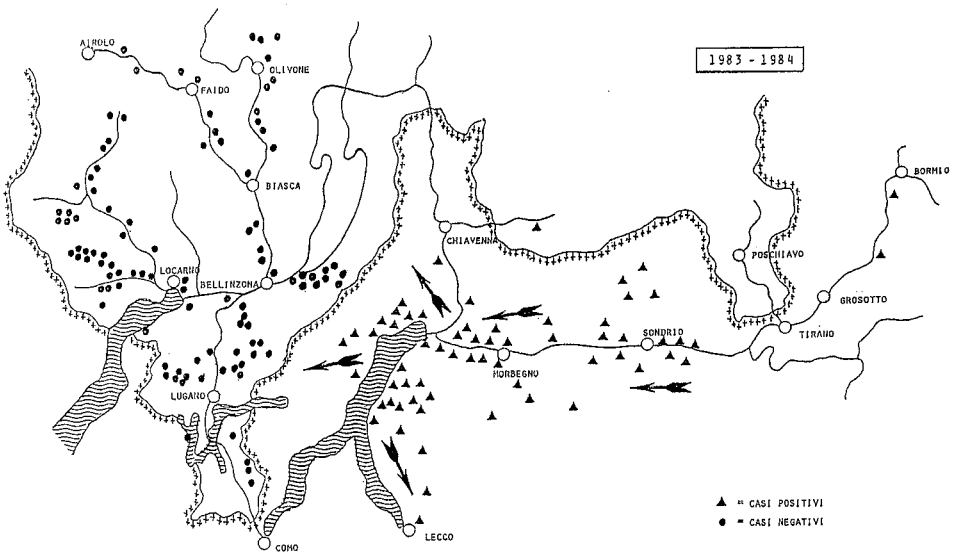


Fig. 2. Casi di rabbia silvestre registrati nel 1983-1984.

Organizzazione della campagna di vaccinazione orale delle volpi

La pianificazione delle azioni di vaccinazione delle volpi viene effettuata a livello nazionale dalla Centrale svizzera della rabbia a Berna. In particolare la Centrale: delimita le zone di vaccinazione; allestisce le carte geografiche con l'ubicazione precisa dei punti di posa delle esche; esegue tutti i controlli di ordine diagnostico; esercita la sorveglianza tecnica sui Cantoni in occasione della preparazione delle esche e della loro distribuzione nell'ambiente. L'Ufficio federale di veterinaria esercita l'alta sorveglianza ed è competente per il rilascio delle autorizzazioni. L'organizzazione di dettaglio e l'onere finanziario incombono ai Cantoni.

Nella pratica si è dimostrato utile procedere secondo il seguente schema operativo proposto dalla Centrale della rabbia, che specifica sia i modi che i tempi di intervento (Tab. 1).

Le azioni eseguite nel Cantone Ticino si sono susseguite nella primavera e nell'autunno 1984 e 1985. Conformemente alle direttive dell'Ufficio federale di veterinaria era prevista in un primo tempo la ripetizione delle stesse ad intervalli semestrali durante un periodo minimo di 3 anni. In ragione della favorevole evoluzione intervenuta nel frattempo nelle province italiane confinanti fu decisa l'interruzione della campagna all'inizio del 1986.

I dati medi concernenti le 4 campagne di vaccinazione eseguite in Ticino nel 1984-1985 possono venire riassunti nel modo seguente.

Superficie di vaccinazione: 197 km^2 (+ 59 km^2 nel Canton Grigioni).
Esche distribuite: 2260 unità (+ 721 unità nel Canton Grigioni).
Densità media delle esche: 11,4 unità/km^2 (comprese le zone di difficile accesso).
Personale impiegato: agenti del Servizio Caccia e Pesca:
preparazione esche: 9 agenti; 4 1/2 ore;
distribuzione esche: 12 squadre di 2 persone; 1 squadra/settore; circa 200 esche/settore.

Costi dell'operazione

Possono venir suddivisi in costi diretti, indiretti e totali. I costi diretti (Tab. 2) si riferiscono alle spese direttamente conseguenti alla campagna, non rientranti quindi nelle uscite generali della pubblica amministrazione. Essi non comprendono quelli riguardanti la retribuzione del personale, in quanto si tratta esclusivamente di impiegati statali comunque stipendiati, e nemmeno quelli relativi ai mezzi di trasporto, di proprietà dello Stato. Questi costi indiretti possono venire calcolati con buona approssimazione (Tab. 3). I costi totali sono indicati nella Tab. 4.

Per una valutazione in termini più generali dei costi delle campagne di vaccinazione, vengono riportati nelle Tabb. 5 e 6 i dati concernenti 101 azioni eseguite in 10 cantoni nel periodo 1978-1986. Va rilevato che, a seconda dell'organizzazione e delle modalità di esecuzione delle campagne, il calcolo

TABELLA 1 - Campagna di vaccinazione: modalità e tempi di esecuzione. *Giorno 0 = Inizio effettivo della campagna.

Tempi di esecuzione *	Modalità
—6/—3 mesi	- Consultazione della Centrale Svizzera della Rabbia - Organizzazione di massima - Autorizzazione dell'Ufficio Federale di Veterinaria - Budget e modalità di finanziamento - Decreto governativo
—3 mesi	- Organizzazione di dettaglio - Zona di vaccinazione e punti di distribuzione esche (12-18/km^2) - Competenze (direzione generale, responsabili settoriali, operatori per la preparazione e la distribuzione delle esche) - Vaccinazione antirabbica del personale (2 volte, intervallo 30 giorni; titolo anticorpale dopo altri 30 giorni)
—2 mesi	- Settori di vaccinazione - Vie di accesso, mezzi di trasporto - Eventuale noleggio di un elicottero - Locale e celle per la preparazione e il deposito delle esche
—1 mese	- Riunione informativa con personale e operatori, associazioni venatorie, comuni e autorità locali, medici e veterinari - Convocazione mass-media - Ordinazione del vaccino - Ordinazione delle esche (teste di gallina; riserva supplementare del 50%; solo da macelli idonei)
—2 settimane	- Conferenza stampa - Controllo sierologico del personale vaccinato - Eventuale riunione informativa
—1 settimana	- Circolare a medici, veterinari e autorità sanitarie locali (misure sanitarie precauzionali e di intervento in caso di contaminazione di persone) - Predisposizioni per l'invio di animali al laboratorio di analisi dopo la campagna (guardacaccia, polizia, veterinari)
—3 giorni	- Comunicato stampa (radio, TV, quotidiani) - Conferma circa la fornitura delle esche
—1 giorno	- Ritiro delle esche e deposito a 4°C - Controllo dei locali e delle installazioni - Ripetizione del comunicato stampa
Giorno 0	- Ultimo stadio della preparazione del vaccino presso la centrale della rabbia - Ritiro del vaccino - Preparazione delle esche (introduzione del vaccino e iniezione della tetraciclina) - Deposito a 4°C (1 recipiente per settore) - Controllo degli autoveicoli
Giorno 1	- Posa delle esche nei punti di distribuzione prestabiliti (1 squadra/settore) - Ritiro e controllo del materiale
Giorno 2-4	- Controllo di alcuni punti di distribuzione per una prima stima (percentuale delle esche sparite)

Dopo il giorno 2	- Invio di carnivori selvatici alla centrale della rabbia per i seguenti esami:
	  - Titolo anticorpale
	  - Tetraciclina nel tessuto osseo
	  - Ricerca e determinazione del virus

TABELLA 2 - Costi medi della campagna, espressi in franchi svizzeri, lire * e dollari U.S.A. **. Costi diretti.

Voce di spesa	Costo medio
Vaccinazione del personale	1633
Vaccino	4833
Teste di gallina	235
Materiale vario	450
Totale	7151
Costo per unità vaccinale	3,16 2650 * 2,25 **

TABELLA 3 - Costi medi della campagna, espressi in franchi svizzeri. Costi indiretti.

Voci di spesa	Costo parziale	Costo medio
Preparazione delle esche 9 persone	4,5 h (× Fr. S. 16)	648
Distribuzione delle esche 24 persone	10 h (× Fr. S. 16)	3840
Mezzi di trasporto 12 autoveicoli	150 km (× Fr. S. 0,5)	900
Totale		5388

TABELLA 4 - Costi totali medi della campagna, espressi in franchi svizzeri, lire * e dollari U.S.A. **.

Costi diretti	7151
Costi indiretti	5388
Totale	12.539
Costo per unità vaccinale	5,55 4720 * 3,95 **

TABELLA 5 - Azioni di vaccinazione orale delle volpi in Svizzera: 1978-1986.

Cantoni: FR, GR, LU, SG, SZ, TI, VD, VS, ZG, ZH	
Numero di azioni oggetto dell'indagine:	101
Superficie totale cumulata (km ^{2}):	39.981
Numero totale di unità vaccinali (esche):	545.399
Costo totale (franchi svizzeri):	1.614.338
Costo medio per unità vaccinale (franchi svizzeri):	2,96

TABELLA 6 - Azioni di vaccinazione orale delle volpi in Svizzera: medie cantonali 1978-1986.

Cantone	N. azioni (Totale 101)	Superficie media/ azione (km^2)	N. unità vacc./ azione	Costo medio/ azione	Costo medio/ unità vaccinale
FR	10	562	7.007	16.840	2,40
GR	11	471	7.040	27.877	4,36
LU	3	271	2.623	7.158	2,73
SG	8	819	10.192	36.984	3,63
SZ	8	208	2.652	10.250	3,87
TI	4	197	2.260	7.226	3,20
VD	19	410	6.129	13.271	2,17
VS	24	196	2.996	6.651	2,22
ZG	3	196	2.531	14.770	5,84
ZH	11	571	7.480	23.178	3,10

dei costi può variare leggermente da un cantone all'altro. Il costo medio unitario risulta compreso tra Fr. 2.17 e Fr. 5.84.

CONTROLLI EPIDEMIOLOGICI SUCCESSIVI ALLA VACCINAZIONE

I controlli diagnostici eseguiti sugli animali inviati alla Centrale della rabbia successivamente all'attuazione della campagna di vaccinazione rivestono una notevole importanza. Essi permettono di determinare: 1) la presenza di tetraciclina nelle ossa quale segno probante dell'avvenuta ingestione dell'esca; 2) la presenza di anticorpi nel sangue quale segno probante dell'induzione di un'immunità più o meno buona; 3) la presenza del virus vaccinale o di altri virus rabidi.

La valutazione dei risultati analitici e quindi dell'efficacia della campagna di vaccinazione viene effettuata a livello nazionale dalla Centrale della rabbia. La percentuale dei carnivori selvatici, in prevalenza volpi, provenienti dalle zone di vaccinazione e sottoposte all'esame sulla TC, è stata leggermente infe-

riore alla media svizzera, che si aggira attorno al 60-70%. Il numero dei dati disponibili non permette tuttavia di trarre delle conclusioni significative e attendibili dal profilo statistico.

Conclusioni

L'efficacia della vaccinazione orale delle volpi nell'interruzione delle catene di infezione nel ciclo silvestre e, di conseguenza, nella prevenzione di questa zoonosi anche negli ambienti domestici, è stata ormai ampiamente dimostrata dalle molte azioni condotte con successo da circa un decennio.

L'effetto barriera esercitato dalle formazioni montagnose nei riguardi della naturale propagazione della rabbia, l'immunizzazione attiva delle volpi quale misura radicale di prevenzione e probabilmente anche altri fattori più difficilmente individuabili, hanno fatto sì che il Ticino fosse in passato risparmiato dalla malattia anche nei momenti di maggiore pericolo.

In dipendenza della futura evoluzione della situazione epizootologica potrebbe tuttavia sorgere o ravvivarsi l'esigenza di una fattiva collaborazione a livello internazionale nell'esecuzione di campagne di vaccinazione congiunte, interessanti contemporaneamente la Svizzera meridionale e la Lombardia, realizzabili entro termini di tempo relativamente brevi e sulla base di schemi organizzativi e operativi compatibili.

Parassitologia 30: 67-69, 1988

INDAGINI SULLA PROFILASSI DELLA RABBIA SILVESTRE NELLA PROVINCIA DI ROMA

C. INGRAVALLO

Direzione Servizio Biologico-Faunistico, Provincia di Roma.

Abstract. This summary briefly describes the work carried out in recent years by the staff of the Province of Rome for prevention of sylvatic rabies.

Key words: sylvatic rabies, prevention, Rome Province.

La provincia di Roma, prima ancora che la rabbia silvestre fosse penetrata nel 1977 nel territorio italiano, aveva iniziato ricerche in collaborazione con l'Istituto di Parassitologia dell'Università di Roma (Prof. Ettore Biocca), dirette a studiare e coordinare un programma di prevenzione della rabbia silvestre, attraverso lo studio della distribuzione e del comportamento delle volpi e degli altri predatori, in rapporto alla eventuale vaccinazione orale antirabbica.

Sono stati contemporaneamente studiati quei fattori ambientali di maggiore interese sanitario per l'eventuale passaggio della rabbia silvestre, sostenuta fondamentalmente delle volpi, a forme più pericolose per l'uomo di rabbia urbana sostenuta prevalentemente da cani (sono stati effettuati studi e controlli delle discariche comunali ed abusive).

È stato approfondito lo studio del fenomeno del randagismo canino, particolarmente diffuso in alcun aree della Provincia romana, soprattutto montane, per il pericolo che la rabbia silvestre possa trovare nei randagi condizioni di pericolosa diffusione e per tutti quegli aspetti preoccupanti che interessano il reinselvatichimento canino (danni al bestiame domestico, ecc.).

Lo studio dei cervelli delle volpi, per il controllo della eventuale presenza di virus rabbico (centinaia di esami ogni anno), e la ricerca di altri agenti patogeni trasmissibili attraverso la volpe (trichinella, sarcosporidi, leishmanie, toxoplasma, ecc.) hanno permesso di evidenziare numerosi focolai di trichinelliasi (da *Trichinella* sp.) in aree diverse della nostra Provincia e di confermare l'importanza della volpe quale vettore di sarcosporidiasi, parassitosi che può colpire l'uomo e che risulta ampiamente diffusa tra ovini e bovini della nostra Provincia.

Lo studio della distribuzione dei micromammiferi portato avanti paralle-

lamente alle ricerche sulla biologia e sul comportamento della volpe ha permesso di iniziare la realizzazione di un quadro di distribuzione dei micromammiferi dei generi *Apodemus, Chletrionomys, Elyomys, Mus, Pitymis, Rattus, Sorex*, ecc., nelle diverse aree della provincia, al fine di conoscere meglio il loro significato, nella alimentazione delle volpi nelle varie stagioni e nella trasmissione di agenti infettanti.

TABELLA 1 - Volpi esaminate della provincia di Roma.

Stagione venatoria	N. volpi esaminate	N. positivi per trichinella	N. positivi per virus rabbico
1981-1982	589	5 (0,85%)	— (0,00%)
1982-1983	545	6 (1,10%)	— (0,00%)
1983-1984	1078	7 (0,65%)	— (0,00%)
1984-1985	486	3 (0,70%)	— (0,00%)
1985-1986	191	2 (1,05%)	— (0,00%)
Totale	2889	23 (0,80%)	— (0,00%)

Sono inoltre state effettuate ricerche per filarie (n. 182 carcasse esaminate, n. 19 positivi, 10,44%) e per toxoplasma (n. 538 campioni esaminati, n. 12 positivi, 2,23%).

TABELLA 2 - Dati relativi al randagismo canino nella provincia di Roma, anno 1985.

Comprensorio	N. Comuni	Servizi accalappiacani	Canili	Cani registrati	Cani catturati non morsicatori	Cani restituiti	Cani abbattuti	Cani morsicatori
I	11	4 (1 privato)	5	3098	126	—	—	144
II	17	2	—	2223	10	1	9	134
III	31	6 (2 privati)	8	487 (17 comuni)	—	—	—	38
IV	19	12	3	1139 (10 comuni)	907	42	457	567
V	19	14 (12 privati)	3	1592 (13 comuni)	320	7	279	34
VI	16	13 (3 privati)	2	4171 (13 comuni)	906	254	573	331
VII	4	4	2	2074	785	52	735	418
VIII	Comune di Roma	1	1	36560	1128	748	920	245
Totale	118	56 (47,46%)	24 (20,34%)	51344 (86/118 comuni)	4182	1104	2933	1911

TABELLA 3 - Dati relativi alle discariche nella provincia di Roma, anno 1985.

Comprensorio	N. Comuni	Discariche comunali		Discariche abusive		N. focolai *
		Numero	Superficie totale	Numero	Superficie totale	
I	11	7	mq 107.700	5	mq 8.650	14
II	17	13	mq 36.900	6	mq 8.100	6
III	31	2	mq 700	4	mq 3.390	25
IV	19	7	mq 134.300	20	mq 25.335	24
V	19	2	6 cass. 15 mc	19	mq 6.800	24
VI	16	2	2 cass. 50 mc	13	mq 17.070	27
VII	1	1	mq 1.000	—	—	—
VIII	4	—	—	2	mq 650	4
Totale	118	33	mq 280.600 6 cass. 15 mc 2 cass. 50 mc	69	mq 69.995	124

* Si intende per "focolai" discariche abusive con superficie inferiore ai 100 mq.

Questo complesso di ricerche, che vengono tuttora portate avanti nella Provincia di Roma e che hanno visto e vedono integrati ricercatori di vari Istituti dell'Università di Roma «La Sapienza» (R. Costantini, G. Cancrini, A. Jori, R. Romano, M. Bagalino, B. Germoni, F. Coda e M. Ortis dell'Istituto di Parassitologia; S. U. D'Arca ed A. Panà dell'Istituto di Igiene; G. Rocchi della III Clinica Medica), sono state possibili anche grazie alla collaborazione costante del Servizio di Vigilanza Venatoria della Provincia di Roma (Agente Venatorio Capo P. Giustini; Agenti Venatori Capozona Z. Angeloni e T. Ciani, Dirigente Servizio Biologico-Faunistico C. Ingravallo) coordinato dal servizio biologico sempre dell'Amministrazione Provinciale.

La mia breve relazione riassuntiva rappresenta la sintesi di un ampio lavoro collettivo schematicamente riportato nelle tabelle 1, 2 e 3.

Riassunto. Viene schematicamente riassunto il lavoro tecnico scientifico realizzato in questi ultimi anni dalla Provincia di Roma, nella prevenzione e nello studio della rabbia silvestre.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

CANCRINI G., JORI A., COSTANTINI R., SALNICCIA R., BAGALINO S., PERSIANI A., ORTIS M., CORSELLI A. (1982). Indagine preliminare sulla distribuzione della trichinelliasi silvestre in 589 volpi della Provincia di Roma. *Riv. Acta Medit. Patol. Inf. Trop. 1*: 175-176.

CORSELLI A., ROMANO A., PERSIANI A. (1983). Ulteriori osservazioni sulla distribuzione della trichinelliasi silvestre in volpi della Provincia di Roma. *Parassitologia. 25*: 249-251.

Parassitologia 30: 71-79, 1988

CONTRIBUTI PER UNA PROPOSTA DI MODIFICA DELLE ISTRUZIONI MINISTERIALI PER LA PROFILASSI ANTIRABBICA ALLA LUCE DELL'ESPERIENZA DEL CENTRO ANTIRABBICO DI ROMA

G. M. FARA[1], A PANÀ[2], C. SIGNORELLI[1], S. MANCINELLI[2], M. C. MARAZZI[1], L. PALOMBI[2]

[1] *I Cattedra di Igiene e Servizio di Igiene e Tecnica Ospedaliera, Università di Roma «La Sapienza»;*
[2] *Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università di Roma «Tor Vergata».*

Abstract. Records of clinical assistance and of post-exposure antirabid prophylaxis from 4820 outpatiens who attented the Antirabid Center of Rome following animal bites in 1986 were analysed. We observed a high proportion of people submitted to active immunization (44% received at least one shot of HDCV vaccine) in spite of the fact that rabies is absent from Central Italy since many decades in both wild and domestic animals. These considerations suggest the opportunity of a major revision of the official recommendations for rabies prevention, and we feel that different policies should be adopted in rabies enzootic areas (such as Northern Italy) compared to those where the risk is only potential. Immunization should be avoided after bites by rodents; passive immunization should be added to the vaccine after bites by wild animals in enzootic areas, while bites by cats and dogs, even unrecovered, will not be necessarily followed by vaccination in non enzootic areas.

Key words: rabies, animal bites, vaccinal prevention.

La prima considerazione che emerge dall'esame della casistica 1986 del Centro Antirabbico di Roma (Marazzi *et al.*, 1988; Signorelli *et al.*, 1987) è il numero elevato di prestazioni annue erogate dal servizio: 4820 prime visite, che raggiungono il numero di circa 15.000 considerando le successive prestazioni in caso di somministrazione della profilassi vaccinale. Il fatto testimonia una sensibilizzazione della popolazione romana al problema e, soprattutto, la pratica diffusissima tra i medici dei Pronti Soccorsi di Roma e provincia di inviare elettivamente il paziente al Centro in caso di morsicatura da animale. Si tratta quindi di una notevole scrupolosità da parte dei medici, apparentemente ridondante se si considera che il Lazio è una regione indenne da rabbia silvestre da diversi decenni e non coinvolta nell'epizoozia che ha interessato, dagli inizi degli anni '70, alcune regioni settentrionali italiane (Gelosa *et al.*, 1983; Merli, 1983; Porro de' Somenzi, 1983).

Esaminando in dettaglio i dati riferiti alle 4820 prime prestazioni del 1986, emerge una concentrazione dei soggetti morsicati nelle fasce di età più basse, in particolare nelle prime tre decadi, con moda nella fascia 10-19 anni.

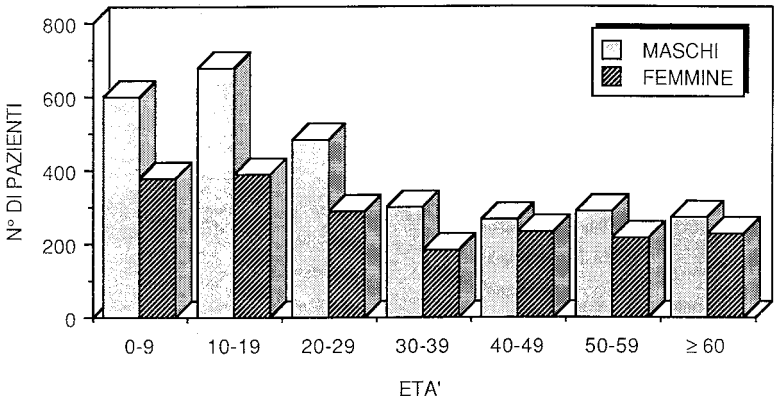


Fig. 1. Distribuzione per fasce d'età e sesso.

Mentre nelle fasce al di sotto dei 20 anni la prevalenza del sesso maschile è sensibilmente maggiore rispetto a quello femminile, nelle altre ciò è meno evidente (Fig. 1).

La sede della lesione ha riguardato prevalentemente gli arti (superiori ed inferiori), con una bassa percentuale per il capo ed il collo (Tab. 1); dai dati raccolti non è risultata valutabile la prevalenza delle morsicature in zone altrettanto pericolose, come areole mammarie e bordo ungueale. In gran parte si tratta di lesioni di lieve entità, ovvero di escoriazioni, mentre lesioni di maggiore gravità si riscontrano in una percentuale minima di casi, costituita da ferite lacere e ferite richiedenti sutura (Fig. 2).

Il motivo della morsicatura dovrebbe rivestire un ruolo di primaria importanza nella scelta della profilassi da seguire: tuttavia, l'elevato numero di

TABELLA 1 - Localizzazione della morsicatura.

Localizzazione	N.	%
Dato mancante	45	
Capo	271	5,7
Collo	28	0,6
Tronco	349	7,3
Arti superiori	2261	47,4
Arti inferiori	1746	36,6
Genitali	11	0,2
Tronco + Arto superiore	31	0,6
Tronco + Arto inferiore	32	0,7
Arto superiore + inferiore	46	1,0
Totale	4820	100,0

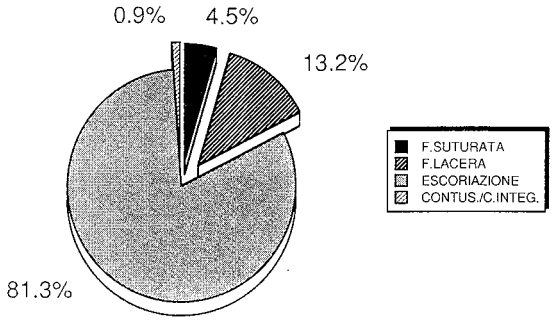


Fig. 2. Tipo di ferita.

bambini, sicuramente non in grado di rifere esattamente le circostanze dell'accaduto, concentra molte delle cause nella risposta «senza causa apparente» e non permette di utilizzare il dato come criterio di giudizio sulla scelta del trattamento (Tab. 2).

Per quanto riguarda il trattamento profilattico da seguire in caso di lesione provocata da animale (OMS, 1973), esso è regolato, per l'Italia, dalla Circolare 60/1982 del Ministero della Sanità (Tab. 3), a cui si attengono i medici del Centro di Roma.

Lo schema vaccinale completo (5 dosi HDCV) viene applicato tutte le volte in cui l'animale morsicatore è deceduto o non è reperibile (salvo interromperlo qualora il suddetto venisse in seguito identificato e riconosciuto indenne dopo non meno di 10 giorni); quando l'animale è reperibile ci si limita alla sorveglianza veterinaria, ma — se la localizzazione anatomica della/e ferita/e riguarda sedi «pericolose» (testa, genitali, bordo ungueale, areole mamma-

TABELLA 2 - Motivo della morsicatura.

Motivo	N.	%
Dato mancante	1029	
Giocava/accarezzava l'animale	975	25,7
Dava da mangiare	74	2,0
Animale con cuccioli	46	1,2
Entrava in casa del proprietario dell'animale	23	0,6
Separava due animali in lotta	126	3,3
Molestava l'animale	591	15,6
Transitava in bici/moto	127	3,4
Altro *	195	5,1
Senza motivo apparente	1634	43,1
Totale	4820	100,0

* Tra cui «Animale infastidito da altro», «Soccorreva l'animale», ecc.

TABELLA 3 - Riassunto Circolare Ministero della Sanità n. 60/1982.

Animale apparentemente sano reperibile o sotto controllo che ha morsicato perché molestato o con cuccioli	A B C	Nessuno [1] Vaccino [2] RIg + Vaccino [2]
Animale apparentemente sano reperibile o sotto controllo ma che ha morsicato senza motivo o che ha manifestato un'aggressività sospetta o che ha cambiato atteggiamento nei confronti dei padroni	A B C	Vaccino [2] Vaccino [2] RIg + Vaccino [2]
Animale scomparso o rabido	A B C	Vaccino Vaccino RIg + Vaccino
Animale deceduto con testa in esame	A B C	Vaccino [3] Vaccino [3] RIg + Vaccino [3]

A = Contatto con saliva o lambitura su cute non integra, ferita lieve.
B = Ferita grave o localizzata nelle zone di maggior rischio esclusa la testa (genitali, areole mammarie, bordo ungueale).
C = Ferite alla testa o particolarmente gravi od estese.

[1] [2] = Iniziare [1] o completare [2] la vaccinazione solo se l'animale manifesta la rabbia nel corso del periodo di osservazione di 10 giorni.
[3] = Sospendere la vaccinazione in caso di test di immunofluorescenza e prova biologica negativi.

rie, ecc.) — viene sempre somministrata una prima dose, in attesa dell'esito della sorveglianza stessa. La somministrazione di RIg (Immunoglobuline specifiche antirabbiche), congiuntamente al vaccino, è riservata a casi di morsicature estese e/o interessanti zone del corpo ad alto rischio.

Oltre ai casi sopra ricordati, una vaccinazione iniziata può essere interrotta anche per il rifiuto del paziente alla sua continuazione, oppure quando insorgano importanti (rarissimi) effetti collaterali (Mastroeni *et al.*, 1986; Pontecorvo, 1985).

Molto alta appare la percentuale di soggetti che non completano l'intero ciclo vaccinale a causa di uno dei motivi elencati precedentemente: la maggior parte delle interruzioni avviene dopo la prima dose (Tab. 4). La differenza notevole tra cicli interrotti da pazienti rivoltisi in prima istanza ai Pronti Soccorsi piuttosto che al Servizio Antirabbico ($p < 0.001$) (Tab. 5), potrebbe essere giustificata da un ricorso prioritario al Pronto Soccorso in caso di ferite di maggior gravità; tuttavia non si può escludere una maggior «larghezza» nel prescrivere la prima dose presso i Pronti Soccorsi cittadini e dell'hinterland. Nessuna differenza particolare si è invece notata nel completamento dei cicli nel corso dei diversi mesi dell'anno (Fig. 3).

In base all'elaborazione dei dati, il numero totale di dosi di vaccino HDCV somministrato nel 1986, includendo anche i Pronti Soccorsi cittadini, è risultato essere di 5340, per una spesa complessiva — ovviamente di solo vaccino — stimata attorno ai 280 milioni ai correnti prezzi di mercato.

TABELLA 4 - Profilassi specifica.

Trattamento	N.	%
Nessun trattamento (A)	2698	56,0
Totale trattati (B)	2122	44,0
b1) Trattamenti incompleti (≤ 4 dosi)	1435	67,6
di cui interrotti dopo:		
1 dose	1187	55,9
2 dosi	90	4,2
3 dosi	67	3,2
4 dosi	91	4,3
b2) Trattamenti completi (5-6 dosi)	687	32,4
di cui con:		
5 dosi	685 *	32,3
6 dosi	2	0,1
Totale pazienti (A + B)	4820	100%

* Due di questi pazienti hanno inoltre ricevuto trattamento con Immunoglobuline specifiche (RIg).

TABELLA 5 - Trattamenti conclusi o interrotti.

Trattamento	Trattati solo al C.A. (Gruppo A)		Rivolti in prima istanza al P.S. (Gruppo B)		Totale	
	N.	%	N.	%	N.	%
1 Dose	542	45,3	645	69,7	1187	55,9
2 Dosi	62	5,2	28	3,0	90	4,2
3 Dosi	43	3,6	24	2,6	67	3,2
4 Dosi	60	5,0	31	3,3	91	4,3
5 Dosi	487	40,7	198	21,4	685	32,3
6 Dosi	2	0,2	0	0,0	2	0,1
Totale	1196	100,0	926	100,0	2122	100,0

Totale interruzioni Gruppo A: 707/1196 = 59,1%
Totale interruzioni Gruppo B: 728/926 = 78,6%

Confronto tra le 2 proporzioni: $t = 9,52$ ($p < 0.001$)

Differenza tra le 2 proporzioni: 19,5%
Limiti di confidenza (95%) = 15,6%-23,4%

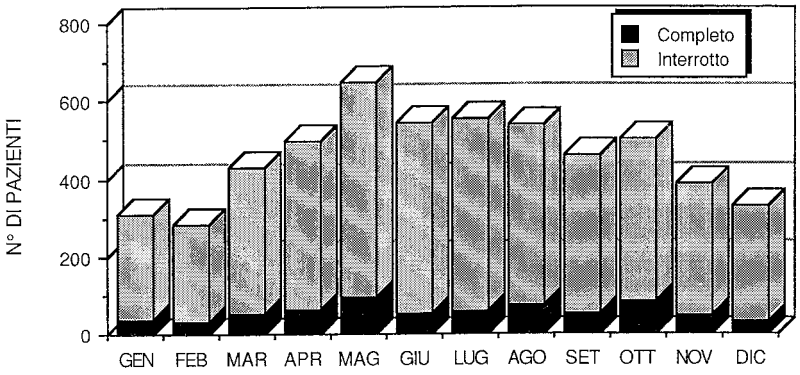


Fig. 3. Trattamento nei vari mesi dell'anno.

Le più recenti raccomandazioni statunitensi (ACIP, 1980; 1984) hanno dato largo spazio alla considerazione del tipo di animale e del territorio in cui il soggetto è stato morsicato; si è ristretta, di conseguenza, l'applicabilità della profilassi alle sole zone endemiche, ma si è giudicato opportuno associare sempre al vaccino le RIG; ciò in quanto la somministrazione del solo vaccino non garantirebbe in tutti i casi la prevenzione della malattia qualora l'animale morsicatore fosse realmente rabido.

La Circolare del 1982, emanata dal nostro Ministero della Sanità, è piuttosto conservativa in quanto finisce con l'indirizzare verso la profilassi immunitaria attiva un largo numero di morsicati; se l'animale non è reperibile si raccomanda l'inizio del ciclo vaccinale anche se si tratta di animale domestico. Non è però sufficientemente garantista, secondo noi, quando prevede, per morsicature sospette, la sola vaccinazione. Infatti, in caso di esposizione ad animale rabbioso, non è certo che la sola somministrazione di cinque dosi vaccinali sia sempre sufficiente ad impedire lo sviluppo della malattia conclamata. L'ACIP statunitense (1980; 1984) raccomanda, al riguardo, di contenere la profilassi ma, quando resa necessaria dalle circostanze, di effettuarla associando sempre vaccino e RIg.

In base alle conoscenze epidemiologiche italiane attualmente in possesso, sembrerebbero ormai esistere i presupposti per una revisione delle indicazioni ministeriali, cominciando con l'abbandonare il ricorso alla profilassi immunitaria per i morsicati da roditori (criceti, ratti, topi e conigli), in quanto la letteratura mondiale è ormai unanimemente concorde nel ritenere questi animali non coinvolti nella trasmissione della malattia (ACIP, 1980; Corey. 1986). La proposta è illustrata nella Tabella 6.

Per quanto riguarda le zone endemiche (in cui sono stati accertati casi di rabbia animale negli ultimi dieci anni), l'indicazione della profilassi immunitaria attiva e passiva dovrebbe essere assoluta in caso di morsicatura da animali selvatici (volpi, moffette, ecc.) e randagi. Nel caso di animali domestici reperibili, si somministri trattamento vaccinale e sierologico se la ferita è particolarmente estesa o ha interessato capo, collo, areole mammarie, genita-

TABELLA 6 - Proposta di modifica della Circolare Ministeriale n. 60/1982.

Regione non endemica (indenne da casi di rabbia animale da almeno 10 anni)		
Animale selvatico (volpi ecc.) * o che abbia avuto possibilità concreta di contatti con animali rabbiosi	A	RIg + Vaccino
	B	RIg + Vaccino
Animale domestico * non reperibile	A	Nessuno
	B	Nessuno
Animale domestico * apparentemente sano e reperibile	A	Nessuno
	B	Nessuno
Regione endemica (segnalazione di casi di rabbia animale negli ultimi 10 anni)		
Animale selvatico (volpi ecc.) * o non reperibile	A	RIg + Vaccino
	B	RIg + Vaccino
Animale domestico * apparentemente sano e reperibile	A	Nessuno [1]
	B	RIg + Vaccino [2]

A = Ferite non gravi in altre zone (incluse lambiture, graffi e contatti con saliva).
B = Ferite alla testa, areola mammaria, genitali, bordo ungueale o particolarmente gravi od estese.

[1] = Iniziare la vaccinazione solo se l'animale manifesta la rabbia nel corso del periodo di osservazione di 10 giorni.
[2] = Sospendere la vaccinazione nel caso l'animale sia ritrovato sano dopo 10 giorni.

* Non sono considerati a rischio per la trasmissione della rabbia i roditori.

li esterni o bordo ungueale con la riserva di interrompere il ciclo vaccinale qualora l'animale non manifesti segni di malattia entro i 10 giorni di osservazione. Se la ferita ha interessato altre zone si inizi la vaccinazione solo se l'animale manifesta segni o sintemi di rabbia nel periodo di osservazione di 10 giorni.

Nel caso di zone non endemiche (indenni da casi di rabbia animale da almeno 10 anni e quindi non raggiunte dalla epizoozia, come è il caso del Lazio), l'azione, volta ad impedire lo sviluppo della rabbia umana, deve coinvolgere anche le strutture veterinarie deputate all'attento monitoraggio della fauna selvatica (Postizzi, 1983). Visto il basso numero di morsicati da animali selvatici si potrebbero comunque trattare queste persone con profilassi immunitaria attiva e passiva in attesa della conclusione dell'osservazione o dell'esito della prova biologica (qualora l'animale sia disponibile). Riteniamo invece che sia superfluo applicare la vaccinazione ai morsicati da cani e gatti, soprattutto nelle grandi città, dove la possibilità di esposizione a volpi infette, ritenute le maggiori responsabili dell'espansione della epizoozia, o ad animali domestici da queste infettati, è praticamente trascurabile. Si valuti singolarmente il caso, non disdegnando l'uso della profilassi là dove circostanze particolari (morsicature avvenute in aree «sospette», animale con sintomi encefalici) rendano concreta l'eventualità della malattia.

In tutti i casi di morsicatura particolare attenzione deve essere rivolta al trattamento locale della ferita (lavaggio e disinfezione) (Geloca *et al.*, 1983; Crey, 1986; Panà, 1985), fondamentale strumento profilattico di cui disponiamo non solo per la rabbia ma anche per altri rischi infettivi contestuali come il tetano. In particolare si eviti, per quanto possibile, di suturare le ferite da animale, atto che favorirebbe la moltiplicazione locale del virus.

Lo schema proposto tende a trascurare il motivo della morsicatura (dato di scarsa attendibilità sulla base delle notizie riferite in merito dalle vittime, come dimostrato dai dati presentati), dando invece maggior risalto ad elementi di giudizio da parte del medico, come la valutazione del rischio legato alla zona ed all'animale. Adottando una simile procedura non può essere escluso un minimo di rischio; tuttavia l'esperienza statunitense, condotta sulla base di questi principi, ha dato risultati confortanti, essendosi addirittura progressivamente ridotta nel corso degli anni l'incidenza di rabbia umana, colà presente. Inoltre, non si dimentichi che in ogni campagna vaccinale deve essere compiuta a priori un'analisi costo-beneficio: in particolare, oltre al problema economico, non si trascurino gli effetti collaterali del vaccino, quasi tutti locali e di lieve entità (Mastroeni *et al.*, 1986; Pontecorvo *et al.*, 1983) (anche se frequenti) nel caso dell'HDCV (Rasilvax®) e non ancora valutati per il vaccino avianizzato (LYSSAVAC-N®) che stiamo impiegando dallo scorso mese di giugno per la temporanea disponibilità dell'HDCV.

Riassunto. La revisione della casistica clinica del Servizio Antirabico di Roma riferita all'anno 1986 ha evidenziato un elevato ricorso a questo servizio (9100 prestazioni, di cui 4820 prime prestazioni, nel corso dell'anno) ed un intenso impiego della profilassi immunitaria attiva con vaccino HDCV (44% dei soggetti presi in carico ha ricevuto almeno una dose). L'analisi dei dati ottenuti ed il confronto con schemi vaccinali adottati in altri Paesi suggeriscono l'opportunità di una riconsiderazione delle direttive ministeriali vigenti con l'obiettivo di un loro aggiornamento, eliminando innanzitutto il ricorso alla profilassi immunitaria per i morsicati da roditore, e distinguendo l'intervento preventivo a seconda che si tratti di zone endemiche o zone non endemiche; nelle prime la vaccinazione dei morsicati da animali selvatici o randagi andrà sempre accompagnata dalla sieroprofilassi; nelle seconde sarà da ritenere superfluo il trattamento vaccinale nei morsicati da animali domestici, anche se non reperibili.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

A.C.I.P. (Advisory Committee Immunization Practices) (1980). Rabies prevention. *MMWR 29*: 265-79.

A.C.I.P. (Advisory Committee Immunization Practices) (1984). Rabies prevention, United States, 1984. *MMWR 33*: 393-408.

Chin J., Constantine D. G. (1986). Rabies. In: *Maxcy-Rosenau: Public Health and Preventive Medicine*. (John M. Last, ed.) XII edizione, 391-397 pp.

Corey L. (1986). Rabies and other rhabdoviruses. In: *Harrisons's: Principles of Internal Medicine*, XI edizione, 712-715 pp.

Gelosa L., Borroni G. (1983). Esperienze e contributi operativi del Centro Antirabbico di Milano. *Atti Conferenza regionale «Iniziative per la profilassi della rabbia in Lombardia»*, Sondrio, 53-57 pp.

Marazzi M. C., Mancinelli S., Palombi L., Signorelli C., Marini G. P., Vescia N., Panà A., D'Arca S. U., Fara G. M. (1988). Epidemiologia della morsicature da animale, a Roma, nel 1986. *Igiene Moderna 89* (in stampa).

Mastroeni I., Vescia N., De Carolis A., D'Arca S. U., Tarsitani G. (1986). Rilievo della incidenza delle complicanze da vaccini DEV e HDCV. *Boll. Ist. Sieroter. Mil. 65*: 494-501.

MERLI S. (1983). Le operazioni di profilassi della rabbia silvestre in provincia di Sondrio. *Atti Conferenza regionale «Iniziative per la profilassi della rabbia in Lombardia»*, Sondrio, 30-34 pp.

MINISTERO DELLA SANITÀ (Direzione generale dei Servizi di Igiene pubblica) (1982). Guida per l'applicazione del trattamento antirabbico profilattico post-contagio. *Circolare n. 60 del 5.10.1982.*

O.M.S. (1973). Trattamento generale specifico raccomandato dal Comitato di esperti della rabbia dell'O.M.S.. *6° Rapporto.*

PANÀ A. (1985). Rabbia. *Enciclopedia Medica Italiana 12*: 2182-2203.

PONTECORVO M. (1985). *Sieri, vaccini, immunoglobuline.* Ediz. Minerva Medica. 5ª edizione.

PORRO DE' SOMENZI C. (1983). Profilassi della rabbia in Lombardia. *Atti Conferenza regionale «Iniziative per la profilassi della rabbia in Lombardia»*, Sondrio, 19-22 pp.

POSTIZZI S. (1983). Organizzazione della profilassi della rabbia silvestre in Svizzera (vaccinazione orale delle volpi). *Atti Conferenza regionale «Iniziative per la profilassi della rabbia in Lombardia»*, Sondrio, 45-47 pp.

SIGNORELLI C., MANCINELLI S., MARAZZI M. C., PALOMBI L., FARA G. M. (1987). Profilassi antirabbica: l'esperienza del Servizio antirabbico di Roma. *Boll. Ist. Sieroter. Milan. 66*: 357-66.

Parassitologia 30: 81-85, 1988

WUTKRANKHEIT IN ÖSTERREICH 1966-1986

E. SCHARFEN

Stefan Milowgasse 5/7, A- 2340 Mödling, Österreich.

Abstract. The epidemiology of rabies in Central Europe with particular reference to Austria is described. Fox represents the vector of the infection while other animals are involved in the epidemiological picture only incidentally. Oral immunization of foxes has been successfully achieved.

Key words: rabies, foxes, oral vaccination, Austria.

1966 griff Rabies aus Bayern auf den Westen Österreichs über und trat 1967/68 in allen nördlich des Flusses Inn gelegenen Bezirken Tirols und Vorarlbergs auf. In den folgenden Jahren kam es dann zu einer wechselnd starken Ausbreitung, wobei 1973 der Inn überquert wurde, und zu weiteren Einschleppungen sowohl aus der Bundesrepublik Deutschland als auch aus der Schweiz in die übrigen Bezirke beider Bundesländer (Abb. 1 a).

1974 trat Rabies erstmalig in Salzburg auf, verbreitete sich explosionsartig im Bundesland und bewegte sich mit einer Jahresgeschwindigkeit von 24-50 km hauptsächlich in den Richtungen zwischen Nordost und Südost entsprechend dem Verlauf unserer längsten Gebirgsketten. 1976 wurden Oberösterreich, Osttirol (Bezirk Lienz) und Kärnten erfaßt. Von Salzburg ausgehend wurde über den Gebirgszug der Hohen Tauern in 2600m Höbe Italiens Provinz Bozen invadiert. 1977 war Wutkrankheit in ganz Oberösterreich und Steiermark verbreitet (Abb. 1 b), 1979 wurde von Kärnten aus die Republik Slowenien in Yougoslawien erfaßt. 1980 waren Salzburg, 1982 Oberösterreich wieder frei von Rabies (Abb. 1 c). Die ostwärts wandernde Seuchenwelle fand 1983 im südlich der Donau liegenden Teil Niederösterreichs ihre weiteste Ausdehnung, zeigte im folgenden Jahre bereits Auflösungserscheinungen und erlosch 1985 in diesem Gebiet (Abb. 1 c).

Von der Oststeiermark ausgehend erfolgte 1981 nach Westen eine Ausbreitung das Murtal entlang. Dieser Seuchenzug erreichte 1983 Salzburg zugleich mit einem aus Kärnten nordwärts über die Hohen Tauern erfolgten Vorstoß. 1985/86 hatte Rabies das ganze Bundesland und mit westlichen Ausläufern den Bezirk Kitzbühel in Tirol erfaßt und bewegte sich neuerlich in den Richtungen zwischen Nordost und Südost nach Oberösterreich, Steiermark und Kärnten weiter.

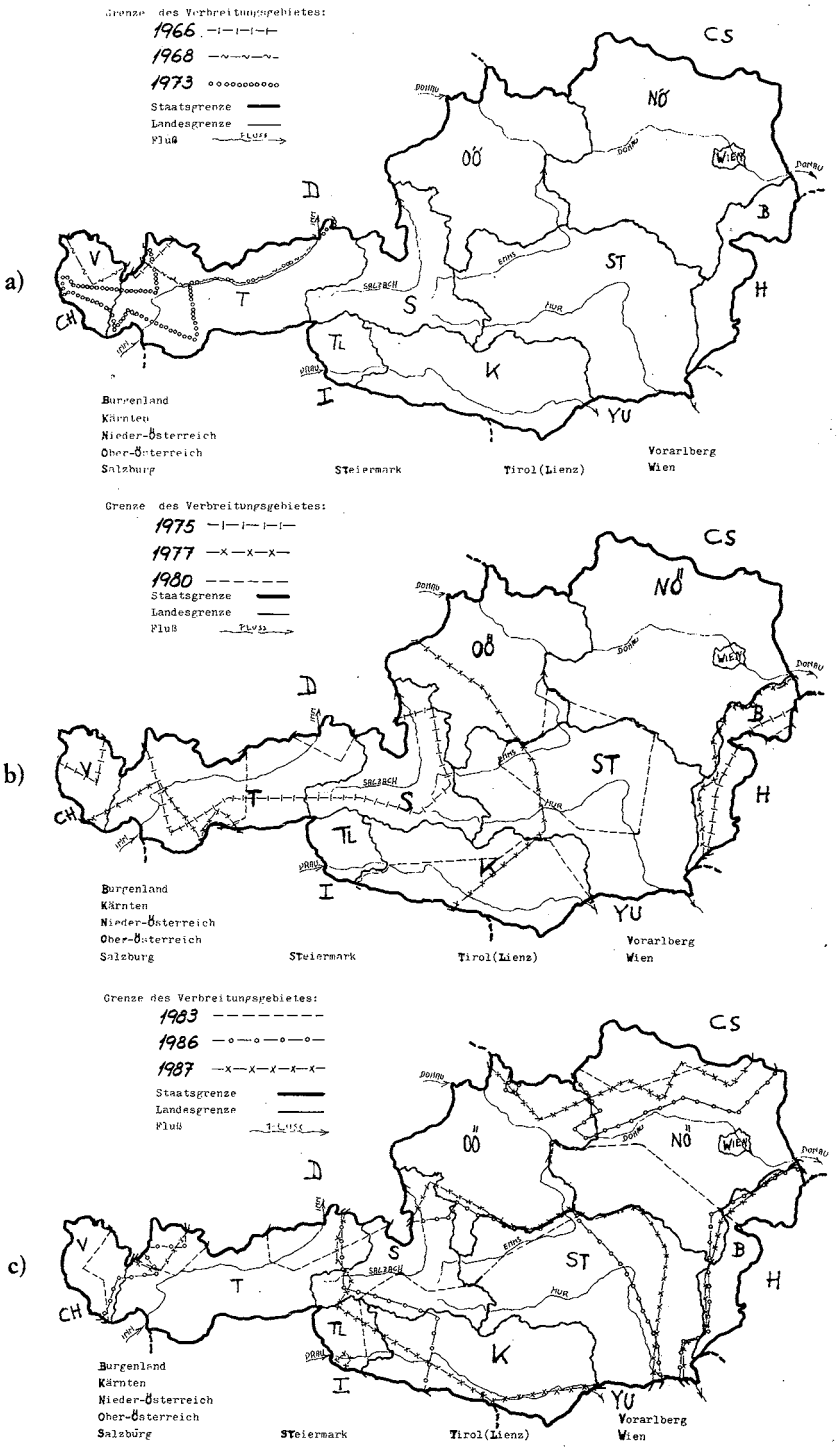


Abb. 1. Wutkrankheit in Österreich seit 1966 bis 1987.

1975 griff im Osten des Bundesgebietes Wutkrankheit aus dem ungarischen Grenzbereich auf das Burgenland über und verbreitete sich bis 1977 in allen Bezirken des Landes. Seuchenfreie Perioden wechselten hier mit Reinfektionen ab. Eine westwärts gerichtete Ausbreitung war bisher nicht erkennbar (Abb. 1 b, c).

1982/83 wurden nördlich der Donau in Niederösterreich das Waldviertel und Weinviertel von der Tschechoslowakei her invadiert. Dieser Seuchenzug erfaßte bis 1986 das ganze nördliche Niederösterreich und Teile des oberösterreichischen Mühlviertels ohne jedoh nach Süden die Donau zu überqueren (Abb. 1 c).

1986 herrschte Rabies in Vorarlberg und den Tiroler Bezirken Reutte (enzootisch) und Kitzbühel, in Salzburg und enzootisch in den Ländern Kärnten und Steiermark (ausgenommen dessen östliche Bezirke), nördlich der Donau in allen Bezirken Niederösterreichs und vereinzelt Oberösterreichs sowie im Osten im ganzen Burgenland. Von 9 Bundesländern war nur 1 Land, die Bundeshauptstadt Wien, frei von Wutkrankheit.

Unter den in Österreich seit 1966 diagnostizierten Rabiesfällen * sind bis 1987 Wildtiere mit 94,44% beteiligt. Es handelt sich somit wie in anderen mitteleuropäischen Ländern um die silvatische Form der Wutkrankheit. Der Fuchs mit 79,76% Anteil ist allein Träger des Infektionsgeschehens. Erkrankungen bei Rehen, Dachsen sowie Musteliden und anderen Wildtieren sind als epidemiologisch unbedeutend anzusehen, obwohl es zu kurzen Infektionsketten innerhalb einer Spezies kommen kann. Unter 5,56% erkrankten Haustieren waren 2,41% Rinder und 1,76% Katzen, 0,68% Schafe, 0,39% Hunde und 0,32% andere Haustiere (Abb. 2).

1966-1987 wurden im zentralen Wutlabor (*) 217.806 Zentralnervensystem Proben fluoreszenzserologisch auf Rabies untersucht. Infiziert erwiesen sich die Gehirne von 1.352 Haustieren und 22.980 Wildtieren, darunter 19.406 Füchsen.

In Abb. 3 ist die Anzahl der jährlich untersuchten Füchse (FU), der wutkranken Füchse (RF) und anderen Wildtiere (RW) sowie der infizierten Haustiere (RH) aufgezeichnet. Deutlich ist erkennbar, daß die Anzahl der Erkrankungen beim Fuchs bestimmend ist für Rabiesfälle bei anderen Tierarten. Bei grafischer Darstellung wird der Ablauf der Epizootie und die stete Zunahme der Seuchenfälle besonders anschaulich. Solange das Seuchengeschehen auf den Westen des Bundesgebietes (1966-1973) begrenzt bleibt, verlaufen die Kurven periodisch schwankend. Mit Ausbreitung der Wutkrankheit nach Osten und Süden in die Bundesländer Salzburg, Oberösterreich, Kärnten und Steiermark (1974-1978) kommt es zum Anstieg aller Zahlenwerte und Kurven, dem entsprechend der Auswirkung des Seuchengeschehens und der Bekämpfungsmaßnahmen 1979-1981 ein jäher Abfall folgt. Eine rasche Regeneration der Fuchspopulation und wahrscheinlich auch wachsendes Desinteresse an den sich jährlich wiederholenden Bekämpfungsmaßnahmen führten neuer-

---

(*) Bundesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, Robert Kochgasse 17, A-2340 Mödling, Österreich.

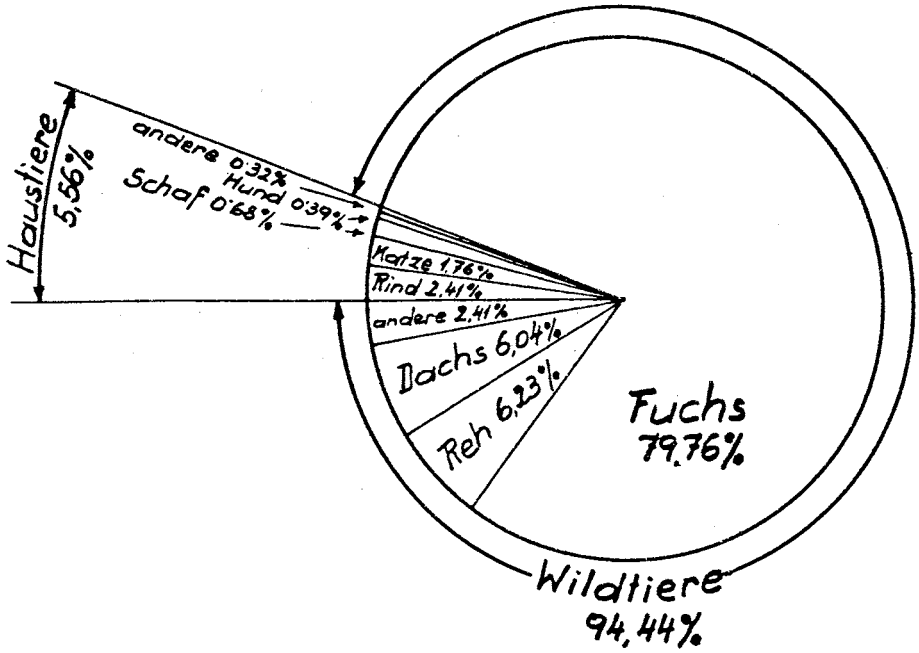


Abb. 2. Anteil von Haus- und Wildtieren am Tollwutgeschehen in Österreich 1966-1987.

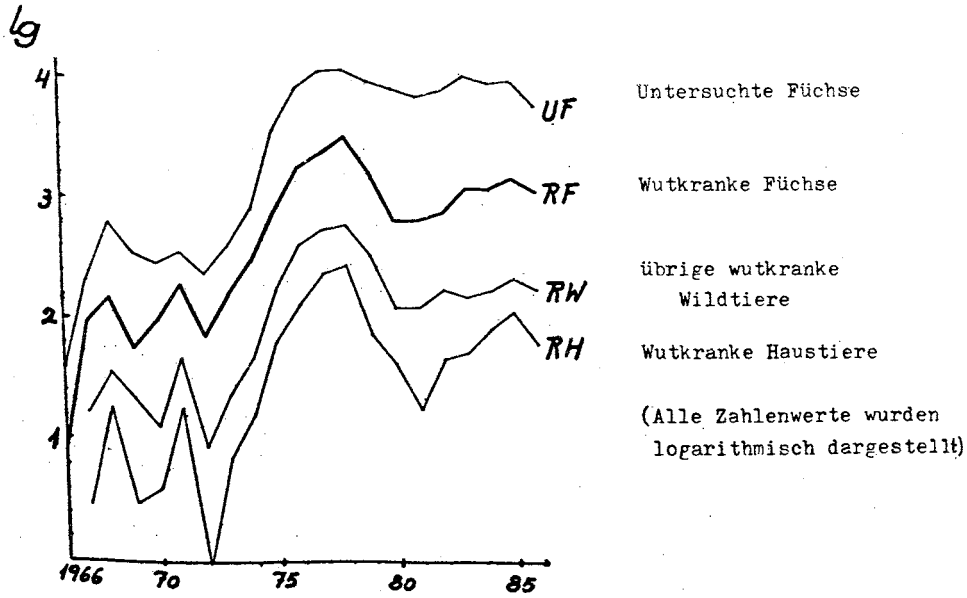


Abb. 3. Tollwutfalle bei Wild- und Haustieren in Österreich 1966-1986.

lich zu einem stetigen Anstieg der Seuchenfälle (1982-1986) mit nur geringen Schwankungen im Kurvenverlauf.

Abb. 3 deckt ferner die Unzulänglichkeit der konventionellen Seuchenbekämpfung (Abschuß, Fang, Gas, Gift) auf, mit welcher es in zwei Dezennien nicht gelang, Rabies einzudämmen oder ganz zu tilgen. Das Österreichische Tierseuchengesetz sieht für Füchse, Dachse und Marder, die in behördlich angeordneten Bekampfungsgebieten getötet werdern, die Gewährung einer Prämie aus dem Staatsschatz vor, welche üblicherweise von den Ländern um den gleichen Betrag verdoppelt wird. In Österreich wurden 1966-1987 für derartige Zahlungen fast 20 Millionen Schilling an öffentlichen Mitteln aufgewendet.

Es war daher nur eine Frage der Zeit, bis eine kostengünstigere und vor allem wirksame und auch mit den Forderungen der Tierschützer vereinbare Möglichkeit der Rabiesbekämpfung gefunden und praktiziert werden konnte. Mit der oralen Immunisierung der Füchse bietet sich ein Mittel der Wahl an, welches konsequent und überregional angewendet, entsprechende Erfolge zu bringen scheint.

1986 wurde erstmalig in Österreich im Land Vorarlberg eine Vakzinationskampagne mit Tübinger Ködern durchgeführt. Bei den anschließenden Kontrollen zeigten 80% der untersuchten Tiere einen positiven Tetracyclinnachweis und bei 77% der Einsendungen konnten Antikörper nachgewiesen werden. Voralberg ist seit Ende 1986 frei von Rabies. Im Herbst 1987 startete das Land Steiermark versuchsweise auf einer Fläche von 2000 Km^2 ebenfalls mit Tübinger Ködern die orale Vakzination, entsprechende Ergebnisse stehen jedoch noch aus. Ebenfalls im Herbst 1987 begann das das Bundesland Tirol im Bezirk Reutte mit der Immunisierung der Füchse. Bis jetzt ist ein merklicher Rückgang der Seuchenfälle zu verzeichnen. Es ist zu hoffen, daß Wutkrankheit nach Durchimmunisierung der enzootischen Seuchenherde in den betroffenen Bundesländern in Österreich im Laufe der nächsten Jahre vollständig getilgt werden kann.

Parassitologia 30: 87-92, 1988

LUTTE CONTRE LA RAGE VULPINE EN BELGIQUE: PREMIERE CAMPAGNE DE VACCINATION DES RENARDS PAR VOIE ORALE

L. HALLET

Inspecteur en Chef-Directeur, Administration de l'Elevage et du Service Vétérinaire, Ministère de l'Agriculture, 1210 Bruxelles, Belgique.

Abstract. The procedures followed in the first antirabies campaign carried out in Belgium with oral vaccination of foxes are described. Although the evaluation of the results is planned after the third campaign, preliminary data show a decrease in the expected number of cases in the vaccine treated zone.

Key words: rabies, fox, oral vaccination, Belgium.

INTRODUCTION

La rage qui a sévi en Belgique sous forme de rage urbaine (rage du chien) jusqu'en 1922 est réapparue en 1966 sous forme de rage sylvatique (rage vulpine).

Depuis l'année 1966, la Belgique a lutté contre la rage par des mesures de prophylaxie hygiénique et médicale basées essentiellement sur la réduction des populations de renards et la vaccination obligatoire des chiens. La destruction des renards par les titulaires de droit de chasse et les gardes des Eaux et Forêts est obligatoire. Une indemnité de 500 Frs. Belges est attribuée pour chaque renard abattu dans la zone contaminée. En outre, le Ministère de l'Agriculture a organisé des campagnes de gazage des terriers de renards.

Depuis leur abandon en 1981, la rage a connu dans notre pays une recrudescence inquiétante (voir Tableaux 1 et 2). Elle s'est installée à l'état enzootique dans la moitié Sud de la Belgique. En 1986, la Belgique a accepté de s'associer à ses voisins: la R.F.A., le Grand Duché de Luxembourg et la France, pour tenter de maîtriser l'épizootie de rage par la vaccination orale des renards.

La première campagne de vaccination a été réalisée les 20-22 et 23 septembre 1986. La zone de vaccination est située le long de la frontière du Grand Duché de Luxembourg sur une profondeur de 15 à 20 km, ce qui représente une superficie de 1.900 km^2). 23.200 doses de vaccin ont été distribuées (soit 10 à 15 appâts vaccinaux par km ^{2}).

Les appâts vaccinaux utilisés sont ceux fabriqués par le laboratoire fédé-

ral de Tübingen en R.F.A. (Prof. Dr. L. G. Schneider); ils contiennent la souche atténuée SAD B19 du virus rabique. La capsule contenant le liquide vaccinal est enrobée d'un mélange de farine de poisson et de graisse. En mâchant l'appât, le renard perfore la capsule et l'immunisation est obtenue après contact du liquide vaccinal avec la muqueuse buccale; 150 mg de tétracycline est incorporée au mélange graisseux et sert de marqueur: l'ingestion des appâts pourra donc être contrôlée par la détection de cette substance dans les os des cadavres analysés.

Environ 200 personnes ont collaboré à la distribution des appâts sur le terrain (chasseurs, agents des Eaux et Forêts, membres du FORERA). Les vaccins conservés en congélateur à —20°C ont été rémis dans des boîtes isothermes en polystirène à chaque distributeur. La population locale, et surtout les chasseurs, ont été invités à empêcher les chiens de se promener librement dans la zone de vaccination, afin d'atténuer la concurrence en ce qui concerne l'ingestion des appâts. La campagne d'information des autorités compétentes, de la population locale et des différents milieux concernés par la rage a débuté trois mois avant la campagne de vaccination proprement dite.

Contrôles

La stabilité du vaccin

L'influence de la température locale extérieure sur la persistance de la validité du vaccin a été contrôlée. Quatre appâts ont été déposés le même jour que les autres dans des cages brillagées et dans des endroits ombragés. Aux jours 0, 4, 8 et 14, un échantillon a été prélevé et la stabilité du titre viral a été contrôlée par l'Institut National de Recherches Vétérinaires.
Resultats. Après un séjour de 14 jours sur le terrain, la vaccin avait conservé toute son activité. Les conditions climatiques locales rencontrées (température assez élevée) n'ont pas diminué le titre du virus vaccinal.

Prise d'appâts

Le contrôle de la consommation d'appâts par les animaux a été réalisé dans quatre zones différentes; celles-ci couvraient environ 300 ha sur lesquels avaient été déposés 185 appâts vaccinaux. Ceux-ci ont été contrôlés aux jours 4, 8 et 14. Les 555 données ont été réparties en cinq classes correspondant chacune à une situation rencontrée sur le terrain.

Classe A: Disparition de l'appât:
— consommation probable de la partie attractive;
— absence de données concernant l'ingestion du liquide vaccinal.
Classe B: Présence de la capsule vaccinale vide et perforée:
— consommation de la partie attractive;
— ingestion du liquide vaccinal.
Classe C: Présence de la capsule vaccinale intacte:

— consommation de la partie attractive;
— non ingestion du liquide vaccinal.
Classe D: présence de l'appât entier.
Classe E: altération physique de l'appât.

Résultats. Les pourcentages pour chaque classe des prises d'appâts au jour 14 ont été les suivants: classe A: 43,7; classe B: 20,9; classe C: 15,7; classe D: 17,3; classe E: 2,4.

Ces résultats confirment l'efficacité du pouvoir attractif (odeur et saveur) de ce type d'appât. En effet, après 14 jours, la partie attractive de 80% des appâts distribués a été consommée. Toutefois, ces relevés ne nous renseignent pas sur: 1) l'identification de l'espèce animale consommatrice; 2) l'ingestion réelle du liquide vaccinal: dans 43,7% des cas (classe A), il est impossible de prouver l'ingestion du liquide vaccinal.

Le nombre de capsules retrouvées intactes (classe C: 15,7%) montre que la capsule peut être isolée de la partie attractive. Ce phénomène d'isolement de la capsule résulte vraisemblablement du fait qu'un renard consomme souvent plusieurs appâts distribués sur son territoire. Après une première expérience, le renard consommerait plus «délicatement» un appât ultérieur, de sorte qu'il parviendrait à rejeter la capsule intacte.

Au sein d'une même zone de contrôle, il a été constaté que le taux de prise d'appâts diffère d'un endroit à un autre, ce qui est vraisemblablemnt lié à densités de population différentes ou peut-être des comportements alimentaires variables.

Contrôle sur cadavres

Durant les cinq mois qui ont suivi la distribution des appâts vaccinaux, les cadavres de renards récoltés dans la zone traitée ont été examinés pour: 1) la recherche de la tétracycline dans les os; 2) le diagnostic de la rage; 3) les examens sérologiques. Soixante huit cadavres (68) provenant de 17 communes ont été récoltés.

1) *La détection de la tétracycline*. Les dépôts de cette substance dans les os ont été mis en évidence en observant des coupes au microscope à lumière ultraviolette. La tétracycline a été détectée chez 32 renards sur le total de 68-soit 47%. Parmi les 32 renards tétracycline positifs, 7 ont été reconnus enragés. Ils étaient probablement en phase d'incubation de la maladie lors de l'ingestion de l'appât ou bien ils ont absorbé la farine de poisson et rejeté la capsule vaccinale sans la perforer. Dans cette hypothèse, l'immunité ne pouvait pas se développer.
2) *Le diagnostic de la rage*. Celui-ci a été réalisé par la technique d'immunofluorescence directe sur la corne d'Ammon de l'encéphale. L'identification de la souche de virus rabique responsable de la maladie a été effectuée par un test d'immunofluorescence indirecte utilisant deux anticorps monoclonaux obtenus auprès du laboratoire Fédéral de Tübingen. La rage a

été diagnostiquée chez 16 renards, soit 23,5%. Grâce aux anticorps monoclonaux, il a été prouvé que pour les 16 cas, il s'agissait du virus sauvage et non de la souche vaccinale.

3) *Les recherchers sérologiques*. Un prélèvement de sang a pu être réalisé dans la cavité thoracique de 49 cadavres de renards (11 enragés et 38 sains). La détection des anticorps antirabiques a été réalisée au laboratoire Fédéral de Tübingen en R.F.A. Une séroconversion positive a été observée chez 9/11 animaux enragés (82%) et chez 37/38 animaux sains (97%). La majorité des renards sains qui ont été récoltés avait élaboré des anticorps antirabiques. Malheureusement, l'échantillonnage est insuffisant pour conclure en établissant un % de population vulpine immunisée.

Si l'on compare les % de renards séro-positifs et les % de renards tétracycline positifs, on constate qu'il y a discordance et curieusement en faveur

TABLEAU 1 - Royaume de Belgique: expérience de vaccination antirabique orale des renards. Cas confirmés dans la zone de vaccination (2.166 km²) avant l'expérience.

Année		Renards dans la zone		Renards dans la zone		%		Total des cas dans la zone		Total des cas dans le pays		%	
1966		4		36		11		4		41		10	
1967		131		231		57		188		324		58	
1968		77		293		26		124		453		27	
1969		18		106		17		33		165		20	
1970		5		14		35		8		20		40	
1971		0		2		0		0		6		0	
1972		0		7		0		0		7		0	
1973		0		0		—		0		0		—	
1974		63		84		75		82		108		76	
1975		32		151		21		43		194		22	
1976		36		281		13		74		465		16	
1977		15		30		50		27		69		39	
1978		22		42		52		33		61		54	
1979		16		18		89		23		26		88	
1980		32		35		91		34		47		72	
1981		28		120		23		43		173		25	
1982		132		355		37		276		675		41	
1983		39		295		13		87		516		17	
1984		32		281		11		70		505		14	
1985		71		212		33		149		448		33	
1986	1	32	69	74	178	43	39	54	122	116	342	47	36
	2	10		27		37		21		62		34	
	3	9		33		27		15		80		19	
	4	18		44		41		32		84		38	
1987	1	3	5	33	54	9	9	9	13	53	99	17	13
	2	2		21		9		4		46		9	
	3												
	4												

des séro-positifs. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, lors de la fabrication industrielle des appâts, le mélange de la tétracycline à la pâte appétente n'a pas été réalisée d'une façon parfaitement homogène. La concentration en tétracycline a pu varier d'un lot d'appâts vaccinaux à l'autre. D'autre part, la concentration en tétracycline dans le squellette de l'animal varierait d'un os à l'autre. Ainsi, en examinant une seule coupe, certains animaux positifs peuvent échapper au contrôle.

Contrôle d'innocuité chez les micromammifères (rongeurs et insectivores)

Dans trois zones de 3 km^2 chacune, durant le mois qui a suivi la vaccination, 228 micromammifères ont été capturés. En outre, 10 hérissons ont été récoltés sur les routes de la zone de vaccination. La tétracycline a été recherchés dans des coupes osseuses de ces animaux et un broyat d'encéphale de chaque micromammifère a été injecté par voie intra-cérébrale à 5 souris de 3 à 4 semaines (mise en évidence du virus vaccinal).
Résultats. 11% des animaux examinés étaient positifs à la recherche de la tétracycline. Sur aucun des micromammifères analysés, le virus (ni vaccinal ni sauvage) n'a été isolé.

Ces résultats confirment les garanties d'innocuité de la souche SAD B19. D'autre part, il doit être tenu compte que les micromammifères jouent un rôle en tant que compétiteurs pour la consommation des appâts vaccinaux et plus particulièrement pour la partie attractive. Le plus souvent, seule celle-ci est entamée et la capsule contenant le vaccin reste intacte.

Evolution de la rage en Belgique

Il est beaucoup trop tôt, suite à cette première expérience (Figure 1 et Tableau 1), de tirer des conclusions. La vaccination orale des renards devra se poursuivre et la situation épidémiologique suivie de très près. Une seconde campagne de vaccination a eu lieu les 13 et 14 juin 1987. Une troisième campagne sera organisée fin septembre - début octobre 1987. Elle sera étendue à toutes les frontières de notre pays qui bordent le Grand Duché de Luxembourg et la République Fédérale d'Allemagne.

L'évolution de l'incidence de la rage en Belgique, suite à l'expérience de vaccination du renard, sera analysée au printemps 1988. En effet, trois campagnes de vaccination semblent nécessaires pour faire une analyse épidémiologique et tirer les premières conclusions de cette expérience.

Toutefois, à l'examen de chiffres des Tableaux 1 et 2, les dernières informations semblent montrer qu'il y a une diminution du nombre de cas de rage dans la zone de vaccination par rapport au nombre de cas déclarés dans le reste du pays.

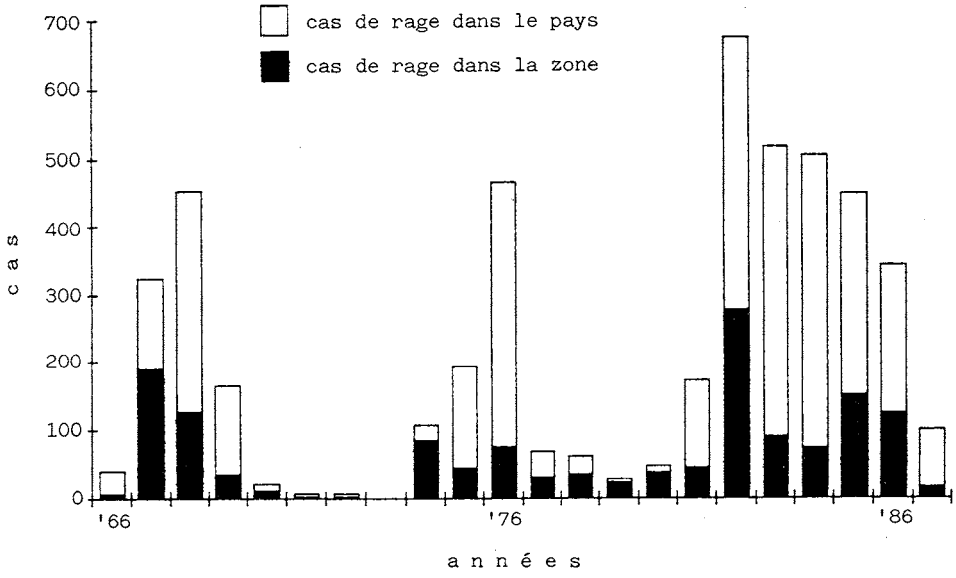


Fig. 1. Royaume de Belgique: évolution de la rage depuis 1966. Cas dans la zone de vaccination. Année 1987: premiers six mois.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Dr. P. P. Pastoret, Professeur de Virologie à la Faculté de Médecine Vétérinaire et son collaborateur, le Dr. Bernard Brochier qui ont mis en place l'infrastructure nécessaire, réalisé les campagnes de vaccination et les contrôles, tant sur le terrain qu'au laboratoire, avec la collaboration de l'Institut Pasteur du Brabant, les Services Vétérinaires et les agents des Eaux et Forêts.

REFERENCES

Brochier B., Iokem A., Ginter A., Lejeune E., Costy F., Marchal A., Preharpre D., Couvreur J. M., Dufey J., Kalpers J., Leonard M., Baudoin B., Desmecht M., Schneider L. G., Pastoret P. P. (1987). Première campagne de vaccination antirabique du Renard par voie orale menée en Belgique. Contrôles d'efficacité d'innocuité chez le renard roux (*Vulpes vulpes*, L.). *Ann. méd. vét. 131*: 463-472.

Parassitologia 30: 93-95, 1988

EPIDEMIOLOGY AND DIAGNOSIS OF RABIES IN GREECE

A. Seimenis, O. Manganà, V. Nomicoù

Veterinary Institute of Infectious and Parasitic Diseases, Ministry of Agriculture, Athens, Greece.

Abstract. During the decade 1951-1960, 8626 rabies' cases were reported among domestic animals in Greece and 53 deaths in humans. During the decades 1961-1970, 1971-1980 cases were reduced to 3009 and 242, respectively, while no more cases in man occurred since 1970. Vaccination campaigns of dogs, besides the low prevalence of rabies among wild animals, resulted in its eradication from the country. Immunofluorescence is the method used for diagnosis.

Key words: rabies, epidemiology, diagnosis, control, Greece.

Epidemiology

The epidemiological situation concerning rabies in Greece could be considered, during the last decade, quite satisfactory. This status was different in the past. Actually, considering the decade 1951-1960 the rabies' cases verified among domestic animals, but mainly among dogs, reached 8226 and 53 death in humans (Dragonas and Stoforos, 1966). During the decade 1961-1970, the epidemiological situation was clearly changing as cases among domestic animals were reduced to 3009 while two deaths in humans were verified only. Since 1970 no more cases in man were reported.

The data of the third decade 1971-1980 indicate that rabies prevalence was directed towards low levels as only 242 cases among domestic animals were identified (Mastroyanni and Manganà, 1982).

The last period since 1980 is characterised by rabies-free years, namely 1980, 1984 and 1986, while during the year 1981 three cases among dogs only were reported and one in each one of the years 1982, 1983, 1985 and 1987 (Manganà *et al.*, 1985). These data are reported in Table 1.

Rabies among wild animals, during the period considered, remained unexpectedly in very low levels as no more than 10 cases among foxes were identified; the last one in 1974. These official numbers among these animals may not correspond to the reality as the material forwarded to the laboratories for diagnosis was not sufficient and representative.

Since 1966, the hunting of foxes, in the frame of the ecological balance, is encouraged by offering bounties. Over one thousand of heads tested up

TABLE 1 - Rabies among domestic animals and human deaths in Greece.

Years	Rabies cases	Deaths in humans
1951-1960	8626	53
1961-1970	3009	2
1971-1980	242	—
1981-1987	7	—

to these days resulted negative for rabies. Besides foxes, other species examined were badjers, deers, weasels, ferrets, hedgehogs, wolves, monkeys, castors and bats.

During the first two periods considered, the disease was scattered in almost the whole mainland of the country. Since 1979 the cases are limited to the northeastern areas close to the Turkish borders with the exception of the single case verified in 1985 in the region of Attika. A few cases were identified in some islands in the past, but for the last 23 years all the Greek islands remain free of rabies.

The satisfactory epidemiological position of Greece in rabies could be attributed to the following factors which influence each other.

Large scale vaccination of dogs

Campaigns for compulsory vaccination were undertaken by the veterinary authorities in the whole country starting in 1952 with a culminant point in 1958 when more than 144.000 dogs were vaccinated (Table 2).

Modified live virus vaccine Flury-LEP strain, locally produced and imported, was used in dogs. When needed, large animals were vaccinated by locally produced fermi type vaccine. For the last ten years both live and inactivated vaccines are used in dogs. Large animals are not immunised any more.

As rabies cases were reduced to zero for a number of years in the greatest part of the country, compulsory vaccinations were gradually suspended. They are still performed every year along the borders with Albania, Yugoslavia and Turkey and from these borders up to 30 km back inland. Voluntary

TABLE 2 - Dogs vaccinated against rabies in Greece.

Years	Dogs vaccinated
1951-1960	484,285
1961-1970	361,654
1971-1980	315,256
1981-1986	318,520

vaccination is always encouraged either by the authorities or by the animal protection societies.

Very low prevalence of rabies among wild animals

As mentioned before, rabies among wild animals remained, apparently, in very low levels. This fact offered the possibility of the formation, without particular difficulties, of a dog population in its large part protected through regular vaccinations. This proved to be very important in areas where foxes and other sensitive wild animals are living.

Public education

Besides the 53 human deaths occurred during the first decade considered, 98.521 persons were submitted to antirabic treatment and several other thousands during the next years. This situation alarmed highly the population who corresponded to the authorities' efforts for the implementation of preventive measures and for the enlightment of the public through different manners.

Although Greece can be considered a rabies-free country, it is permanently exposed to the danger of imported disease. Wild-life rabies concerns seriously the authorities involved. The epidemiological situation of the neighbouring countries is followed by particular attention; preventive measures will continue to be implemented and collaboration at international level, when needed, will be always pursued.

Laboratory diagnosis

Rabies diagnosis in Greece is performed in two veterinary laboratories authorized by the Ministry of Agriculture: one in Athens and the other in Thessaloniki. The tests used are the immunofluorescence, performed upon smears from the Ammon's horn and the medulla oblungata, and the inoculation of material to mice. In the cases that the history could guide to particular suspicions, smears from the thalamus are added. In exceptional cases the cornea is used also.

REFERENCES

Dragonas P., Stoforos E. (1966). Study on the epizootiology of rabies in Greece during the years 1951-1965. *Bull. Hell. Vet. Med. Ass. 17*: 226-248.

Mastroyanni M., Manganà O. (1982). Evolution of rabies in Greece from 1966 to 1980. *Rabies Inform. Exch. 2*: 48-53.

Manganà O., Mastroyanni M., Seimenis A. (1985). Epidémiologie et diagnostic de la rage en Grèce. «La Rage et la Brucellose». Colloque OMS-PMLZ, Moltpellier 1985, 55-56 pp.

Parassitologia 30: 97-103, 1988

RABIES CONTINGENCY PLANS IN THE UNITED KINGDOM

K. C. MELDRUM

Director, Veterinary Field Service, MAFF, Tolworth, Surbiton, Surrey, UK.

Abstract. The history of rabies in UK is described briefly. Details follow of the comprehensive import controls and quarantine procedures applying to the major vectors of rabies, which are detained for six months. Outbreak control is based on prompt notification and investigation, with infected areas if required. If rabies became widespread in wildlife, the use of oral vaccine would be considered.

Key words: import, quarantine, notification, eradication, U.K.

INTRODUCTION

The scope of this paper is to provide a brief history of rabies in Great Britain up to the present time, give details of our importation controls and quarantine procedures, and to describe the contingency plans which exist for the control of rabies, should it once again be confirmed in the country, including the control of rabies in wildlife.

HISTORY OF RABIES IN GREAT BRITAIN

Great Britain has been free of rabies since 1922, with the exception of two isolated cases, one in 1969 and the other in 1970, in dogs recently released from quarantine. Twenty-nine cases have occurred since 1922 in animals undergoing quarantine, 5 of which have occurred since 1949.

The disease had been known in the country since medieval times, but there has never been any record or evidence of a wildlife reservoir, so that disease has never been truly endemic. It is remarkable that foxes and other wildlife did not become infected with rabies bearing in mind the extensive fox population that existed in the nineteenth century.

The incidence of rabies increased after 1735 when land became enclosed and spread amongst domestic dogs in urban areas of the country. Two outbreaks in deer occurred: one near Barnsley in 1856, when 100 animals were involved; and another in Richmond Park, London, in 1886 when 257 fallow deer died, but did not pass on the disease to red deer in the same park.

The fallow deer were observed to bite each other, however, and thereby caused the disease to spread within the herd.

Controls in the country were vested firstly in local authorities, and then to central government, to enact muzzling orders in infected areas, and to control strays. These restrictions were not popular; the public were indifferent, the dog owners were hostile, and the result was that in 1892 the orders were revoked in deference to the general wish, and powers returned to the local councils, who did little to implement them.

The incidence of rabies continued to increase until in 1895 there were 727 recorded cases, and between 1889 and 1898 over 160 people died from rabies. Enough was enough, and a Departmental Committee was formed in 1896, Parliament accepted their recommendations, and a new Rabies Order and Importation Order were implemented in 1897. The disease was tackled nationally by muzzling of dogs, elimination of strays, and tracing the source and movement of rabid dogs and their contacts; also by preventing the fresh introduction of disease from abroad by the strict regulation and control of the importation of dogs. The disease was eradicated in 1902.

The disease was reintroduced in 1918 by a dog from abroad eluding the authorities at Plymouth. The delay in notification resulted in 129 cases in animals being confirmed in Devon and Dorset, all from the one dog. In all, 328 cases were found in the South of England, before rabies was finally eradicated in 1922.

Import controls

Import controls and quarantine procedures operating in Great Britain are specifically directed at the major vectors of the disease. These encompass warm-blooded mammals, except farm livestock and some other herbivores which are not considered to be important in the spread of the disease.

There is free movement of animals between the associated islands of Great Britain and Ireland, all of which are rabies-free, and who operate identical import controls for animals from other parts of the world.

The main provisions which apply cover landing under licence, quarantine, vaccination, transhipment and enforcement.

Animals may not be landed in Great Britain except under the terms of a licence which has to be obtained in advance. The licence can only be obtained when accommodation in an approved quarantine premises has been arranged. The landing may only take place at a limited number of ports and airports authorised to receive imported animals. These ports have facilities to hold imported animals for short periods in an emergency. The journey from the port or airport to the approved quarantine premises may only be undertaken by a carrying agent authorised by Ministers. The animals are detained in quarantine premises for six months, and all domestic dogs and cats are compulsorily vaccinated against rabies using a killed cultured virus strain

vaccine, immediately on entry. The purpose of this vaccination is to protect against any cross-infection in the quarantine kennels.

Native animals taken out of British territorial waters, whether or not landed in a foreign country, will all be treated as imported animals. Further, animals on board vessels in harbour in Great Britain must be restrained and securely confined in a totally enclosed part of the vessel, and native British animals must not go on board vessels where there are animals on board.

Local authorities carry out the enforcement procedures involved in operating the Importation Orders, assisted in the first instance by Customs officers, who are particularly vigilant in the detection of smuggling offences. Shipping and airline companies are required to ensure that animals are not loaded without a Ministry boarding document showing that a licence has been granted, and all animals have to travel as manifested freight, and are not permitted in the passenger compartments.

Contraventions of the Importation Orders are arrestable offences and carry severe penalties upon conviction (an unlimited fine and/or up to one year's imprisonment). British Courts generally take a serious view of offences against the rabies laws, and heavy penalties are often imposed.

Customs officers and harbour masters throughout the country maintain special vigilance over the small boat and yacht traffic from abroad, and every harbour, marina and estuary mooring is diligently policed. Multi-lingual notices containing essential information on the rabies laws are displayed. Captains of vessels sign declarations on arrival when they are visited by Customs officers and special publicity is provided for use by yacht clubs. In areas where wholesale surveillance is impossible, the risk is offset by the countrywide vigilance of the police and local authorities, yachting associations and simply members of the general public, both on the coast and inland. There have been many instances of illegally landed animals being found after suspicions have been aroused, and the authorities summoned by a telephone call from a private citizen.

Quarantine procedures

For domestic dogs and cats landing in Great Britain, it is required that they be detained for six months in a kennel approved by Ministers. The costs of quarantine, transportation, vaccination and veterinary fees are borne by the owner of the animals. These kennels are all privately owned, of varying size and type, but are under the direct supervision of a veterinarian, who is appointed by the Minister, and who is responsible for the day-to-day running of the kennels. The kennels themselves are constructed to comply with a standard schedule of conditions, and are inspected for compliance by the State Veterinary Service.

All of the authorised vehicles used to transport imported animals are inspected by the State Veterinary Service prior to approval by the Minister,

and they must have secure double doors or double crating arrangements to give protection against escape.

Should an animal die in quarantine, the brain is routinely examined at the Ministry's Central Veterinary Laboratory at Weybridge in Surrey.

Contingency plans

Wide-ranging powers have been provided to deal with any outbreak which may arise in Great Britain and contingency plans have been made to cover almost every situation which might arise. Many of the powers available are not immediately invoked, and even when an infected area is declared, only a few of the powers are given automatic effect. The majority are optional powers which the Minister can bring into effect if they are needed.

The simplest case might be that of a single domestic pet which had no contact with other animals, and where quite limited measures would be sufficient to contain the disease. On the other hand, there could be an area containing potentially infected wildlife, farm stock and domestic pets, where the problems of containment would be much more complex that those arising even with serious outbreaks of farm animal diseases.

On suspicion of disease the premises holding the animal would be declared an infected place. The suspect animal would be removed to secure holding premises for detention and observation (if very high risk), or confined on the home premises. If the suspect is rabid, it will die in a few days; otherwise the suspect is released after 15 days observation. The brain of a dead suspect is examined at the Central Veterinary Laboratory, as in the case of quarantine animals which die.

After a positive laboratory test, the follow-up action depends on the circumstances. If the infected animal had been at large with the opportunity of infecting other animals, including wildlife, then an infected area would be declared.

The size of a infected area would vary, but it is unlikely to be less than 20 km radius, defined by natural boundaries or roads, railways and canals. On declaration, the automatic powers already referred to are immediately available to the authorities, even if they are not required. These are the powers to destroy foxes inside the area, prohibit sporting or recreational activities and to erect and maintain warning notices.

The optional powers available include the restriction of movement of animals into and out of a zone (infected areas may be divided up into zones, and only certain species will be subject to restrictions within a zone); the control of dogs and cats (especially muzzling and leashing of dogs and leashing of cats); the control of animals other than dogs and cats; the seizure, detention and disposal of animals not under proper control in the area; the compulsory vaccination of animals; the prohibition of gatherings of animals, such as dog and cat shows, sheep dog trials, horse shows, agricultural shows; the prohibition of specific activities such as hunting, racing, coursing, point-

to-point meetings and shooting of game. The final optional power is one requiring the notification of deaths of animals — the description of species covered would be defined in the special power taken at the time. This power would certainly operate if a fox destruction exercise was taking place.

In any outbreak, the co-operation of many Government departments, local authority and other interests, including practising veterinary surgeons, would be essential. Guidelines have therefore been issued to enable all concerned to prepare their plans.

Vaccination of animals against rabies is not allowed in Great Britain, except for dogs and cats in quarantine and animals to be exported. Contingency plans exist for the compulsory vaccination of dogs, cats or other species in an infected area.

Wildlife control

Having carefully considered all the evidence and in particular that foxes in an area might be infected or have been exposed to infection, a decision could be taken to destroy foxes in the infected area. In any area, it is expected that the main wildlife vector in Great Britain would be the red fox (*Vulpes vulpes*), as on mainland Europe. The other recognised species responsible for perpetuation (raccoons, skunks, mongooses, wolves, jackals) do not occur in the wild in Great Britain.

Based on studies of fox behaviour in Britain, the area chosen would be about 1,170 km^2, based on local knowledge of the area, geographical considerations and urban locations. Arrangements for destruction of wildlife would be controlled by Ministry staff from disciplines associated with the control of wildlife. The chosen area would be covered by a staff of about 170. Warning and publicity by public and written notices would be given before the destruction operations commenced.

The aim would be firstly to select sites for the placement of bait throughout the control area in such a way that there would be a strong probability of all foxes finding and taking the baits. Each sector will be divided into 1-km squares, and alternate squares (on a chequer-board system) will be designated for the laying of baits. Within each square, a key area would be chosen, and baiting points, marked by pegs would be identified at about 100 m intervals.

Once the marking pegs were down, a baiting operation would begin, using chicken heads, which would be buried beneath turf, or in the soil. Foxes are known to readily find and take such bait. This baiting operation would continue for 3 to 5 days, long enough to accustom the foxes to a new source of food. Bait points would be regularly checked for uptake, until a consumption plateau was observed.

The third phase would consist of replacing the chicken heads with poisoned bait (day-old chicks) for 3 days, with daily replenishment of any baits taken and, following this, all unused bait would be recovered and destroyed. At the same time, any carcases reported or found in the area would be collect-

ed for destruction. The chosen poison is strychnine sulphate, and this would be administered to the day-old chicks by injection of 2 ml, containing 50 mg strychnine. At the present time, strychnine is the only poison available, but it has the disadvantage of not being degradeable, so that baits which are not retrieved constitute a risk to wildlife, the environment and man. In addition, the manner of death is unpleasant.

A considerable amount of work has been done to find an alternative poison, which will be effective without being unpleasant in its effects, and which will degrade rapidly after being laid, eliminating any residual danger to man, animals or the environment. The current poison being evaluated is one based on carbamate, which degrades rapidly and is effective in its action. Problems associated with the precise method of incorporation of the poison into the bait, and its manufacture and method of handling are the areas which have still to be resolved.

At the same time as the baiting operations, control of foxes would be supplemented by the gassing of fox earths, and this would continue until all known earths had been visited. In urban areas, the use of poison would be more carefully regulated, but it is still possible to lay bait in safe areas, such as along railway lines, on waste ground and other relatively secluded places where foxes are known to scavenge. If baiting is not possible, the use of traps, snares or nets would be considered.

These contingency plans depend heavily on the diagnosis of the first rabid fox being made. In the case of a known domestic case of rabies, where there is evidence, firm or circumstantial, that wildlife could be infected, it is reasonable to assume that a fox control programme in an infected area would be successful. However, if the early cases are missed, then European experience suggests that, depending upon the efficiency of reporting and probability of detection, the disease may spread radially for some months, and over 200 foxes may become infected in an area of 10,000 km^2. Even allowing for the effect of natural and man-made boundaries to slow down the spread of the disease, the decision to employ widespread and relatively indiscriminate killing of foxes and other wildlife as a means of control over a long period of time would become increasingly untenable. The alternative, that of oral vaccination, using a live virus vaccine of attenuated virulence, would have to be considered. The progress of the European oral vaccination programme is being closely studied, but the vaccine has to be shown to be completely safe and effective, as to risk of the reversion to virulence in one of the many mammalian species exposed to the vaccine would exacerbate the situation and allow the disease to become endemic over a wide area.

Conclusions

The threat of introduction of rabies into Great Britain continues unabated, even if the main fronts in Europe have been slowed. Increased demands for easier and speedier travel, limitations on the number of physical checks car-

ried out by Customs officers, and the level of cross-Channel traffic all increase the risk of introduction of disease. Nevertheless, rabies has been kept out of Great Britain for over 60 years, and the British Government is determined to continue with a policy designed to prevent the introduction of the disease. This policy receives active support not only from local authorities and farming organisations but, most importantly, from the public at large. In the end, it will probably be public vigilance as much as anything, which will maintain Great Britain's ability to remain a rabies-free country.

Parassitologia 30: 105-107, 1988

RABIES IN IRELAND: A PRECARIOUS FREEDOM

J. A. Costello

Senior Superintending Veterinary Inspector, Veterinary Services, Department of Agriculture and Food, Agriculture House, Kildare Street, Dublin 2, Republic of Ireland.

Abstract. The prolonged freedom from rabies enjoyed by Ireland is based on both its island location and the rigid enforcement of national legislation. The yachting tourist and the increased level of shipping activity in ports and harbours are a major threat of disease introduction. Mass media publicity and public awareness are the main safeguards necessary to protect the freedom of our island.

Key words: freedom, laws, island, publicity, planning, Ireland.

Since 1903 Ireland has maintained a precarious freedom from this terrible disease, precarious in that the existence of this disease throughout the world means that at any time our shores could be visited by an animal incubating the disease.

Prior to 1903 Rabies was present in Ireland, however the nature of the disease in the country was such that it did not spread to either our domestic livestock or wild animal population. Rabies in Ireland was essentially an urban phenomenon. It is difficult at this point in time to explain why rabies should have been confined to our towns and cities. That it was so in no small measure contributed to the elimination of the disease from Ireland.

I have seen archive material from the newspapers of the late nineteenth century which graphically described the efforts of individuals and municipal authorities to capture and destroy animals suspected of being infected with rabies. All the reports I have seen make reference to the disease in dogs. One report describes the destruction of a pack of fox hounds in which the disease was diagnosed.

At the time of its elimination, one, if not the main factor which can be said to be responsible for the successful eradication of the disease was the introduction of legislation requiring the muzzling of all dogs. Dogs found in public places without muzzles were seized by the authorities and destroyed. This interference with the primary route of infection in the domestic dog and the destruction of all dogs showing evidence of «nervous disease» served the country well. I am quite certain that many of the dogs destroyed were not in fact rabid but were victims of other ailments. As with other disease control operations there is always some element of over-kill!

Irelands continuing freedom from rabies can best be attributed to two main factors. As an island nation the disease has to be brought to the country by ship or aircraft. To some degree this has a limiting effect on the points of possible entry. Having said this I have to caution that the increased mobility of the world's population and to some degree increasing affluence have reduced the value of our geographical location as a barrier to disease entry. Over the past number of years Ireland has greatly increased its involvement in international trade. Our small domestic population has necessitated the development of an economy which is export orientated. Part of this development has been the increased number of ocean going vessels which daily visit our main ports. The home ports of these vessels may be countries where rabies is endemic.

Many of these vessels carry rabies susceptible shipboard pets. Maintaining effective control over these animals while the vessels are in port is very costly in terms of official supervision. Ships carrying timber have been known to harbour bats, effective control of which is difficult, which highlights our vulnerability and precarious position.

The second factor contributing to our freedom is a rigidly enforced policy of import control. This policy is based on national legislation which prohibits the importation of rabies susceptible animals except under licence. An integral part of the licensing procedure is the requirement that the imported animals undergo a mandatory period of quarantine of not less than six calendar months from the date of landing. During the quarantine period all animals are vaccinated against the disease. The quarantine premises are officially approved and must be under the direct control of a veterinarian. In the Republic of Ireland we have one such premises.

Within our national legislation we do make one exception to the requirement for licensing and quarantine, that is for dogs and cats originating from the United Kingdom, Channel Islands and the Isle of Man. This exemption is based on the status of the United Kingdom and on the close liaison which we maintain with our United Kingdom colleagues in the area of rabies control procedures.

A prohibition on importation to be effective is totally dependent on effective policing. In the case of Ireland this means the involvement of our national Customs and Excise service at all port and airport locations, veterinary and lay personnel from the Department of Agriculture and Food and our national police force. The maintenance of vigilance by these three agencies and their immediate response to alleged breaches of our laws is responsible for our disease freedom.

For a number of years the Department of Agriculture and Food has tried to broaden the scope of its control activities. This has been undertaken by the use of widespread publicity in the press, on television and on radio. The rationale behind this approach has been that the general public can be the best eyes and ears of official agencies. By targeting the mass media we would hope to reach the widest possible audience. The success of our annual campaign is best measured by the number of reports of illegal importation

which we receive at both our headquarters and at our local offices throughout the country.

Our advertising campaign has been taken a stage further, by the involvement of ferry crews, municipal authorities in coastal counties, schools and agricultural shows. This latter part of our campaign arose from the recognition that it was not possible for official agencies to visit and supervise all our coastal areas. The small harbours which dot our coast line represent the most dangerous area for possible disease entry. Increasing affluence and the activities of the tourist industry have given rise to the yachting tourism. Many of these visitors are very familiar with our coast line from sail training courses held at various venues round the coast. Many of these tourists make their first landfall in harbours which are not included in portal inspection programmes. Tourist coming to Ireland cannot understand our fears about the introduction of rabies and the threat which their pet animals could pose to Ireland in terms of both public and animal health. They also show a great reluctance to travel without their pets. Our freedom is an added tourist attraction.

In Ireland our contingency planning for an outbreak of rabies is based on the control of the disease within the urban situation. Our thinking in this regard is to ensure that the disease can be controlled prior to its escape into the countryside. One of the major difficulties in such a strategy is the urban fox. The fox with its den in the farmland or forestry areas and which scavenges the domestic refuse in housing developments in close proximity to such land. Foxes have been seen and reported in all of our urban areas. A recent report from the police of a fox leaving a park in the centre of our capital in the early hours of the morning demonstrates the ease with which rabies could readily break through a cordon sanitaire established round a suspect or confirmed outbreak of disease. Another worrying feature in the development of a control strategy is the pattern of pet ownership within the country. Pet animals are allowed a great deal of freedom by their owners, a freedom which extends to their being allowed to wander through parks and recreational areas without adequate restraint. We have addressed this particular problem by the introduction of new dog control legislation in the course of 1986. One of the essential elements in this legislation is the appointment of dog control wardens in each locality, the wardens have extensive powers of seizure. They can in fact seize any dog which is found in a public place and which is not under effectual control of its owner or handler. The scale of monetary penalties which accompany the legislation are also having a deterrent effect on the wandering dog.

The development and rehearsal of contingency plans to deal with an outbreak of disease are just facets of control. The implementation of such plans would in fact mean that the battle was virtually lost. The cost of rabies to Ireland is seen as too high a price to pay. It is for this reason that we, in conjunction with our colleagues in the United Kingdom, the Channel Islands and the Isle of Man, adopt control strategies and import policies designed to maintain the disease-free status of our national territories.

Parassitologia 30: 109-111, 1988

ANIMAL RABIES IN POLAND: EPIDEMIOLOGICAL SITUATION AND METHODS OF CONTROL

J. KOLACZ

Ministry of Agriculture, Forestry and Food Economy, Department of Veterinary Medicine, ul. Wspòlna 30, 00-930 Warsaw, Poland.

Abstract. The epidemiological situation and methods of control of animal rabies in Poland are presented. Registered data on rabies cases for the period from 1948 up to 1986 are discussed. Two species of animals, namely dogs and foxes, have played the major role in the epidemics of rabies. The undertaken measures have proved satisfactory to control rabies due to dogs as a vector but were found inadequate to control wild-life rabies. Since 1967 the fox has been the main vector of the epizootics of rabies.

Key words: animal rabies, epidemiology, control, Poland.

Animal rabies in Poland has been controlled by law as notifiable disease for 60 years, since 1927. Registered data on rabies cases (Figure 1) show the highest prevalence of the disease up to 1949. The infection was spread among domestic animals, mostly dogs. Compulsory vaccination of dogs were introduced in 1949 and this program has still been in operation. The number of rabid dogs and domestic animals decreased from over 3,700 cases in 1948 to 65 in 1956. And this is obviously the result of immunization of dogs being at that period the main vector of the infection.

During the years 1948-1956 sporadic outbreaks of rabies were recorded among wild-life animals, namely 1-7 cases per year. From 1957 the rabies incidence has become more serious, especially in foxes, although up to 1963 annually less than 50 cases of rabies were registered. Afterwards the number of outbreaks among wild-life animals constantly increased and reached its highest peak with 1,328 cases in 1975. However, in some regions of the country a remarkably low frequency of rabies cases or even completely rabies-free areas have been observed.

In the middle of '60s the number of rabid cases among wild-life began to be higher than domestic animals and reached the figure 80% of the total. In the decade 1967-1976 a total of 9,690 rabies cases were registered in animals, and foxes made up 62.1% of the total. During the next 10-year period, 1977-1986, the total number of cases dropped down by 33.2% but fox cases slightly mounted up to 64.7% of the total. This clearly shows the fox to be the main vector of the epizootics of rabies.

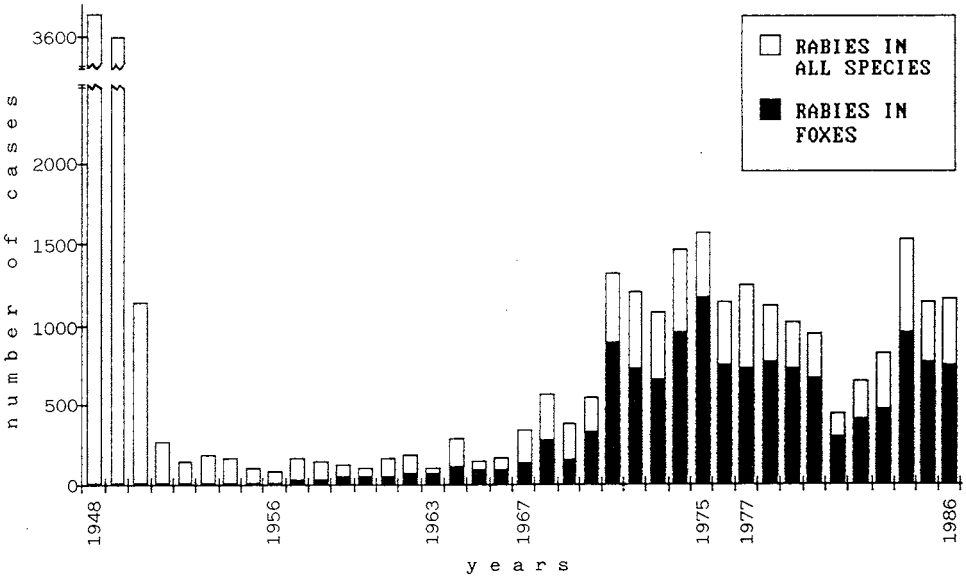


Fig. 1. Rabies in Poland in the years 1948-1986.

As it was mentioned earlier, animal rabies has been controlled by law since 1927 but in the meantime some supplementary regulations have been put into operation to inhibit the spread of wild-life rabies. According to them in areas where rabid animals are found the veterinary authority sets up infected and suspected zones with size considering relevant bio-geografical features and the individual living patterns of particular species of wild-life existing in the area concerned.

In an infected zone shooting, hunting, trapping, etc. are prohibited. Individual shooting of rabies suspected animals as well as wild-life leaving the suspected zone is permitted. This zone surrounds an infected one.

The aim of all this was to prevent the spread of rabies by inhibition of movement of wild-life out of infected areas and let the epidemic disappear by the reduction of wild-life by rabies itself.

We have never concentrated the wild-life vector control on population reduction of any species of animals. Gassing of fox and poisoning of wild animals have never been carried out in Poland as measures of controlling of rabies. Prophylactical animal rabies vaccination is compulsory to dogs only. Other species of domestic animals can only be immunized if exposed to rabies.

The efficacy of the above mentioned practices as a method of controlling animal rabies has been considered over a number of years in Poland. In conclusion it can be said that:

1) two species of animals, namely dogs and foxes, have played the major role in the epidemics of rabies;
2) the undertaken measures to control the disease have been satisfactory to

control rabies due to dogs as a vector but were inadequate to control of wild-life rabies;

3) however, during the last 10 years (1977-1986) the total number of rabies cases decreased to 33.2%, as compared to the period of 1967-1976;
4) the new techniques, particularly oral vaccination of foxes, is the key for an effective prevention of the disease among this species and finally to control the infection in general.

Parassitologia 30: 113, 1988

RABIES SITUATION IN PORTUGAL

S. G. Veiga

General Directorate of Livestock, Lisbon, Portugal

Summary

This is a short summary on rabies situation in Portugal which is considered a country free from rabies.

The available data on rabies receptive domestic animals are discussed. If stray dogs (average) are added to registered dogs, it can be estimated that in Portugal there is about one dog per 10 people. A list of rabies receptive wild animals existing in Portugal is also presented and discussed.

Since many years Portugal has been running a compulsory dog vaccination campaign and no autochthonous rabies positive dogs have been recorded in recent years. In 1984 there was one case in a puppy coming from Mozambique which entered Portugal eluding the veterinary services.

Portugal hasn't natural barriers against transmission of this zoonosis. Therefore, beside the actual strategies of control, Portugal is looking forward to the development of an effective vaccine for wild animal vaccination in Europe, as well as in the other continents.

Parassitologia 30: 115, 1988

RABIES IN SPAIN

J. DE ZULUETA

Casa de Mondragon, Ronda, Malaga, Spain

SUMMARY

Reference is made to the canine rabies episode of Malaga in 1975, when two rabid dogs were found in routine tests. Spain had been free of rabies for more than a decade and it was suspected that the disease had been reintroduced by dogs brought by tourists coming from North Africa. Subsequent examinations revealed a total of 114 cases: 68 dogs, 45 cats and one single fox. There was also a fatal human case with incomplete post-exposure treatment.

The widespread use of strychnine baits against stray dogs and foxes led to the abuse of this practice, now prohibited, in detriment of the rich fauna of Southern Spain. The successful control of vulpine rabies, reported at the meeting, shows how much can be done for the control of a disease like rabies with a minimal damage to wild-life.

Parassitologia 30: 117-119, 1988

DIE TOLLWUT IN UNGARN

L. KOLTAI

Ministerium für Landwirtschaft, MMEM, Budapest, Ungarn.

Abstract. The rabies in Hungary between 1954 and 1967 was sporadical, and only later it became an epidemic disease (800-1,300 cases per year). More than 90% of the cases was diagnosed on foxes. Rabies occurs at different frequencies all over the country. Defense has been based on annual vaccination of dogs against rabies and on decrease of the fox populations with hunting, poisoning and gasification of burrows. Nowadays we have considered to initiate oral vaccination of foxes and at the same time to avoid poisoning because of its environmental effects, and gasification because of its low effectivity.

Key words: rabies, vaccination, fox control, Hungary.

Vor dem zweiten Weltkrieg ist es in Ungarn gelungen, die Tollwut bei *Hunden* mit den angeordneten obligatorischen Hundeimpfungen — zusammen mit den veterinarpolizeilichen Massnahmen — zu eliminieren. Nach dem zweiten Weltkrieg, in den fünfzigen Jahren ist die Tollwut bei uns wieder, aber jetzt bei *Füchsen* erschienen.

Das Vorkommen der bei den Füchsen festgestellten Tollwutfällen war von 1954 bis 1966 sporadisch, später epidemisch. Die Änderungen der Anzahl der Tollwutfällen von Jahr zu Jahr wird auf dem *ersten Bild* dargestellt. Der Zeitraum von 1967 bis 1986 kann auf zwei voneinander unterschiedlichen Character zeigende Periode zerteilt werden. Die erste dauerte von 1967 bis 1977, als die Anzahl der Tollwutfällen jährlich noch unter ein Tausend war und die Seuchenwelle ugefähr zweijährlich auf und ab sehr stark schwankte. Die Seuche ist seit 1978 stärker geworden. Die Anzahl der Tollwutfällen stieg jährlich bis 1.000, manchmal 1.300, sogar 1.400, und die Änderungen von Jahr zu Jahr wurden immer kleiner. Die Seuche scheint ihren Höhepunkt in dieser Periode schon erreicht zu haben.

Die Anzahl der erkrankten Tiere und ihre prozentale Verteilung unter den verschiedenen Tierarten von 1967 bis 1986 wird in der *Tabelle zwei* dargestellt. Darauf kann man sehen, dass die Tollwutfällen bei den Füchsen dominieren und ihre Teilnahme fast 91% beträgt. Der Hauptträger der Krankheit ist also der Fuchs, und die andere Tierarten spielen nicht bedeutende Rolle. Obwohl das Verhältnis der in Tollwut erkrankten Katzen nur 4.2% ist, wir fürchten davor, weil in Ungarn, unserer Schätzung nach, mindestens zwei Millionen Katzen leben, die teilweise herrenlose und gegen Tollwut nicht

geimpte sind. Bei uns ist eine sehr interessante Beobachtung, dass wenn auf ainem bestimmten Gebiet die Tollwutfällen unter den Katzen sich vèrmehrten, fast sicher, dass am nächsten Jahren hier, unter den Füchsen, die Tollwutseuche sich verstärken wird. Die erkrankte Hunde waren fast ausnahmweise junge, herumstreifende und herrenlose Tiere. In Ungarn werden ungefähr 1.300.000 Hunde gehelten. Diese Tiere werden jährlich gegen Tollwut obligatorisch geimpft.

Die Verteilung der Anzahl von Tollwutfällen wird auf der Landerskarte/*drittes Bild*/gezeigt. Tollwutfällen können auf dem ganzen Gebiet des Landes festgestellt werden. Die Seuche hat aber bei uns einen wellenartigen Character. Demzufolge, wenn auf einem bestimmten Gebiet zwei oder drei Jahren lang viele Tollwutfällen festegestellt worden sind, in den folgenden Jahren allgemein eine starke Verminderung zu bemerken ist, und die Seuche in einigen Jahren wieder zurüchkommen wird. Diese Tatsache hängt wahrscheinlich mit der Anzahl der Fuchspopulation zusammen. Auf der Landeskarte die gestreifte Komitaten waren im Jahr 1986 am infiziertesten.

Die *Verteidigung* ist gegen Tollwut bei uns — wegen der sanitaren Bedeutung der Krankheit — intensiv organisiert. Daraus möchte ich Ihnen nur die wichtigsten erwähnen.

Nach den *festgestellten* Fällen — weil diese Krankheit in Ungarn anzeigepflichtige ist — müssen alle vorgeschriebene Schutzmassnahmen/Beobachtung, Abtötung, Einmeldung, Hundesperre, bei nützlichen Haustieren postinfektionelle Impfungens, usw/durchgeführt werden. Als *Prevention* müssen jährlich alle Hunde gegen Tollwut obligatorisch geimpft werden. Auf einigen stark infizierten Gebieten ist Methode auch bei Katzen angewendet, aber nicht immer. Die preventive Impfung gegen Tollwut ist bei den anderen nützlichen Haustieren nur empfohlen, und nicht obligatorisch. Die Grossbetriebe verwenden diese Methode leider sehr selten.

Gegen dem Fuchserkrankungen probierten wir asl Dezimierunges-methode seit 1967 die Fuchsbauvergasungen verwenden. Binnen den ersten zehn Jahren der Aktion haben wir von den Jagdorganisationen begeisterte Hilfe bekommen. Später verminderte sie siche sehr stark und die Aktion war in den letzten Jahren schon fast wirkungslos. Demzufolge wurde diese Verteidigungsmethode von uns im Jahr 1986 endgültig abgestellt. Die Vergiftungen mit verschiedenen Materiellen/strichnin, usw/wurden schon früher, aus naturschützlichen Gründen verboten. Neue Wege suchend verhandeln wir ungafähr seit einem Jahr mit dem WHO Centrum in Tübingen, um die perorale Immunisation der Füchsen auch in Ungarn — zuerst als Versuch — einzuführen. Auf dem ausgesuchten Versuchsgebiet wollen die Jäger diese Aktion helfen. In diesem Moment so scheint es, dass auch der finanzielle Grund schon Ordnung ist. Nur darum warten wir mit dem Beginn, weil nach dem Versuch der Weiterschritt noch unsicher ist. Nämhlich die Mehrheit der Jagdorganisationen die notwendeige Hilfe abweisen, und ohre ihre Teilnahme die Durchführung nur mit totalen Mechanisierung vorstellbar ist. Darum verhandeln wir jetzt mit dem Dienst für Pfalnzenschutz um die spätere Aktionen mit landwirschaftlichen Flugzeugen durch führen zu können.

Wir hoffen, dass nach der Klärung der Problemem, mit der Hilfe des WHO Centrums in Tübingen und der internationalen Zusammenarbeit, in der Bekämpfung der Tollwut auch bei den wildlebenden Tieren Erfolg erreichen werden.

Parassitologia 30: 121-122, 1988

PRESENT STATUS OF BAT-RABIES IN EUROPE

W. W. MÜLLER

Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, P.O. Box 1149, D-7400 Tübingen, Federal Republic of Germany.

Abstract. Since 1985 there has been an increase of bat rabies in Europe, especially in Denmark, the Federal Republic of Germany and the Netherlands. The present knowledge on the epidemiology, diagnosis and prophylaxis of the disease is summarized.

Key words: bat rabies, Europe Duvenhage virus, *Eptesicus serotinus*.

EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF BAT RABIES IN EUROPE

Isolated cases of bat rabies were reported up till 1982. Since 1985 there has been an increase of cases affecting countries bordering the Baltic and North Sea and very recently there were 2 cases in Spain. The bat species most frequently affected was *Eptesicus serotinus*.

Bat rabies follows its own cycle. In most of the affected countries bat rabies exists and there is no wildlife type rabies in terrestrial animals. Natural transmission of rabies from bats to terrestrial animals has not been observed to date. It should be noted that all European bat species are insectivores.

Two human cases caused by the bite of a rabid bat were reported, in 1977 and 1985, from the Union of Soviet Socialist Republics. The 1985 isolate was characterized with monoclonal antibodies as serotype Duvenhage. The first case identified as Duvenhage virus in Africa was also a human case.

The frequency of rabies cases in bats reaches its peak in August, a month with great activity in the bat population.

We have no knowledge on carrier state and transmission of the virus amongst the bats. Clinical features are scanty. We do not know how the virus established itself in Europe.

THE VIRUS OF THE EUROPEAN BAT RABIES

In all cases the virus in bats was characterized with monoclonal antibodies as serotype 4, prototype Duvenhage, as classified by WHO (Genus *Lyssavirus* of the rhabdoviruses group).

In the United States tests have been carried out in the laboratory to infect animals by different routes with the Danish bat virus. Mice, dogs and cats succumbed to the infection.

Mouse protection tests with vaccine virus of the serotype 1 group did not reveal full protection against the bat virus.

In serum neutralisation tests of human patient sera and rabies immunoglobulin of human origin, titers of CVS and bat rabies strains were different. Nevertheless, protective titers remained.

Prevention and protection

In areas in which bat rabies has been diagnosed, contact with suspected animals by the public should be avoided. A public education campaign, also in schools, should be applied.

Suspected rabid bats should be handled preferably by trained personnel using protective gloves. Also the use of closable bottles, cartons or clothes can be applied to avoid a bite.

In case of suspected virus contamination of animals or objects, the best first-aid treatment is: thorough washing and cleasing of hands with soap and/or water.

High risk persons (bat researchers, bat protectionists) routinely handling bats should receive prophylactic antirabies vaccination.

In case of human exposure the same WHO recommendations as for exposure to rabid terrestrial mammals should be applied.

Need for information and bats as endangered species

On one hand there is a great need for information on many aspects of the recent increase in bat rabies cases in Europe, which includes investigation of bat populations; on the other hand there is great effort to protect these animals and the plea of the biologists not to disturb the bats. All European bats are endangered species.

One major principle should be observed: a competent biologist should be consulted before any decision is made whether control measures in regard to bat rabies should be applied.

In Denmark and the Federal Republic of Germany there is already a very close-knit cooperation by biologists and veterinarians practiced. Many samples are submitted from biologists and bat protectionists. This has furthermore the advantage that a species identification can be carried out.

Both, biologists and veterinarians are being asked to initiate awareness of the problem rather than create hysteria in the press amongst the general public, especially with those people that have bats still living in their houses. Otherwise, efforts to conserve these animals would be much more difficult.

Parassitologia 30: 123-128, 1988

THE RABIES SITUATION IN THE NETHERLANDS

H. U. R. NIEUWENHUIS

Directoraat-General Landelijke, Veterinaire Dienst, Ministerie van Landbouw en Visserij, Bezuidenhoutseweg 73, P.O. Box 20401, 2500 EK 's-Gravenhage, The Netherlands.

Abstract. From time to time the Netherlands are confronted with sylvatic rabies. The last time was in December 1986. The distribution of sylvatic rabies is restricted to certain areas: mainly the northeast and the south. Rabies is considered not to be endemic in the Netherlands. Oral vaccination is at the moment not under discussion. Since August 1986 examination on bat rabies has started. In 1987 81 out of 1150 bats were found to be positive. The epidemiology of this type of rabies is still unclear.

Key words: rabies, epidemiology, bats, The Netherlands.

This communication is to give you a survey of the rabies situation in the Netherlands. After a historical review I will dwell on the prevention and control of rabies, the position of the fox in the Netherlands and the position of the Netherlands in relation to other European countries concerning rabies control. Finally, the rabies situation with respect to bats will be discussed.

Let me begin with the historical review. Until 1923 no cases of sylvatic rabies occurred in the Netherlands. Rabies did occur, however, but was introduced by the import of infected dogs. From 1923 until 1962 the country was free from rabies. In the sixties and 1972 a few cases of rabies occurred caused by imported animals. In 1974 the Netherlands came up against sylvatic rabies for the first time. This epizooty lasted until 1977. Fifty-two cases were diagnosed, the majority of which occurred in the southern part of the province of Limburg. In 1979 there was another case of rabies due to import. The year 1983 saw the beginning of another period of sylvatic rabies (Figure 1). Rabies occurred in the following provinces:

1983 province of Groningen: 3 foxes
1983 province of Limburg: 12 foxes
1984 province of Limburg: 38 foxes, 9 badgers, 1 roe deer, 6 sheep, 7 cows
1985 province of Limburg: 12 foxes, 1 badger, 3 sheep
1986 province of Overijssel: 1 fox.

With regard to the prevention of rabies, animals suspected of being infected by rabies are examined at the Central Veterinary Institute (CVI) in Lelystad. This applies to farm animals, dogs, cats and foxes. In particular

from the border areas near West-Germany and Belgium foxes are regularly sent to be examined. The objective of this inspection is to detect the introduction of rabies from neighbouring countries as soon as possible. For each fox presented the Dutch government pays a bonus of DFL 15. All animals are examined with the help of immunofluorescence test (IFT) followed by the inoculation of mice with brain tissue of the suspected animal. The numbers of adult foxes examined per year are given in Table 1.

At the moment the vaccination of dogs or cats against rabies is not compulsory. A combined rabies/foot-and-mouth disease vaccination of cattle is permitted, but not compulsory.

For the purpose of prevention requirements have been set to prevent the import of rabies-infected animals as much as possible. Dogs and cats which are imported or passed in transit from countries other than Belgium and Luxemburg need to be accompanied by a certificate which shows that the animals have been vaccinated against rabies in a proper manner. Futher, all foxes which are imported should be vaccinated against rabies.

The rabies control is coordinated and monitored by the Dutch Veterinary Service. This control is laid down in the Livestock Act. In case of a positive diagnosis various measures may be taken, in consultation with the regional veterinary inspector. Examples of these measures are: orders for the leashing of dogs, compulsory vaccination, the wearing of muzzles, and the killing of suspected animals. On December 21st, 1983 a leashing order became effective for the southern part of the province of Limburg. An epizooty of sylvatic rabies had started there some months earlier. Some months later compulsory vaccination was ordered for this area. On October 30th, 1986 these measures were lifted, seventeen months after the last case of sylvatic rabies was observed. In the Netherlands no measures are effective at the moment.

An important component in rabies control is the distribution of the fox. Initially foxes only occurred in the higher situated areas in the eastern and southern provinces of the Netherlands. Since the beginning of the seventies

TABLE 1 - Foxes examined in the years 1980-1987 in the Netherlands.

Year	Number of foxes examined
1980	477
1981	496
1982	475
1983	697
1984	759
1985	644
1986	801
1987 *	687

* Until September.

their distribution has been extended more to the western Netherlands. Foxes have now been observed in the Flevo-polders and in the dunes along the North Sea. It is not known how the fox has landed in the dunes. Possibly it has been introduced by owners of tame foxes releasing their animals here, when they could no longer be kept as domestic animals. The fox appears to live under natural conditions here. In some areas in the dunes one fox family has been found per 140 ha in the last few years. This means that the springpopulation in these areas is approximately 1 fox per 30 ha. Pursuant to the Hunting and Shooting Act there is no closed season for the fox, but as only the manager of an area may determine whether the hunting for foxes is allowed in this area, hunting is not permitted, for example, in the dune areas.

To date, cases of sylvatic rabies have only occurred in two areas along the borders. The first area is situated in the northern and eastern Netherlands. The last case of rabies in the north was on December 23rd, 1983. About six kilometres of the border with the Netherlands the Eems river runs in West-Germany. This river forms a natural barrier to the distribution of the fox, which reduces the risk of introduction. Because of the extensive agricultural area and the small forest area in the Dutch part, it is less likely that the fox will be distributed further. It is different for the east, where there are no or hardly any barriers to the fox. The last case of sylvatic rabies in the Netherlands was observed in this area on December 5th, 1986.

The second area in which fairly regularly sylvatic rabies occurs is in the southernmost part of the Netherlands. The area bordering on Belgium and West-Germany is forest-rich and hilly. The rabid foxes in this area were found near places where there was much cover. The elongated, narrow hill forests hold great attraction for foxes in the vicinity. The infected area was restricted to the border area south of the Geul river to a maximum of 9 kilometres from the Belgian border. In our opinion rabies will not spread readily from the south. First there are natural barriers such as the Meuse river in the west. As in Belgium, we note that west of the Meuse much fewer cases of rabies occur than east of this river. Secondly, there is a densely populated industrial area in the northern part of the province. The chance of fox populations in these two areas in the Netherlands, the northeast and the south, getting into touch is considered to be slight. There are three major rivers between these two areas. Contact between foxes in the western part of the Netherlands and other fox populations is also considered unlikely. They are separated by various large cities and few forests.

What does this mean for the Dutch position in relation to other European countries concerning rabies control? During the past 28 months the Netherlands has seen only one case of sylvatic rabies. It may be concluded that public health in the Netherlands is not threatened by the permanent presence of the rabies virus. The study performed by Schneider and Jackson showed that the spread of rabies was partly geographically determined. Application of this type of research to the Dutch province of Limburg leads to the following conclusions. 1) In the period 1975-1986, 123 cases of rabies occurred.

Fig. 1. Rabies in the Netherlands.

2) The area of the province being 2,208 km^2, this implies an average of 0.46 cases per 100 km^2 per year [(123:12):22.08]. 3) The province of Limburg consists for approximately 21% of arable and pasture land, and for 4.5% of forest. The major part is situated less than 100 metres above sea level. According to the classification of Schneider and Jackson this province could be classified as a type 1 area as concerns the epidemiological pattern of rabies: an area of insignificant occurrence.

The occurrence of sylvatic rabies in the Netherlands has been limited to the southernmost part and the northeast. The Dutch government considers this form of rabies non-endemic. The Dutch government is therefore of the opinion that at the moment it is not necessary in the Netherlands to pursue

the WHO-standard of 1 fox per 500 ha. From the viewpoint of public health, however, it is essential to keep well-informed of the situation in the border areas.

The Netherlands forms as it were a part of the border of the rabies distribution area in Western Europe. The infection to be expected as a result of the advance of the rabies front by 30 to 40 kilometres per year fortunately has not yet occurred. Nevertheless we should remain on the alert. The fact that rabies occurs relatively seldom, and remains restricted to a clearly defined number of areas is one of the reasons that the Dutch government has decided not yet to participate in experiments related to oral vaccination. A second reason is the fact that the areas in neighbouring countries where campaigns are held do not border on the Netherlands. If rabies situation should change, however, it will be considered whether this viewpoint should be adjusted. The scenarios for such an event are being prepared.

After rabies had been diagnosed in bats in 1985 in Denmark and West Germany, the Netherlands has begun to examine dead and sick bats in August 1986. This research is carried out at the Central Veterinary Institute (CVI) and is done with the help of IFT and virus isolation in mice. To date 1150 bats have been examined, of which 81 have been positive (Table 2). The species of each bat is determined. In cooperation with the Ministry of Public Health guidelines have been drawn up on what to do if one finds a bat. General practitioners and veterinary surgeons have been informed. Further, centres have been established where bats can be presented. Bitten persons are vaccinated as soon as possible. Dogs or cats which have been bitten or which are suspected of having been bitten are vaccinated with one of the common rabies vaccines. The owner is then advised to leash his pet animal for at least 14 days. Preventive vaccination of dogs is generally not recom-

TABLE 2 - Bat rabies in the Netherlands in 1987. Bats have been examined at the Central Veterinary Institute.

Bat species	No. of bats examined	Rabies positive bats
Eptesicus serotinus	364	78
Pipistrellus pipistrellus	437	0
Pipistrellus nathusii	51	0
Pipistrellus spp.	120	0
Nyctalus noctula	13	0
Nyctalus leisleri	2	0
Plecotus spp.	2	0
Plecotus auritus	50	0
Myotis nattereri	2	0
Myotis dasycneme	69	3
Myotis myst./brandtii	1	0
Myotis daubentonii	37	0
Chiroptera spp.	2	0
Total	1150	81

mended. The vaccination of dogs which frequently roam open country is recommended, however, as these animals run a greater risk.

Since in bats another virus type is common (serotype 4, Duvenhage) and there are no cases known yet of dogs or cats which have become rabid after having been bitten by a bat, no further measures are considered against this form of rabies. An additional problem is that measures taken under the Livestock Act do not apply to bats, which also is a protected species in the Netherlands. Before virological research into bats was started in the summer of 1986, nothing was done in this field in the Netherlands. Bats presented for research were often frozen. Some of these animals have now been examined for the rabies virus. A bat which had been frozen in 1984 appeared to be infected. This shows that at any rate the Netherlands has been infected with this virus type longer than assumed.

Perhaps there are countries in which similar retrospective research takes place. I am curious to learn their findings. It is still unclear how the virus could travel such great distances. The large brown bat (*Eptesicus serotinus*) usually only travels short distances (max. 20 kilometres). Up to now 3 other bats have been found to be infected, the pondbat (*M. dasycneme*). This species sometimes travels hundreds of kilometres. It is not yet known whether these animals are the source of infection. Scientists argue that both species never make contact. Rabid animals, however, change their behaviour which might make contact possible. At this moment it seems impossible to control this form of rabies completely.

Parassitologia 30: 129-140, 1988

NOUVELLES RECHERCHES SUR LA VACCINATION ORALE DES ANIMAUX SAUVAGES

J. BLANCOU

Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, Laboratoire Rage et Pathologie des Animaux Sauvages, B.P. 9, 54220 Malzéville, France.

Abstract. Successful oral immunization of wildlife against rabies has strongly stimulated research in the past decade. New approaches have been developed for vaccine production (e.g.: use of recombinant vaccines) as well as for better potency or safety testing procedures. It appears that Man should also consider two important phenomena which already existed in nature before his research. The first one is an adaptation of the rabies virus, by serial passages, which favours the spreading of the disease among a sole animal species. Bites of this species vaccinate other species more often than they kill them, leading sometimes, to the mutual exclusion of potential vector. The next phenomenon is the self-control of the first one due to an over-adaptation of the virus to its vector species. It leads to unappropiate level, or delay, of reexcretion of the virus, therefore to the transformation of a rabies epizootics into rabies enzootics. Oral vaccination would thus appear as an useful tool to eradicate the disease after it reached this enzootic stage.

Key-words: rabies, virus, vaccination, adaptation.

INTRODUCTION

Les recherches effectuées depuis 1970 sur la vaccination antirabique des animaux sauvages, aux Etats Unis d'Amérique puis en Europe, ont abouti depuis 1978 à des applications directes sur le territoire européen: Suisse (1978), République Fédérale d'Allemagne (1983), URSS (1984), puis Autriche, Belgique, France, Italie et Luxembourg (1985-86).

Les résultats rapportés par ces pays ont été considérés comme très positifs, en particulier en Suisse, en RFA et en Italie. La rage vulpine a disparu de ce dernier pays depuis 1986. Un tel succès aurait dû, logiquement, aboutir à l'arrêt des recherches dans ce domaine. Or il n'en est rien. De nombreux progrès sont, en effet, apparus comme restant à accomplir, notamment dans les domaines suivants:

1) Amélioration de l'innocuité des vaccins utilisés par voie orale. L'utilisation du vaccin recombinant utilisant la glycoprotéine rabique pure («recombinée» dans le virus de la vaccine) semble une voie très prometteuse à cet égard.
2) Meilleure connaissance des mécanismes et conséquences de l'existence de virus modifiés par l'Homme (= vaccins) ou par la Nature (= variants).

3) Perfectionnement des tests d'efficacité et d'innocuité des vaccins utilisés pour la vaccination par voie orale des animaux sauvages.

Nous résumons ici l'état actuel de nos connaissances dans ces trois domaines.

Vaccins recombinants

Le principe de l'utilisation des méthodes du génie génétique pour produire du vaccin recombinant a été rapporté dans de très nombreuses publications (revue in Koprowski *et al.*, 1985).

Concernant le vaccin recombinant de la rage avec le virus de la vaccine, le détail de sa construction a été publié (Kieny *et al.*, 1984). Son principe consiste à introduire dans le génome du virus vaccinal (souche Copenhague, Thymidine Kinase négatif) l'acide nucléique codant pour la production de la glycoprotéine du virus de la rage (Fig. 1). Le virus vaccinal ainsi modifié devient une véritable mère porteuse de l'antigène rabique vaccinant. Le sur-

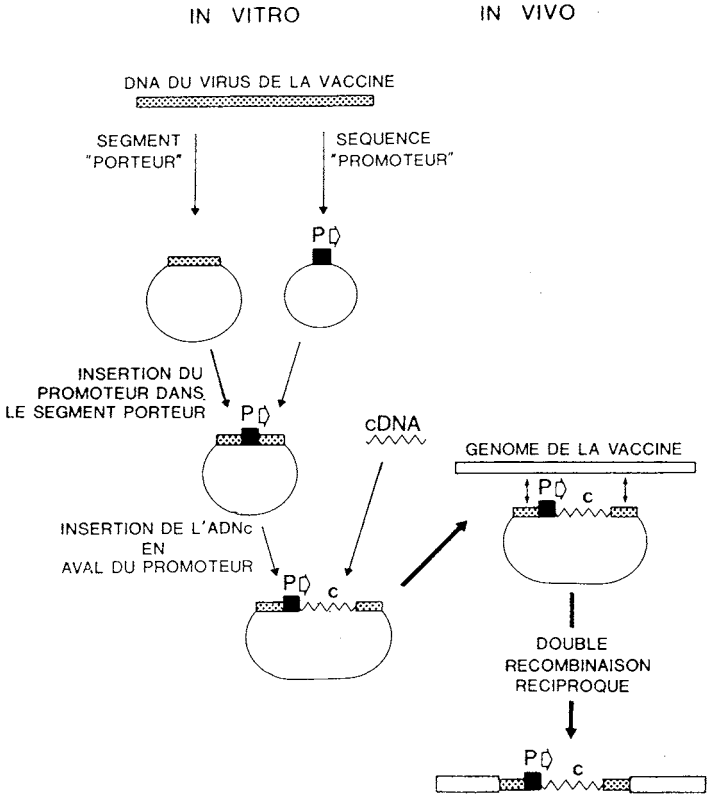


Fig. 1. Schéma de la construction d'un vaccin recombinant vaccine-rage (d'après Kieny *et al.*, 1985).

nageant de la culture de tels virus, sur cellules Vero s'est avéré un produit inoffensif chez toutes les espèces animales auxquelles il a été administré par différentes voies (Tableau 1). Ce surnageant s'est, par ailleurs, révélé, d'un pouvoir immunogène et protecteur au moins équivalent à celui des vaccins vivants modifiés traditionnels (par ex., SAD) chez le Renard roux (Tableau 2).

Un tel vaccin peut donc être considéré actuellement comme candidat à la vaccination orale du Renard, de la Mouffette et du Raton Laveur. A condition que les essais en cours au laboratoire (Belgique, Canada, France et USA) ou sur le terrain (Belgique) confirment la totale innocuité et la bonne efficacité du recombinant sur le terrain, son emploi pourrait être envisagé dans la lutte contre la rage vulpine. D'autres recombinaisons de la glycoprotéine rabique dans d'autres virus (par ex., Adénovirus, Pox virus sauvage de la Mouffette) sont en cours d'étude en Amérique du Nord (revue in Charlton, 1988).

Les virus modifiés par l'homme ou la nature: mécanismes et conséquences

Les mécanismes de la modification du virus rabique, notamment de son pouvoir pathogène, sont restés, très longtemps, mal connus. Ce n'est que depuis l'établissement de la carte génomique complète du virus, et grâce à l'emploi des anticorps monoclonaux, que les bases moléculaires de ces modifications ont été bien définies.

Mais, en pratique, nombre de modifications du virus restent encore inexpliquées au plan fondamental (par ex., celle des souches sauvages circulant d'une espèce animale à l'autre). Nous examinerons successivement ces deux cas.

Les modifications de la souche SAD *

La souche Street Alabama Dufferin (SAD) isolée en 1935 d'un chien enragé de l'Alabama (USA) a subi de multiples passages sur animaux de laboratoire (souris, lapins) avant d'être cultivée sur cellules de reins de chiens, de porcs ou de hamster nouveau-né. C'est sur ce dernier support cellulaire (Baby Hamster Kidney clone 21 = BHK21) ou sur des cellules dérivées clonées, que sont produits les virus actuellement utilisés comme vaccins en Europe. Tous ses passages en série du virus sauvage carnivore primitif lui ont fait perdre pratiquement tout pouvoir pathogène pour le chien (bien qu'il conserve encore une certaine pathogénicité résiduelle, voir *infra*) tout en conservant son pouvoir immunogène. La Suisse et la France ont utilisé le vaccin SAD Standard ou SAD Berne. La RFA, la Belgique, l'Autriche, la France et l'Italie ont

---

* Nous ne rapporterons ici, que les données concernant la souche SAD parce qu'elle est la seule à avoir été employée sur le terrain. Plusieurs autres souches obtenues par culture sur cellules hétérologues (par ex., GSC) ou par sélection en présence d'anticorps monoclonaux (par ex., Av01, TS, TAG) sont encore à l'étude en station (revue in Pépin *et al.*, 1985).

TABLEAU 1 - Innocuité du vaccin recombinant «Vaccine Rage» pour différentes espèces animales. Toutes ces espèces ont parfaitement toléré le vaccin, et n'ont présenté ni lésion locale durable, ni réaction générale. Le vaccin ne s'est pas transmis d'un individu à l'autre (absence de diffusibilité) dans le cas des espèces marquées d'un astérisque *.

Espèces domestiques ou de laboratoire		Espèces sauvages	
Espèce	Voie d'administration	Espèce	Voie d'administration
Bovins	Intradermique, sous cutanée, orale	Renards *	Intradermique, sous-cutanée, orale
Ovins	Orale	Ratons laveurs *	Mêmes voies
Chiens	Sous-cutanée, orale	Mouffettes *	Mêmes voies
Chats	Sous-cutanée, orale	Blaireaux * Sangliers	Voie orale
Lapins	Intradermique, sous-cutanée, intramusculaire, orale	Hérissons, furets, visons	Voie orale
Souris	Intradermique, intra-musculaire, orale	Corneilles, Buses, Faucons	Voie orale

utilisé le vaccin SAD B19. Ces deux virus sont très proches, mais le virus SAD B19 est produit sur un clone de cellules BHK particulier, développé à Tübingen (RFA). Les résultats des tests d'innocuité et d'efficacité de la souche SAD ont été publiés dans de nombreux articles antérieurs (revue in Schneider, 1985). Ils peuvent être ainsi résumés.

a) *Innocuité.* Les deux virus SAD utilisés actuellement sur le terrain en Europe sont pathogènes par voie cérébrale pour pratiquement toutes les espèces animales **. Ils peuvent l'être par d'autres voies parentérales (par ex., sous-cutanée, musculaire) chez certaines espèces (par ex., Chat, Chien, Bovin, Renard) en particulier lorsque ces espèces sont en état d'infériorité immunitaire. Par voie orale, ils restent pathogènes pour certains mustélidés (par ex., Fouine) et pour plusieurs rongeurs (par ex., Campagnols), mais le virus mortel ne peut être qu'exceptionnellement retrouvé dans les glandes salivaires de ces animaux. Aucun cas de transmission permanente de ces virus d'un rongeur à l'autre

** Les virus SAD B19 va (variants obtenus par culture en présence d'anticorps monoclonaux) ne sont plus pathogènes par voie cérébrale pour la souris adulte. Mais ils n'ont pas encore étés utilisés sur le terrain car encore pathogènes pour certaines espèces (Schneider, communication personnelle).

TABLEAU 2 - Efficacité du vaccin recombinant «Vaccine Rage» chez le Renard roux (*Vulpes vulpes*). * UFP = Unités Formant Plages.

Voie d'administration du vaccin	Dose (en UFP *)	Delai entre vaccination et épreuve	Sujets résistants sujets éprouvés
Intradermique	10^8	1 mois	2/2
Sous-cutanée	10^8	1 mois	2/2
Orale directe	10^4	1 mois	1/4
	10^6	1 mois	8/10
	10^7	1 mois	10/10
	10^8	1 mois	10/10
Orale directe	$10^{7,2}$	1 mois	4/4
	$10^{7,2}$	6 mois	4/4
	$10^{7,2}$	18 mois	4/4
Orale en appât	10^8	1 mois	4/5
Néant (témoins)	—	—	0/10

n'a encore été observé ni au laboratoire (après passage en série ou cannibalisme forcé), ni dans la nature.

Plus de 5,7 millions de doses de vaccins SAD ont été utilisées de 1978 à 1987 dans différents pays d'Europe, sans aucun accident confirmé, sauf la mort d'un Chat, d'une Fouine et d'un Renardeau en Suisse (Wandeler, communication personnelle).

b) *Efficacité*. Les vaccins dérivés de la souche SAD ont fait, depuis 1973, la preuve de leur très grande efficacité à la fois en laboratoire, en station et sur le terrain. En résumé, cette efficacité peut être considérée comme de 100% chez des Renards recevant par dépôt direct dans la gueule au moins 10^7 U.F.P. (Unités Formant Plage) de virus. Ce taux d'efficacité peut être légèrement inférieur lorsque le vaccin est administré en appâts (90 à 100%). Sur le terrain on considère que 70 à 75% des renards vivant dans une zone

correctement traitée (15 appâts/km^2) présentent des anticorps rabiques après 1 ou 2 campagnes de vaccination.

Les modifications des souches sauvages

Hors du laboratoire le virus rabique, comme la plupart des agents infectieux, peut subir des mutations naturelles, spontanées. Les mutants (= variants) les plus aptes à réussir des passages en série d'un hôte à l'autre pourraient ensuite être sélectionnés par la pression naturelle du milieu. Selon nos observations expérimentales, cette sélection semble avoir engendré deux phénomènes distincts dans le cas du Renard: celui de «l'adaptation spécifique» d'une part, et celui de «l'adaptation équilibrée» d'autre part.

a) *Le phénomène d'adaptation spécifique.* Le Chien, vecteur ancestral de rage, semble capable de léguer son fardeau à d'autres animaux, principalement carnivores sauvages: renards, chiens viverrins, mouffettes, ratons laveurs, chacals, mangoustes, etc... Ce transfert, réversible, qui a pu passer inaperçu au cours des siècles, est particulièrement spectaculaire depuis quelques décennies. Dans certains cas parce que le chien, vacciné par l'homme, devient inaccessi-

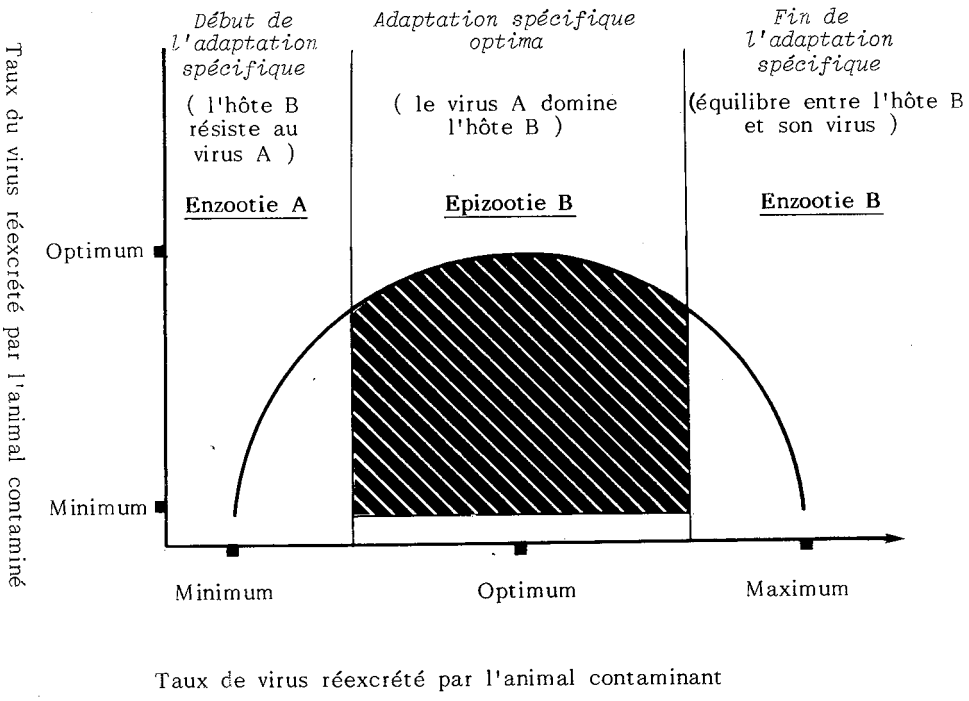


Fig. 2. Schéma théorique du transfert de virus d'un hôte A à un hôte B puis de la relation existante entre le titre en virus rabique réexcrété par l'hôte A contaminant (en abscisses) et le titre de ce même virus réexcrété par l'hôte B contaminé (en ordonnées). Pour un fonctionnement optimum du système hôte-virus, il faut que le titre du virus réexcrété soit moyen. Trop peu de virus réexcrété et l'épizootie en peut débuter, trop de virus réexcrété et elle finit par s'arrêter.

ble au virus. Mais plus souvent, et plus naturellement, parce que le virus peut se désadapter d'une espèce (le chien) pour s'adapter à une autre (par ex., un carnivore sauvage). Car le pouvoir pathogène du virus rabique peut varier très aisément: le changement d'un seul des 505 acides aminés qui constituent sa glycoprotéine suffit à lui faire perdre, ou regagner, sa virulence pour une espèce animale. Et les variants ainsi apparus peuvent alors être sélectionnés (soit au laboratoire, soit naturellement) et tendre à la dominance par passages successifs: une nouvelle hiérarchie de sensibilité est donc établie.

C'est ainsi que L. Pasteur, dès 1885, et en six passages seulement du virus canin sur singes, réussit à créer un vaccin atténué pour le chien et écrit: *«L'application de ces faits met entre nos mains un vaccin contre la rage»*.

Sur le même principe A. Marie en France puis Koprowski en Amérique, créent un second vaccin par adaptation du virus soit au poussin (1902) soit à l'embryon de poule (1948: souche Flury). C'est probablement ainsi que la nature a créé et sélectionné le virus vulpin par passages successifs (morsures) entre renards contaminés à l'origine par un autre vecteur (chien?), de même qu'elle a créé le virus chauve-souris, mouffette, etc....

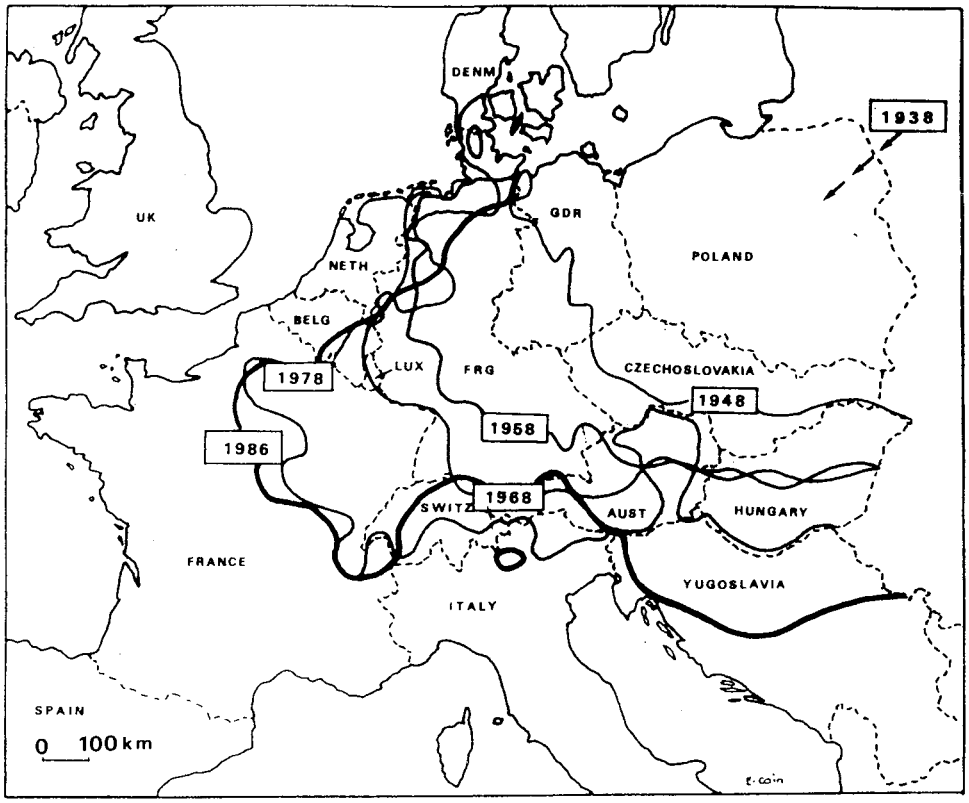


Fig. 3. Evolution de l'épidémie de rage vulpine en Europe de 1938 à 1986.

Mais ces variants rabiques, contrairement à d'autres virus (grippe, fièvre aphteuse, etc...) conservent nombre d'antigènes communs, qui assurent une immunité croisée lors d'inter-contaminations. C'est ainsi que, si le virus canin tue difficilement le renard (et vice versa), il le vaccine contre une infection ultérieure. On peut alors imaginer qu'un variant puisse chasser l'autre, en cas de co-existence sur un même territoire. L'un des vecteurs a alors tendance à exclure progressivement l'autre car, non seulement il *le contamine difficilement, mais encore il le vaccine en le mordant* (Blancou, 1985).

b) *Le phénomène d'adaptation équilibrée*. En phase d'adaption à une espèce animale le virus devient de plus en plus pathogène (voir *supra*): c'est la phase épizootique de la rage. Lorsque cette adaptation dépasse son optimum le virus semble devenir trop pathogène: il tue trop vite, et sans que l'animal enragé puisse réexcréter le virus dans les conditions optimales pour la contamination d'autres sujets (Blancou *et al.*, 1987). La rage cesse d'avancer, ou devient endémique, ou disparaît (Fig. 2). Ce serait le cas de l'Europe lors des épidémies du Jura (1803-1840) ou de l'Europe occidentale (1950-1980) (Fig. 3).

Les tests d'innocuité et d'efficacité

Le principe des tests d'innocuité et d'efficacité d'un vaccin antirabique est très différent selon qu'il s'agit d'un vaccin à virus inactivé ou non. Si ces tests sont relativement standardisés, faciles à mettre en oeuvre et à interpréter dans le permier cas, il n'est est pas le même dans le second.

Les tests concernant les vaccins à virus inactivés *

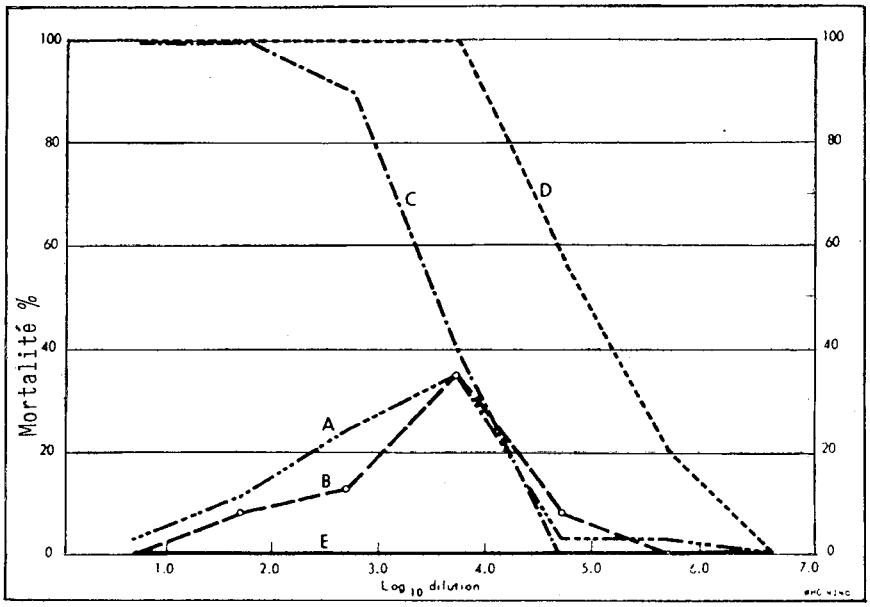
a) *L'innocuité* de ces vaccins est très facile à vérifier, par inoculation intracérébrale à la souris, ou inoculation à des cellules sensibles (par ex., neuroblastomes). Pour plus de sûreté 2 ou 3 passages aveugles peuvent être exécutés, avec vérification de l'absence de réplication virale par épreuve de l'immunofluorescence sur cerveau ou cellules.

b) *L'efficacité* des vaccins à virus inactivé ne devrait plus, actuellement, être vérifiée que par les tests de type National Institutes of Health (NIH) ou Pharmacopée Européenne (P.E.) **. Le principe de ces deux tests consiste à vacciner une fois (test NIH) ou deux fois (test PE) des groupes de 10 souris avec des doses décroissantes de vaccin, puis à les éprouver par une dose constante de la souche Challenge Virus Standard (CVS) mortelle pour les témoins non vaccinés.

---

* Les vaccins à virus inactivé ne sont malheureusement que peu (ou pas du tout) actifs par administration orale au Renard. Nous ne discuterons ici que des vaccins à virus totalement inactivé et non de ceux à virulence résiduelle (type «Fermi»).

** Le test de Habel utilisé à partir de 1940 n'est plus recommandé aujourd'hui. Il consistait à hyperimmuniser des souris (6 injections) puis à comparer la Dose Létale 50% (cérébrale) nécessaire pour les tuer à celle nécessaire pour tuer des souris témoins non vaccinées. L'écart entre ces deux doses devrait être de 1 à 1000 au moins.



A Hamsters C Singes
B Cobayes D Souriceaux
E Chiens, Lapins, Souris

Fig. 4. Sensibilité de différentes espèces animales à un vaccin adapté à l'embryon de poule (souche Flury) inoculé par voie cérébrale (d'après Koprowski *et al.*, 1954).

La DE_{50} (dose efficace protégeant 50% des souris) du vaccin mesure son antigénicité. Cette valeur antigénique (VA) peut être exprimée en unités internationales (UI) si l'on a introduit dans le test un vaccin de référence (étalon) fourni par l'Organisation Mondiale de la Santé ou la Pharmacopée Européenne. Un vaccin doit titrer au moins 1 UI/dose.

Remarque. Un problème nouveau doit cependant être résolu rapidement: celui de la souche d'épreuve des souris. La souche CVS officiellement recommandée semblerait, en effet, favoriser les vaccins produits à partir de cette souche ou de la souche mère (Pasteur, PV) ou de souches filles (Pitmann Moore). Les vaccins produits à partir d'autres souches (Flury, SAD) seraient donc défavorisés du fait qu'elles n'offrent pas une protection croisée totale vis-à-vis de la souche CVS (W.H.O., 1985).

Les tests concernant les vaccins à virus vivants modifiés

a) *L'innocuité* des vaccins vivants est beaucoup plus délicate à vérifier que celle des vaccins à virus inactivé. En effet, ils ont tous une virulence rési-

duelle (en particulier pour les espèces non cibles) et cette virulence est indispensable à leur activité immunogène.

Il faut donc vérifier cette innocuité vis-à-vis du maximum d'espèces animales susceptibles d'être en contact avec le vaccin, et à toutes les doses possibles de ce vaccin. Cette règle découle des observations suivantes.

L'innocuité d'un virus modifié vis-à-vis d'une espèce animale donnée est totalement imprévisible qu'il s'agisse des virus Flury, SAD, Kelev, GSC, Av01,

TABLEAU 3 - Comparaison des pouvoirs pathogènes du virus rabique vulpin inoculé à différentes doses au Renard avant (G S) ou après (G S/C) adaptation de la culture cellulaire (complété de Blancou *et al.*, 1983).

Souches	Dose de virus inoculée par voie musculaire au Renard *	Nombre de sujets morts / Nombre de sujets inoculés	Taux moyen d'anticorps chez les survivants (en Unités Internationales)
G S *a*)	10^{6}	5/5	—
	10^{4}	5/5	—
	10^{2}	5/5	—
	$10^{0,7}$	4/5	0,02
	$10^{-1,4}$	3,5	0,01
	10^{-2}	0/5	néant
G S/C *b*)	$10^{6,6}$	0/5	9,7
	$10^{4,3}$	0/5	13,4
	10^{4}	1/5	41,5
	$10^{2,7}$	4/5	76,4
	$10^{1,4}$	3/5	0,5
Néant (témoins)		0/5	néant

* Exprimée en Dose Létale 50% pour la souris par voie cérébrale. *a*) Glandes salivaires de renards enragés = souche vulpine sauvage. *b*) Glandes salivaires/cellules = souche précédente après 20 passages sur cellules BHK 21.

ect... Il s'est toujours avéré impossible de prédire quelle espèce animale serait plus sensible qu'une autre, et par quelle voie (voir *infra*). Les virus Flury (Low Egg Passage, LEP, en particulier), longtemps considérés comme inoffensifs, sont maintenant interdits chez le chat ou le chien dans certains pays à la suite d'accidents post-vaccinaux. La souche SAD administrée par voie parentérale ou orale peut être mortelle chez plusieurs espèces animales (voir *supra*).

L'innocuité d'un virus modifié ne dépend pas de la dose de virus administré. Ce fait, fondamental, a souvent été oublié ou méconnu. Le tableau 3, qui rapporte les données publiées dès 1954 par H. Koprowski et celles concernant nos expériences avec la souche GSC, l'illustre très bien (Blancou *et al.*, 1983). On constatera, à l'examen de ce dernier tableau, que plus la dose de virus est faible, plus elle est dangereuse. Ce paradoxe est vérifié pour le Renard avec la souche GSC, pour le Hamster ou le Cobaye avec la souche Flury. Mais il ne l'est pas avec le Souriceau ou le Singe: voir *supra* l'imprévisibilité des sensibilités spécifiques.

Ces faits doivent inciter tous les responsables de la vérification de l'innocuité d'un vaccin à virus modifié à le tester à toutes les doses (normale, forte, mais surtout faible), par toutes les voies possibles, et sur le maximum d'espèces animales disponibles.

b) *L'efficacité* des vaccins vivants est généralement testée directement sur l'espèce cible. Une corrélation est alors établie entre le taux de protection assuré par cette vaccination et le titre du virus vaccinal. Par la suite, lors de contrôles lot par lot, seul ce dernier titre sera déterminé *in vivo* (inoculation intracérébrale à la souris) ou *in vitro* (dose infectieuse 50% pour la cellule).

Conclusions

Le développement et les premiers succès de la vaccination orale des animaux saugaves ont stimulé de façon spectaculaire les recherches sur les relations entre immunité antirabique et épidémiologie de la rage.

Mais il apparaît que les interventions artificielles de l'Homme sur le cycle de la rage, par la vaccination des animaux sauvages, doivent tenir compte de phénomènes naturels importants qui existaient avant cette intervention.

Deux de ces phénomènes peuvent en effet interférer avec la prophylaxie médicale: celui de l'adaptation spécifique par passages successifs d'un virus sur une espèce préférentielle, et celui de l'évolution progressive ultérieure de ce virus, vers un état d'équilibre naturel avec son hôte.

Les deux phénomènes tendent à transformer progressivement les caractères de la maladie de l'état épizootique à l'état enzootique. La vaccination orale ne peut qu'accélérer utilement ce phénomène surtout si elle intervient en phase de regression spontanée de l'épizootie.

REFERENCES

BLANCOU J., AUBERT M. F. A., ANDRAL L. (1983). Studies on pathogenic, immunogenic, and protective efficiency of fox rabies virus before and after adaptation to cell culture: application to vaccination against rabies. *Can. J. Microbiol. 29*: 77-83.

BLANCOU J. (1985). La rage animale de Pasteur à nos jours. *Bull. Acad. Vét. Fr. 58*: 455-461.

BLANCOU J., KIENY M. P., LATHE R., LECOCQ J. P., PASTORET P. P., SOULEBOT J. P., DESMETTRE P. (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature 322*: 373-375.

BLANCOU J., AUBERT M. F. A., ARTOIS M., BARRAT J. (1987). Pourquoi la rage ne progresse-t-elle plus en Europe depuis dix ans? *B.E.M.R.A.F.: 17, n. 9.*

CHARLTON K. M. (1988). The pathogenesis of rabies. In: *Rabies* (J. B. Campbell, K. M. Charlton, Eds.) Kluwer Academic Publishers, Boston (in press).

KIENY M. P., LATHE R., DRILLIEN R., SPEHNER D., SKORY S., SCHMITT D., WIKTOR T., KOPROWSKI H., LECOCQ J. P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature 312*: 163-166.

KOPROWSKI H. (1954). Biological modification of rabies virus as a result of its adaptation to chicks and developing chick embryos. *Bull. Wld Hlth Org. 10*: 709-724.

KOPROWSKI H., REAGAN K. J., MACFARLAN R. I., DIETZSCHOLD B., WIKTOR T. J. (1985). New generation of rabies vaccines: rabies glycoprotein gene, recombinants, anti-idiotypic antibodies, and synthetic peptides. In: *Vaccines 85* (R. A. Lerner, R. M. Chamet, F. Brown, Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory.

PEPIN M., BLANCOU J., AUBERT M. F. A., BARRAT J., COULON P., FLAMAND A. (1985). Oral immunization against rabies with an avirulent mutant of the CVS strain: evaluation of its efficacy in fox (*Vulpes vulpes*) and its infectivity in seven other species. *Ann. Inst. Pasteur Virol. 136 E*: 65-73.

SCHNEIDER L. G. (1985). Oral immunization of wildlife against rabies. *Ann. Inst. Pasteur Virol. 136 E*: 161-165.

TOLSON N. D., CHARLTON K. M., STEWART R. B., CAMPBELL J. B., WIKTOR T. J. (1987). Immune response in skunks to vaccinia virus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein. *Can. J. Vet. Res. 51*: 363-366.

W.H.O., Report of a workshop on *NIH potency test for rabies vaccines*. Geneva, 4-6 November 1985, *Doc. VPH/86.63*.

Parassitologia 30: 141-148, 1988

NEW VACCINES FOR IMMUNIZATION OF MAN: NEW APPROACHES TOWARDS THE PREVENTION OF RABIES IN MAN

P. SUREAU

Institut Pasteur, Paris, France.

Abstract. Cell culture rabies vaccines for human use, highly immunogenic and well tolerated, are now used for pre-exposure immunization as well as for post-exposure treatment. Presently available cell culture rabies vaccines induce immunity against the SAD modified live rabies virus used for oral immunization of foxes. They also induce immunity against the newly identified European bat rabies virus (Duvenhage).

Key words: rabies, rabies vaccines, SAD virus, Duvenhage virus.

INTRODUCTION

Although the original human rabies post-exposure vaccination developed by Pasteur in 1885 (Pasteur, 1885) using suspensions of rabbit spinal cord of progressively increasing virulence is no longer used, nerve-tissue vaccines prepared from the partially or completely inactivated brain tissue of adult animals, mainly according to the techniques of Fermi (1908) and Semple (1911) are still produced, for technical or economical reasons, in several developing countries with a resultant high and unacceptable rate of neuro-paralytic accidents due to their high content of myelin. The introduction of the use of suckling animals for nerve-tissue vaccine production, mainly the suckling mouse brain vaccine (SMBV) by Fuenzalida and Palacios some 30 years ago (Fuenzalida and Palacios, 1955) has reduced but not completely eliminated the risk of such reactions, even if the brain suspension is centrifuged in order to reduce the myelin content without affecting the immunogenicity of the vaccine.

Therefore, the WHO Expert Committee on Rabies in its Seventh Report (1984) «supports the trend to limit or abandon completely - when economically and technically possible - the production of such encephalitogenic brain-tissue vaccines, and strongly advocates the production and use of inactivated cell-culture rabies vaccines in both developed and developing countries».

Several types of cell cultures are presently used for rabies vaccine production: primary cell cultures, diploid cell lines of restricted lifetime, continuous heteroploid cell lines (Kieny *et al.*, 1985; Kieny *et al.*, 1987; Roumiantzeff *et al.*, 1985*a*; Sureau, 1987).

Rabies vaccines prepared in primary cell cultures of mammalian origin include the primary hamster kidney cell rabies vaccines produced in Canada (Fenje, 1960), in the USSR (Selimov and Aksenova, 1966) and China (Lin Fang-tao *et al.*, 1983; Lin Fang-tao, *et al.*, 1986); the fetal bovine kidney cell vaccine developed in France by Atanasiu (Atanasiu *et al.*, 1974); the primary dog kidney cell rabies vaccine developed in the Netherlands by Van Wezel (Van Wezel and Van Steenis, 1978).

Rabies vaccines prepared in primary cell cultures of avian origin are produced in Japan with the Flury-HEP strain (Kondo *et al.*, 1974) and in Germany with the Flury-LEP strain (Barth *et al.*, 1984) in chick embryo cell cultures; another vaccine prepared in primary Japanese quail embryo cell cultures, with a fixed rabies virus derived from the Pasteur strain is produced in the USSR (Bektimirova *et al.*, 1983).

The most important progress in the field of cell culture rabies vaccines has been achieved in 1964 by Wiktor *et al.* with the cultivation of the PM strain in the human diploid cell strain Wi-38 (Wiktor *et al.*, 1964). The high immunogenicity of the HDCV has been confirmed in numerous pre- and post-exposure vaccination studies (Bahmanyar *et al.*, 1976). The vaccine is presently produced in MRC-5 diploid cells by Mérieux Institute and widely used in several countries in Europe, Asia, Africa (Roumiantzeff *et al.*, 1985*b*) and in the USA (Winkler, 1985). A similar vaccine is produced in Canada with the CL-77 Canadian strain of fixed virus (Johnson *et al.*, 1985). A non-human primate (fetal rhesus monkey) diploid cell line has recently been used for the preparation of rabies vaccine in the USA (Burgoyne *et al.*, 1985).

But the HDCV, as well as the primary cell culture vaccines if they are most efficient and well tolerated, have still a high cost of production which remains an obstacle to their use on a large scale in the developing countries. In this respect a significant progress has been achieved with the development of the Vero cell rabies vaccine. The use of the continuous heteroploid Vero cell line, cultivated on microcarriers in large bioreactors of several hundred litres capacity, allows now the mass production of a lower cost vaccine highly immunogenic and well tolerated (Fournier *et al.*, 1985; Phanuphak *et al.*, 1987; Suntharasamai *et al.*, 1987; Ubol and Phanuphak, 1986).

Undoubtedly, the introduction of the microcarrier technology for mass production of heteroploid cells (Vero) in large size bioreactors has brought the human rabies vaccine production to the industrial level. This is now the key procedure for low-cost vaccine production in developing countries; and the one which is recommended by the WHO within the framework of its assistance programme for transfer of technology for production of rabies vaccines.

May-be this is not the last word. Since the purification procedures applied to the cell culture vaccines (not only rabies-Vero but also Polio-Vero vaccines), mainly through gradient density zonal centrifugation, allow a reduction of the cellular DNA residue content which is in acceptance with the present minimum requirements of the Committee on Biological Standardization, it is not impossible that continuous cell lines such as the BHK-21 might be

used for human rabies vaccine production in the near future. Such cell lines (or very similar cell lines such as the Nil-2) are currently used for the production of rabies vaccines for animal immunization (Rabiffa, Rabisin). The advantage is that they easily grow in suspension, even without the need of micro-carriers, in large scale industrial reactors. Therefore, large quantities of cell culture rabies vaccine for human use could be obtained at low cost to face the needs of most of the developing countries of the world.

Pre-exposure immunization

Since cell culture purified inactivated innocuous rabies vaccines are now available, pre-exposure immunization may be given to high-risk groups (W.H.O., 1984) such as veterinarians and veterinary students, animal handlers, wildlife officers, and persons working in rabies laboratories for diagnosis or vaccine production.

According to the WHO recommendations «such immunization should preferably consist of 3 injections of rabies vaccine of potency at least 2,5 IU given on days 0, 7, and 28 or on days 0, 28, and 56... further booster injections should be administered at intervals of 1-3 years as long as exposed persons remain at risk» (W.H.O., 1984).

The need for regularly repeated booster doses may be discussed.

On the one hand, a recently published study (Rodrigues *et al.*, 1987) has demonstrated that, in individuals who were given two doses of HDCV at 4 weeks interval plus a booster dose one year later, 79% still possessed neutralizing antibody levels ranging from 0.5 to 10 IU/ml five years after the booster dose, and that after the administration of a single booster dose all of them evoked a good antibody response with antibody levels ranging from 10 to 100 or more IU/ml.

On the other hand, immune complex-like disease with urticaria, macular rash, angio-oedema and arthralgia, has recently been reported in about 10% of veterinary students after a single booster dose of HDCV (Dreesen *et al.*, 1986). According to recently published studies (Swanson *et al.*, 1987; Warrington *et al.*, 1987), such adverse hypersensitivity reactions are due to IgE antibodies developed against beta-propiolactone-modified human serum albumin used as a stabilizer in the vaccine. Therefore, the risks and benefits of booster vaccination have been considered. In an article recently published in the JAMA, K. W. Bernard and collaborators (1987) suggest that «frequent routine booster inoculations may be non productive»; they consider that «once a person has been immunologically sensitized by means of any effective primary rabies vaccination regimen, an anamnestic response to further dose of vaccine is predictable». As a consequence they state that «because of the continuing observation that booster doses of HDCV by any route can lead to systemic allergic reactions in a small percentage of recipients, the routine use of booster immunizations may be inappropriate in persons *not* subject to inapparent exposures to rabies». They conclude, in agreement with the Immunization Prac-

tices Committee recommendations on rabies immunization (M.M.W.R., 1984), that «persons who work with live rabies virus in research laboratories or vaccine production facilities should continue to have rabies antibody titers determined every six months and booster immunization given as necessary to maintain an adequate titer. Laboratory workers doing rabies diagnostic tests and veterinarians and animal care workers in areas where animal rabies is epizootic should have their serum tested every two years and should receive a booster dose if the titer is inadequate. For other persons, such as veterinarians and animal control officers in areas of low rabies endemicity, *primary immunization may be all that is necessary* until an exposure occurs. The need for routine two-year boosters in the latter group appears to be unnecessary and possibly risky».

Immunization against the risk of SAD virus contamination

Another practical point may be raised since oral immunization of foxes with the live modified virus strain SAD is now applied, on a large scale, in most of the European countries: do the currently available cell culture rabies vaccines induce protection against this virus? When the use of SAD virus was envisaged in France we investigated this point: using the RFFIT we tested the neutralizing antibody levels against SAD virus in the sera of subjects vaccinated in our Rabies Vaccination Center with HDCV, with Purified Vero Cell Rabies Vaccine, and with the FBKC vaccine. The titers of neutralizing antibodies against SAD virus were slightly lower than against the CVS virus; nevertheless all the vaccines had protective levels of antibodies.

We may conclude that pre-exposure vaccination affords an efficient protection to the people involved in the oral vaccination of foxes, against any accidental contamination with the SAD virus vaccine (Lafon *et al.*, 1986).

Post-exposure treatment

Cell culture vaccines, concentrated, with a minimum potency of 2.5 IU should be administered, according to the WHO recommendations (W.H.O., 1984), according to the following protocol: «5 doses on days 0, 3, 7, 14 and 30. A booster dose on day 90 in optional». Several modifications of this protocol have been proposed including the use of the multi-site intra-dermal vaccination (Nicholson *et al.*, 1981; Ubol and Phanuphak, 1986; Warrell *et al.*, 1983; Warrell *et al.*, 1984; Warrell *et al.*, 1985).

We have tested and now adopted an abbreviated post-exposure vaccination schedule consisting of 2 intra-muscular injections (one in each deltoid region) of 1 ml on day one, followed by 1 i.m. injection on days 7 and 21 (Vodopija *et al.*, 1986). With all cell culture rabies vaccines commercially available in Europe to-day: Human Diploid Cell Vaccine (HDCV), Purified Chick Embryo Cell (PCEC) vaccine, Purified Vero Cell Vaccine (PVRV) and Fetal Bovine Kidney Cell (FBKC) vaccine, as well as with the Purified Duck Em-

bryo Vaccine (PDEV) we have obtained sero-conversion in 100% of the vaccines by day 14, earlier than with the classical WHO regimen. A further study using the same abbreviated vaccination schedule and the same five vaccines in association with Human Rabies Immune Globulin (HRIG) has shown that protective levels of neutralizing antibodies were obtained in all vaccines by day 14, whereas partial inhibition of the antibody response due to HRIG was observed with three vaccines (PCEC, PVRV and PDEV) but not with HDCV and FBKC (Vodopija *et al.*, 1988).

We believe that this abbreviated post-exposure schedule for post-exposure treatment may be substituted to the classical one. We are currently applying it at the Rabies Vaccination Centers in Zagreb and Paris.

Rabies treatment failures

The new cell culture rabies vaccines are currently considered to be not only well tolerated but also highly immunogenic and protective.

Nevertheless, human rabies cases have been reported in spite of a correct post-exposure treatment with these vaccines. For instance, in Thailand, C. Wasi, P. Thongcharoen and collaborators (P. Thongcharoen, personal communication) have recorded, from November 1980 to April 1987 ten cases of human rabies death after administration of three types of cell culture vaccine, with or without rabies immune glubulin. All cases, seven males and three females, aged 10 to 65 years, had been severely bitten on face, arms and fingers by rabid dogs. Six were treated with HDC vaccine, three with PCEC vaccine and one with purified Vero cell vaccine. The incubation periods ranged from 13 to 51 days.

The association of human rabies immune globulin, as recommended by the WHO Expert Committee on Rabies (W.H.O., 1984) in all cases of major bites, is not always sufficient to prevent such failures. In the thai study four cases had been given equine RIG and one human RIG.

Similar post-exposure treatment failures have been observed in Iran by A. Fayaz (personal communication).

Besides the severity of the exposure, with profound bites involving direct inoculation into peripheral nerves (as with wolf bites in Iran), one has to consider the specially high virulence of some local rabies virus strains such as dog rabies strains in the far east, inducing very short incubation periods. We have personally observed that in Vietnam.

Therefore, some other mean of prevention must be associated to vaccine and serum in cases of severe exposure, when very short incubation periods may be feared: interferon may be the answer.

The introduction of Interferon in post-exposure treatment

This has been done, at the Antirabies station in Zagreb, by I. Vodopija, S. Smerdel and their colleagues (Vodopija *et al.*, 1984) who decided in 1979

to apply a combination of HDC vaccine and interferon in cases where there was a particular great risk of contracting the infection: persons bitten in the head and neck, with severe lacerated wounds or latecomers. They called it the «Zagreb procedure in protection against rabies»: 2,000,000 IU of interferon being applied, at the time of the first vaccine dose, partly around the wounds and the rest by i.m. route (Vodopija *et al.*, 1981). Until February 1983, 186 persons severely bitten by rabid animals have been successfully treated by this method.

In France in June 1981, we have applied interferon, in association with HRIG and HDC vaccine in one case of corneal transplantation. The post-mortem diagnosis of rabies had been made in the donor, the day after the corneal transplant. For logistic reasons (the recipient of the graft had to be evacuated from Morocco to Paris) we could start the administration of INF only on the 3rd day after the graft. The dosage of INF was high: 6,000,000 during the first 24 hours, then 4,000,000 per day for four days. The patient survived (Sureau *et al.*, 1981).

Immunization against European bat rabies

Now that bat rabies is spreading all around Europe, another question is: do the currently available cell culture vaccines induce protection against the Duvenhage-Europe rabies-related virus? We have investigated this point (Lafon *et al.*, 1986). The study was done at the request of the Division of Communicable Diseases, Veterinary Public Health, World Health Organization. The human sera had been collected by Professor I. Vodopija of the Zagreb Institute of Public Health in volunteers vaccinated according to the new abbreviated schedule for post-exposure treatment with the five commercially available rabies vaccines, namely: human diploid cell (PM strain), purified vero rabies (PM strain), purified duck embryo (PM strain), fetal bovine kidney cell (PV strain) and purified chicken embryo cell (Flury-LEP) vaccines. The results indicate that all the vaccines, whatever the vaccine strain or the type of cells used for their production, induced neutralizing antibodies against the Duvenhage european bat virus. In the same study we also demonstrated that Human Rabies Immune Globulins, commercially available in France, contained neutralizing antibodies against this virus. And concluded that «in case of human contamination by a rabid bat in Europe, post-exposure treatment with rabies vaccine and HRIG should be administered according to the WHO recommendations as for contamination by rabid terrestrial mammals». We may add that pre-exposure vaccination against rabies of people involved in the field investigations or laboratory work with bats in Europe should guarantee a solid protection against accidental contamination by the Duvenhage virus.

These were the few practical points about immunization of man against rabies with the new rabies vaccines presently available for human use which I wanted to discuss. The future will tell us if the new approaches towards immunizaton of man, such as the sub-unit vaccines (rabies-immunosomes),

the anti-idiotypes, the synthetic peptides and the vaccinia recombinant vaccine will help us to solve the problems and difficulties which, a hundred years after the Pasteur discovery, we are still facing when trying to protect man from still deadly rabies.

REFERENCES

ATANASIU P., TSIANG H., GAMET A. (1974). Nouveau vaccin antirabique humain de culture cellulaire primaire. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 125 B*: 419-432.

BAHMANYAR M., FAYAZ A., NOUR-SALEHI S., MOHAMMADI M., KOPROWSKI H. (1976). Successful protection of humans exposed to rabies infection. Postexposure treatment with the new human diploid cell rabies vaccine and antirabies serum. *J. Amer. Med. Ass. 236*: 2751-2754.

BARTH R., GRUSCHKAU H., BIJOK U., HILFENHAUS J., HINZ J., MILCKE L., MOSER H., JAEGER O., RONNEBERGER H., WEINMANN E. (1984). A new inactivated tissue culture rabies vaccine for use in man. Evaluation of PCEC-vaccine by laboratory tests. *J. Biol. Stand. 12*: 29-46.

BEKTIMIROVA M. S., PILLE E. R., MATEVOSYAN H. SH., NAGIEVA F. G. (1983). Rabies vaccine prepared from the virus grown in japanese quail embryo cell cultures. *Acta virol. 27*: 59-64.

BERNARD K; W., MALLONEE J., WRIGHT J. C. *et al.* (1987). Preexposure immunization with intradermal human diploid cell rabies vaccinbe. Risks and benefits of primary and booster vaccination. *J. Amer. Med. Ass. 257*: 1059-1063.

BURGOYNE G. H.M KAJIYA K. D., BROWN D. W., MITCHELL J. R. (1985). Rhesus diploid rabies vaccine (adsorbed): a new rabies vaccine using FRhL-2 cells. *J. Infect. Dis. 152*: 204-210.

DREESEN D. W., BARNARD K. W., PARKER R. A. *et al.* (1986). Immune complexlike disease in 23 persons following a booster dose of rabies human diploid cell vaccine. *Vaccine 4*: 45-49.

FENJE P. (1960). A rabies vaccine from hamster kidney tissue cultures: preparation and evaluation in animals. *Can. J. Microbiol. 6*: 605.

FERMI C. (1908). Uber die Immunisierung gegen Wutkrankheit. *Z. Hyg. Infekt. Krankh. 58*: 233-276.

FOURNIER P., MONTAGNON B., VINCENT-FALQUET J. C., AJJAN N., DRUCKER J., ROUMIANTZEFF M. (1985). A new vaccine produced from rabies virus cultivated on Vero cells. In: *Improvements in Rabies Post-Exposure Treatment*. Zagreb Institute of Public Health, Zagreb, pp. 115-121.

FUENZALIDA E., PALACIOS R. (1955). Rabies vaccine prepared from brains of infected suckling mice. *Bol. Inst. Bacteriol. Chile 8*: 3-10.

JOHNSON S. E., PEARSON E. W., ING W. K. (1985). Clinical responses in humans to rabies vaccine prepared in MRC-5 diploid cells from canadian seed virus. In: *Rabies in the Tropics*. Springer-Verlag, New York, pp. 99-105.

KIENY M. P., LATHE R., LEMOINE Y., DRILLIEN R., WIKTOR R. J., KOPROWSKI H., LECOCQ J. P. (1985). Rage et Gènie Gènètique: dèveloppêment de nouveaux vaccins. *Ann. Inst. Pasteur. 136 E*: 391-403.

KIENY M. P., DESMETTRE P., SOULEBOT J. P., LATHE R. (1987). Rabies vaccine: traditional and novel approaches. *Prog. Vet. Microbiol. Immun. 3*: 73-111.

KONDO A., TAKASHIMA Y., SUZUKI M. (1974). Inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin. *Symp. Series Immunobiol. Stand., Vol. 21*, Karger, Basel, pp. 182-189.

LAFON M., HERZOG M., SUREAU P. (1986). Human rabies vaccines induce neutralizing antibodies against the european bat rabies virus (Duvenhage). *Lancet 2*: 515.

LIN FANG-TAO, ZENG FANZHEN, LU LONGMU, LU XIAOZHEN, ZEN RONGFANG, YU YONGXIN, CHEM NAIMIN (1983). The primary hamster kidney cell rabies vaccine: adaptation of viral strain, production of vaccine, and pre- and postexposure treatment. *J. Infect. Dis. 147*: 467-473.

LIN FANG-TAO *et. al* (1986). Study of the protective effect of the primary hamster kidney cell rabies vaccine. *J. Infect. Dis. 154*: 1047-1048.

MMWR (1984). Adult Immunization. *Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee 33*: 26-28.

NICHOLSON K. G., PRESTAGE H. *et al.* (1981). Multisite intradermal antirabies vaccination. *Lancet 2*: 915-917.

PASTEUR L. (1885). Methode pour prévenir la rage après morsure. *C.R. Acad. Sci. Paris 101*: 765-773.

PHANUPHAK P., KHAWPLOD P. *et al.* (1987). Humoral and cell-mediated immune responses to various economical regimens of purified vero cell rabies vaccine. *Asian Pacific J. Allergy Immunol. 5*: 33-37.

RODRIGUES F. M., MANDKE V. B., ROUMIANTZEFF M. *et al.* (1987). Persistence of rabies antibody

5 years after pre-exposure prophylaxis with human diploid cell antirabies vaccine and antibody response to a single booster dose. *Epidem. Inf. 99*: 91-95.

ROUMIANTZEFF M., AJJAN N., MONTAGNON B., VINCENT-FALQUET J. C. (1985*a*). Rabies vaccines produced in cell culture. *Ann. Inst. Pasteur 136 E*: 413-424.

ROUMIANTZEFF M., MONTAGNON B., VINCENT-FALQUET J. C., BUSSY L., CHARBONNIER C. (1985*b*). Rapport sur l'utilisation du vaccin rabique préparé sur cultures de cellules diploides humaines pour l'immunisation avant et après exposition. In: *Rabies in the Tropics*. Springer-Verlag, New York, pp. 92-98.

SELIMOV M. A., AKSENOVA T. A. (1966). Tissue culture antirabic vaccine for human use. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand., Vol. 1*, Karger, Basel, pp. 377-378.

SEMPLE D. (1911). The preparation of a safe and efficient antirabic vaccine. *Sci. Mem. Med. Sanit. Dep. India Govt India Bull. Inst. Pasteur 9*: 701.

SUNTHARASAMAI P., WARRELL M. J., WARRELL D. A. *et al.* (1987). Early antibody responses to rabies post-exposure vaccine regimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg. 36*: 160-165.

SUREAU P., PORTNOI D., ROLLIN P. *et al.* (1981). Prévention de la transmission inter-humaine de la rage après greffe de cornée, *C.R. Acad. Sci. Paris 293*: 689-692.

SUREAU P. (1987). Rabies vaccine production in animal cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 34*: 111-128.

SVETLICIC M., VODOPIJA I., SMERDEL S., LJUBICIC M., BAKLAIC Z., VINCENT-FALQUET J. C., POURADIER-DUTEIL X., ZAYET-BACHELET M. (1985). Compatibility and immunogenicity of Merieux's purified Vero rabies vaccine (PVRV) in healthy subjects. In: *Improvements in Rabies post-exposure treatment*. Zagreb Institute of Public Health, Zagreb, pp. 123-127.

SWANSON M. C., ROSANOFF E., GURWITH M. *et al.*, IgE and IgG antibodies to beta-propiolactone and human serum albumin associated with urticarial reactions to rabies vaccine. *J. Infect. Dis. 155*: 909-913.

UBOL S., PHANUPHAK P. (1986). An effective encomical intradermal regimen of human diploid cell rabies vaccination for post-exposure treatment. *Clin. exp. Immunol. 63*: 491-497.

VAN WEZEL A. L., VAN STEENIS G. (1978). Production of an inactivated rabies vaccine in primary dog kidney cells. *Dev. Biol. Stand., Vol. 40*, Karger, Basel, pp. 69-75.

VODOPIJA I., SMERDEL S. *et al.* (1981). Treatment of persons exposed to rabies with human diploid cell strain rabies vaccine and human Interferon. In: *The Biology of the Interferon System*. Elsevier/North Holland Biomedical Press.

VODOPIJA I., SMERDEL S. *et al.* (1984). 65 years of experience and innovation in protection against rabies: antirabies station (former Pasteur Institute) in Zagreb 1981-1983. *Behring Inst. Mitt. 76*: 165-173.

VODOPIJA I., SUREAU P., LAFON M., BAKLAIN Z., LJUBICIC M., SVETLICIC M., SMERDEL S. (1986). An evaluation of second generation tissue culture rabies vaccines for use in man: a four vaccine comparative immunogenicity study using a pre-exposure vaccination schedule and an abbreviated 2-1-1 post-exposure schedule. *Vaccine 4*: 245-248.

VODOPIJA I., SUREAU P., SMERDEL S., LAFON M., BAKLAIC Z., LJUBICIC M., SVJETLICIC M. (1988). Interaction of rabies vaccine with human rabies immunoglobulin and reliability of a 2-1-1 schedule application for post-exposure treatment. *Vaccine 6* (in press).

WARRELL M. J., WARRELL D. A. *et al.* (1983). An economical regimen of human diploid cell strain anti-rabies vaccine for postexposure prophylaxis. *Lancet 2*: 301-304.

WARRELL M. J., SUNTHARASAMAI P. *et al.* (1984). Multi-site intradermal and multi-site subcutaneous rabies vaccination: improved economical regimens. *Lancet 1*: 874-876.

WARRELL M. J., NICHOLSON K. G. *et al.* (1985). Economical multiple-site intradermal immunization with human diploid cell strain vaccine is effective for post-exposure rabies prophylaxis. *Lancet 1*: 1059-1062.

WARRINGTON R. J., MARTENS C. J., RUBIN M. *et al.* (1987). Immunologic studies in subjects with a serum sickness-like illness after immunization with human diploid cell rabies vaccine. *J. Allergy Clin. Immunol. 79*: 605-610.

WINKLER G. (1985). Current status of use of human diploid cell strain rabies vaccine in the U.S. In: *Improvements in Rabies post-exposure Treatment*. Zagreb Institute of Public Health, Zagreb, pp. 3-8.

W.H.O., EXPERT COMMITTEE ON RABIES (1984). Seventh Report. *Wld Hlth Org. Tech. Rep. Series 709*, Geneva.

WIKTOR T. J., FERNANDES M. V., KOPROWSKI H. (1964). Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain W.I. 38. *J. Immunol. 93*: 353-356.

Parassitologia 30: 149-154, 1988

EXPERIENCE DE VACCINATION ANTIRABIQUE DU RENARD PAR VOIE ORALE COORDONNEE ENTRE PLUSIEURS PAYS EUROPEENS ET PERSPECTIVES D'UTILISATION DU VIRUS RECOMBINANT VACCINE-RAGE

P.-P. PASTORET [1], J. BLANCOU [2], B. BROCHIER [1], I. THOMAS [1], A. PAQUOT [1], J. DEBRUYN [1], F. COSTY [1], F. WOLFF [3], M. P. KIENY [4], B. LANGUET [5], J. P. LECOCQ [4], PH. DESMETTRE [5]

[1] *Fo.Re.Ra., Département de Virologie-Immunologie et Pathologie des maladies virales, Faculté de Médecine vétérinaire, U.Lg., 45 Rue des Vétérinaires, B-1070 Bruxelles, Belgique;* [2] *Centre National d'Etudes sur la Rage et la Pathologie des animaux sauvages, B.P. 9, F-54220 Malzéville, France;* [3] *Laboratoire de Médecine vétérinaire de l'Etat, 54 Avenue Gaston Diderich, L-1420 Luxembourg, grand-duché de Luxembourg;* [4] *Transgène S.A., 11 Rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg, France;* [5] *Rhône-Mérieux, Laboratoire IFFA, B.P. 7009, 254 Rue Marcel Mérieux, F-69342 Lyon Cedex 07, France.*

Abstract. Campaigns of fox vaccination against rabies were carried out in Belgium, grand-duchy of Luxembourg and France in September 1986, June and September 1987. The SAD B19 attenuated strain of rabies virus, contained in baits (Tübingen baits) was used as vaccine. Baits were distributed at a range density of 11 to 15 baits per km^2. First results are very encouraging. A recombinant vaccinia virus harbouring the rabies virus glycoprotein gene has been developed. This recombinant virus can be given to the fox by the oral route and protects it against rabies virus challenge; it is also innocuous for the fox and other non-target European species. A first trial of fox vaccination against rabies using this recombinant vaccinia-rabies virus has been carried out in Belgium, on a military domain, in October 1987.

Key words: rabies, fox vaccination, recombinant vaccinia-rabies virus.

INTRODUCTION

En tant que méthode de lutte contre la rage sylvatique, la vaccination antirabique du renard a été envisagée depuis plus de 25 ans (Baer, 1975) et a été mise au point en station expérimentale (Blancou *et al.*, 1985; Blancou *et al.*, 1986). Depuis 1978, les essais sur le terrain initiés par le Professeur Steck et effectués en Suisse ont permis d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de la souche atténuée SAD du virus rabique. La progression de la rage a pu être arrêtée et des foyers ont pu être éteints; une surveillance rigoureuse n'a pas pu mettre en évidence d'effets secondaires indésirables et les tentatives d'isolement du virus vaccinal chez les micromammifères ont toujours échoué (Steck *et al.*, 1982).

Les campagnes de vaccination menées de 1983 à 1986 en République Fédérale d'Allemagne ont montré que le vaccin développé par le laboratoire fédéral de Tübingen (souche SAD B19 du virus rabique) répondait également aux exigences d'une vaccination menée dans la nature.

En 1986, les campagnes de vaccination ont couvert plus de 20% du territoire de l'Allemagne de l'Ouest. Des campagnes similaires ont été entreprises en Italie en 1984 et 1985 avec la même souche que celle utilisée en République Fédérale d'Allemagne.

Une réunion tenue en Novembre 1985 dans les locaux de la Commission des Communautés Européennes a permis de mettre sur pied un projet européen de vaccination antirabique du renard.

Coordination des campagnes

En 1985, le Département de Virologie-Immunologie et Pathologie des maladies virales de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège a constitué avec le Service de la Rage de l'Institut Pasteur du Brabant à Bruxelles, une A.S.B.L. (Association Sans But Lucratif) intitulée Fo.Re.Ra. (Fonds pour la Recherche contre la Rage) (Pastoret *et al.,* 1987). Le Fo.Re.Ra. a coordonné le projet de vaccination commun à la Belgique, à la France, à l'Allemagne et au grand-duché de Luxembourg, en étroite collaboration avec les autorités compétentes, le Centre de Tübingen et selon les directives formulées par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.).

La réalisation de ce projet a impliqué une collaboration étroite entre, d'une part, des organisations nationales comme le Fonds pour la Recherche contre la Rage, le Centre National d'Etudes sur la Rage et la Pathologie des animaux sauvages (France, sous la direction des Services vétérinaires nationaux et en collaboration avec l'Entente interdépartementale de lutte contre la Rage), l'Administration des Services vétérinaires du grand-duché de Luxembourg avec ses divisions de l'Inspection vétérinaire et du laboratoire de Médecine vétérinaire et le Centre de surveillance et de recherche sur la rage à Tübingen, sous les auspices de l'O.M.S.

Ainsi, une première campagne de vaccination, menée à titre expérimental, a-t-elle eu lieu en septembre-octobre 1986 au grand-duché de Luxembourg, en Belgique et en France. Deux autres campagnes ont été réalisées en Juin et en Septembre 1987. Ces périodes de l'année ont été choisies pour des raisons biologiques, climatologiques et cynégétiques (sortie du terrier et dispersion des renardeaux, température optimale pour la stabilité de l'enrobage graisseux de l'appât et la stabilité du vaccin). Les opérations menées en 1986 ont couvert l'ensemble du territoire grand-ducal (2586 km^2) ainsi que les régions limitrophes situées en Belgique (1900 km^2) et en France (720 km^2), ce qui représente une superficie totale de 5206 km^2. En Belgique et en France, la vaccination a donc été effectuée en zone frontalière sur une profondeur de 15 à 25 km en vue de constituer une ceinture immunitaire

(incomplète) autour du grand-duché de Luxembourg. Environ quinze appâts/km^2 ont été répartis sur le terrain.

Cette première campagne menée en 1986 a été suivie de deux autres, l'une menée en Juin 1987, l'autre en septembre. En juin 1987, les mêmes zones que celles de 1986 ont été vaccinées. En septembre, la zone de vaccination a été étendue en Belgique vers le nord, de façon à rejoindre la frontière allemande et de ceinturer complètement le grand-duché de Luxembourg, car des campagnes de vaccination similaires ont été organisées en Allemagne le long des frontières grand-ducale et belge à la même époque.

Organisation des campagnes au niveau national

Grand-duché de Luxembourg

Avec une superficie n'atteignant pas 2600 km^2 et dont les trois cinquièmes se trouvent à une distance inférieure à 10 km d'une frontière, le grand-duché de Luxembourg risquait en permanence une réintroduction de la rage à partir des régions voisines si elles n'étaient pas vaccinées. La réussite des opérations sur le territoire présupposait que des campagnes similaires soient organisées simultanément dans les régions frontalières des pays voisins. Le financement de la campagne a été entièrement assuré par des moyens budgétaires provenant du Ministère de l'Agriculture et l'organisation a été placée sous la responsabilité directe des Services vétérinaires et des Eaux et Forêts. La distribution des appâts a été intégralement confiée aux locataires des lots de chasse dont la motivation et l'engagement ont été exemplaires.

Belgique

La campagne de vaccination a été soutenue par les ministères nationaux et régionaux ayant l'Agriculture dans leurs attributions. La campagne a été organisée et exécutée par le Fo.Re.Ra. avec le concours des services de l'inspection vétérinaire, des agents de l'administration des eaux et forêts et des chasseurs.

France

Les campagnes de vaccination ont été réalisées entièrement aux frais de l'Etat, sur le budget du Ministère de l'Agriculture. La distribution des appâts sur le terrain a été effectuée par les gardes de l'Office National de la chasse, des gardes de l'Office national des Forêts, le personnel des services vétérinaires et des chasseurs volontaires. La responsabilité de la surveillance technique des opérations et des prélèvements de contrôle était confiée au Centre National d'Etudes sur la Rage et la pathologie des animaux sauvages. L'Entente interdépartementale de lutte contre la Rage a également collaboré à la préparation et à l'organisation de la campagne, en étroite liaison avec l'Office National de la Chasse et l'Office National des Forêts.

République Fédérale d'Allemagne

Lorsque l'Allemagne a participé aux opérations menées dans les pays frontaliers (Septembre 1987), son organisation était similaire à celle adoptée pour les autres zones vaccinées sur le territoire.

Résultats des premières campagnes

Les résultats préliminaires obtenus après la première campagne coordonnée de vaccination ont été publiés séparément (Frisch *et al.*, 1987; Artois *et al.*, 1987; Brochier *et al.* , 1987; Kalpers *et al.*, 1987) et font l'objet d'une autre publication du même volume pour ce qui concerne la Belgique (Hallet, 1988). La totalité des résultats des campagnes menées en 1987 ne sont pas encore disponibles mais sont d'ores et déjà extrêmement encourageants. La rage est en nette régression au grand-duché de Luxembourg et dans la zone vaccinée de Belgique.

Le virus recombinant vaccine-rage

Le virus de la vaccine, utilisé dans la lutte contre la variole, a permis son éradication.

Dès 1982, grâce aux techniques d'ingénierie génétique, les groupes de Paoletti à New York (Panicali *et al.*, 1982) et de Moss au NIH (Smith *et al.*, 1983) ont démontré qu'il était possible d'intégrer, dans le génome du virus de la vaccine, un gène étranger fonctionnel (Lecocq et Kieny, 1985). Le génome du virus de la vaccine est en effet du DNA bicaténaire de grande taille (180 kb) dont la réplication est cytoplasmique; cette dernière propriété permet d'intégrer dans le génome du virus des cDNA fonctionnels sans avoir à y ajouter des introns. Cette technique a été appliquée pour insérer le cDNA de gène codant pour la glycoprotéine du virus de la rage au niveau du gène codant pour la thymidine kinase du virus de la vaccine. Un virus recombinant de la vaccine exprimant la glycoprotéine rabique a été sélectionné (Kieny *et al.*, 1984) et ses propriétés immunogènes ont été étudiées (Kieny *et al.*, 1984; Wiktor *et al.*, 1984). On a ainsi rapidement pu démontrer que des animaux de laboratoire auxquels du virus recombinant avait été administré présentaient, après 14 jours, un taux élevé d'anticorps spécifiques de la glycoprotéine rabique et étaient protégés contre une inoculation d'épreuve réalisée à l'aide d'une souche sauvage du virus rabique.

Ce vaccin a été utilisé chez le renard, par voie orale, et s'est révélé extrêmement efficace et parfaitement inoffensif (Blancou *et al.*, 1986). Il est également efficace chez le renardeau (Brochier *et al.*, 1988, accepté pour publication) et parfaitement inoffensif pour les espèces non-cibles testées jusqu'à présent, dont le sanglier (*Sus scrofa*) et le blaireau (*Meles meles*) (Pastoret et Brochier, 1987). En outre il ne se transmet pas entre les animaux.

Le virus recombinant offre donc, contrairement aux souches atténuées utilisées jusqu'à présent, l'avantage d'une totale innocuité; il est en outre d'une grande stabilité.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE DE VACCINATION ANTIRABIQUE DU RENARD PAR VOIE ORALE, DANS LA NATURE, À L'AIDE DU VIRUS RECOMBINANT VACCINE-RAGE

Le virus recombinant vaccine-rage s'étant montré extrêmement efficace tout en étant parfaitement inoffensif tant pour l'espèce-cible (renard) que pour les espèces non-cibles, une première expérience de vaccination antirabique du renard, par voie orale, a été menée sur le terrain, en Belgique, à l'aide du virus recombinant. Cette expérience s'est déroulée sur le terrain militaire de Marche (Province de Luxembourg), à l'abri du public, dans une zone d'enzootie rabique, les 24 et 25 octobre 1987.

REFERENCES

ARTOIS M., CHILLAUD R., MAILLOT E., RIGAL P., BLANCOU J. (1987). Première campagne de vaccination antirabique du renard par voie orale menée en France. Contrôles d'efficacité chez le renard et d'innocuité chez les micromammifères. *Ann. Méd. Vét. 131*: 457-462.

BAER G. M. (1975). Wildlife vaccination. In: *The Natural History of Rabies, volume 2.* (G. M. Baer. Ed.). Academic Press, New York, pp. 261.

BLANCOU J., KIENY M. P., LATHE R., LECOCQ J. P., PASTORET P. P., SOULEBOT J. P., DESMETTRE P. (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature 322*: 373.

BLANCOU J., SCHNEIDER L. G., WANDELER A. I., PASTORET P. P. (1985). Vaccination du renard roux (*Vulpes vulpes* L.) contre la rage par voie orale. Bilan d'essais en station expérimentale. *Rev. Ecol. (Terre Vie) 40: 249.*

BROCHIER B., IOKEM A., GINTER A., LEJEUNE E., COSTY F., MARCHAL A., PEHARPRE D., COUVREUR J. M., DUFEY F., KALPERS J., LEONARD M., BAUDUIN B., DESMECHT M., SCHNEIDER L. G., PASTORET P. P. (1987). Première campagne de vaccination antirabique du renard par voie orale menée en Belgique. Contrôles d'efficacité et d'innocuité chez le renard roux (*Vulpes vulpes* L.). *Ann. Méd. Vét. 131*: 463-472.

BROCHIER B., LANGUET B., BLANCOU J., KIENY M. P., LECOCQ J. P., COSTY F., DESMETTRE PH., PASTORET P. P. (1987). Use of recombinant vaccinia-rabies virus for oral vaccination of fox cubs (*Vulpes vulpes*) against rabies. *Vet. Microbiol.* (in press).

FRISCH R., WOLFF F., KRIER A., BROCHIER B., SCHNEIDER L. G. (1987). Première campagne de vaccination du renard par voie orale menée au grand-duché de Luxembourg. Contrôles d'efficacité chez le renard roux (*Vulpes vulpes* L.). *Ann. Méd. Vét. 131*: 449-456.

HALLET L. (1988). Lutte contre la rage vulpine en Belgique: première campagne de vaccination des renards par voie orale. *Parassitologia 30*: 00-00.

KALPERS J., BROCHIER B., LEJEUNE E., QUIROGA FERNANDEZ S., KABEMBA M., BAUDUIN B., LÉONARD M., PASTORET P. P. (1987). Première campagne de vaccination antirabique du renard par voie orale menée en Belgique. Contrôles d'innocuité chez les rongeurs et insectivores. *Ann. Méd. Vét. 131*: 473-478.

KIENY M. P., LATHE R., DRILLIEN R., SPEHNER D., SKORY S., SCHMITT D., WIKTOR T., KOPROWSKI H., LECOCQ J. P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature 312*: 163.

LECOCQ J. P., KIENY M. P. (1985). La biologie moléculaire du virus rabique. *Ann. Méd. Vét. 129*: 249-261.

PANICALI D., PAOLETTI E. (1982). Construction of pox viruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from HSV into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USa 79*: 4927.

PASTORET P. P., FRISCH R., BLANCOU J., WOLFF F., BROCHIER B., SCHNEIDER L. G. (1987). Campagne internationale de vaccination antirabique du renard par voie orale menée au grand-duché de Luxembourg, en Belgique et en France. *Ann. Méd. Vét. 131*: 441-447.

PASTORET P. P., BROCHIER B. (1987). La vaccination antirabique du renard par voie orale. *Rev. Méd. Brux. 8*: 246-249.

SMITH G., MACKETT M., MOSS B. (1983). Infectious vaccinia virus recombinants that express HBV surface antigen. *Nature 302*: 490.

STECK F., WANDELER A., BICHSEL P., CAPT S., SCHNEIDER L. G. (1982). Oral immunization of foxes against rabies. A field study. *Zbl. Vet. Med. 29*: 372.

WIKTOR T., MCFARLAN R., REAGAN K., DIETZSCHOLD D., CURTIS P., WUNNER W., KIENY M. P., LATHE R., LECOCQ J. P., MACKETT M., MOSS B., KOPROWSKI H. (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus glycoprotein gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA 81*: 7194.

CELEBRAZIONE DEL CENTENARIO DELL'ISTITUTO PASTEUR

(Sirmione, 20 ottobre 1987 - Roma, 16 novembre 1987)

B. FANTINI - Il primo centenario della fondazione dell'Institut Pasteur di Parigi 157

D. BOVET - Intervento per il centenario dell'Istituto Pasteur di Parigi all'Università di Roma «La Sapienza» 163

E. BIOCCA - Il centenario dell'Istituto Pasteur di Parigi e l'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti dell'Università di Roma «La Sapienza» . . 165

A. RUBERTI - Il centenario dell'Istituto Pasteur di Parigi all'Università «La Sapienza» di Roma 171

L. FRONTALI - L'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti dell'Università di Roma «La Sapienza» 175

Parassitologia 30: 157-162, 1988

IL PRIMO CENTENARIO DELLA FONDAZIONE DELL'INSTITUT PASTEUR DI PARIGI

B. FANTINI

Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma «La Sapienza».

Abstract. The first centennial of the Pasteur Institute in Paris is celebrated with an evaluation of its historical and present role. Pasteur's successful treatment of rabies, notwithstanding the difficulties he encountered in establishing his methods, allowed him to create an independent institution finalized to struggle infectious diseases. The peculiarities of this institution, which make it unique, and the validity of its scientific tradition are examined, as well as the role played as model for research institutions around the world. The constant relationships between research, teaching and clinical activities are emphasized.

Key words: Pasteur, history, institutions, rabies.

Con un convegno internazionale sul tema «Biologia molecolare e malattie infettive», dal 5 al 9 ottobre, alla presenza del capo dello stato François Mitterand, l'Institut Pasteur di Parigi ha celebrato il primo centenario della sua fondazione.

Ricordiamo questo centenario significativamente in questa sede perché l'Institut Pasteur fu fondato sullo slancio scientifico e anche emotivo suscitato dal successo della prima vaccinazione antirabbica, realizzata da Louis Pasteur nel 1885. I centenari sono per noi storici della scienza e della medicina fonti di occasioni, di stimoli ma anche di preoccupazioni. L'interesse per una determinata data che ricorda un uomo, una istituzione o una scoperta è, come in questo caso, centro di attenzione larga e suscita una vasta risonanza negli organi di stampa e nei commenti generali. Le nostre preoccupazioni sono dovute alla constatazione che queste occasioni si traducono troppo spesso in momenti celebrativi e talvolta autocelebrativi che nascondono anziché richiamare e chiarire la realtà storica nella sua specificità, nelle sue contraddizioni e nelle difficoltà del suo cammino. Si celebrano i successi e si corre il rischio di nascondere le difficoltà che essi hanno avuto per realizzarsi o hanno incontrato per diffondersi, gli errori e le sottovalutazioni che li hanno accompagnati. Fortunatamente nel caso del centenario dell'Institut Pasteur preoccupazioni di questo tipo non hanno ragione di esistere per due principali ragioni: la prima è che l'Institut Pasteur ha approfittato del centenario per mettere in piedi iniziative importanti nel campo della storia della scienza, come la

costituzione del «Service des Archives» — base di lavoro di tutta la ricerca storica e a cui ho avuto l'onore di partecipare personalmente — e come l'organizzazione di un convegno storico che si terrà nel giugno nel prossimo anno, dedicato alla ricostruzione degli aspetti scientifici e istituzionali della storia dell'istituto.

La seconda ragione riguarda la specificità dell'istituzione che viene celebrata. Si può infatti affermare che l'Istitut Pasteur è unico e per molti versi atipico, per la sua storia, per le sue caratteristiche organizzative ed istituzionali, per la ricchezza di lavori che sono stati realizzati in esso e soprattutto per la concentrazione straordinaria di uomini e di scoperte che si sono succedute all'interno delle sue mura e dei suoi laboratori. Come ha scritto André Lwoff «ogni scoperta scientifica è improbabile ma una serie di scoperte è più improbabile ancora». Ci si deve quindi interrogare storicamente e criticamente sulle ragioni di tale specificità e della realizzazione di una improbabilità così elevata.

Il 26 ottobre del 1885, in una conferenza alla Académie des Sciences sul trattamento effettuato il 6 luglio precedente su un ragazzo alsaziano, Joseph Meister, Pasteur rivelò i risultati positivi della prima vaccinazione antirabbica. In questa stessa occasione Vulpian sostenne la necessità di organizzare un servizio per il trattamento della rabbia. Subito dopo queste prime esperienze, la speranza di una guarigione o il semplice timore di incorrere nella terribile malattia spinsero un notevole flusso di persone, morse da cani sospettati di essere rabbiosi, nei locali dell'Ecole Normale, dove un medico, sotto il controllo di Pasteur, realizzava le vaccinazioni. Questo flusso era piuttosto malvisto dalla comunità medica che non riteneva il procedimento messo a punto da Pasteur sufficientemente sicuro e sicuramente efficace. Per di più tale procedimento era basato su teorie che non coincidevano con la teoria medica diffusa nell'ambiente medico ufficiale. Anche per la coscienza dei problemi disciplinari legati a questo sviluppo e delle difficoltà che avrebbe incontrato nelle strutture mediche, in Pasteur stesso si fa man mano strada l'idea di un istituto specializzato, costruito senza far ricorso al finanziamento statale, ma grazie ad una sottoscrizione pubblica.

Il 1° marzo del 1886 Pasteur, ancora in una seduta dell'Académie des Sciences, sede usata spesso come amplificatore delle sue scoperte e delle sue idee, espose «i risultati delle applicazioni del metodo per prevenire la rabbia dopo il morso», riferendo sul successo ottenuto in 350 trattamenti, senza tuttavia specificare, si deve aggiungere, il numero complessivo dei trattamenti che erano stati effettuati e gli insuccessi, né per quanti di questi la diagnosi di rabbia poteva essere considerata sicura. In questo intervento Pasteur sottolineava che la profilassi della rabbia era ormai fondata e era necessario creare un istituto di vaccinazione. Secondo una ricostruzione standard, questo desiderio venne accettato unanimemente, ma in realtà vi furono forti dubbi e perplessità. I risultati ottenuti da Pasteur non erano tutti positivi ed anzi in alcuni casi si era avuto il sospetto che vi fossero state delle infezioni provocate dalla vaccinazione stessa, con qualche decesso dei malati trattati. L'idea di una sottoscrizione nazionale ed internazionale per costruire un istituto,

al di fuori dell'università e dell'istituzione scientifica tradizionale, era una metodologia del tutto inusuale; essa cercava di utilizzare al massimo l'ondata emotiva provocata nel largo pubblico dal successo della vaccinazione. Subito dopo la proposta da parte di Pasteur, l'Académie des Sciences nominò una commissione per gestire la sottoscrizione e le offerte — anche grazie al largo sostegno della stampa — cominciarono ad arrivare numerose, molto diverse tra loro per provenienza e quantità: si andava dal singolo franco di un gendarme o al mezzo franco di un bracconiere, ai quarantatremila franchi raccolti da un giornale alsaziano, sino ai contributi di mille franchi dell'Imperatore del Brasile e di novantasettemila franchi dell'Imperatore di Russia. Il Parlamento francese, su proposta del Governo, approvò una sovvenzione di 200.000 franchi. Lanciata il 12 marzo del 1886 ad aprile la sottoscrizione aveva già raggiunto i cinquecentomila franchi, in dicembre un milione ottocentomila franchi, per superare i due milioni di franchi oro alla fine del 1887.

Molte difficoltà ci furono per reperire il terreno su cui costruire l'istituto. Pasteur chiese l'uso gratuito di un terreno pubblico al Consiglio municipale di Parigi ma ci furono molte opposizioni e alla fine il comitato della sottoscrizione decise l'acquisto di un terreno nel quartiere di Vaugirard, dove si trova ancora oggi l'Institut Pasteur. La costruzione fu rapida e furono usate tecnologie allora d'avanguardia. Già durante la costruzione Pasteur si preoccupò di preparare lo statuto del nuovo istituto che andava sorgendo. In questo documento viene sottolineata la necessità di una indipendenza amministrativa, di un'autonomia finanziaria, che resterà tale sino agli anni '70 del nostro secolo, condizione per la libertà di pensiero e di azione. Forse in seguito alle difficoltà incontrate quando Pasteur era professore all'Ecole Normale ed aveva più volte dovuto lamentarsi per le condizioni in cui erano costretti i suoi laboratori di ricerca, e forse anche preoccupato della ostilità degli ambienti medici ufficiali verso le sue teorie e i suoi metodi, Pasteur aveva assegnato all'Istituto il compito di sviluppare, lontano dai centri universitari, l'insegnamento libero e la pratica della nuova scienza, la Microbiologia.

Il 4 giugno del 1887 un decreto del Consiglio di Stato, firmato dal Presidente della Repubblica Jules Grévy, approvò gli statuti e riconobbe l'Institut Pasteur di utilità pubblica. L'Istituto viene definito in tali statuti come una struttura scientifica autonoma, dotata di personalità giuridica. Direttore viene naturalmente nominato Louis Pasteur, assistito da un Consiglio di 12 membri e da una assemblea incaricata di eleggere ogni tre anni il Consiglio. Il 18 novembre 1888 l'istituto è inaugurato alla presenza di Sadi Carnot, Presidente della Repubblica. Nel discorso di inaugurazione Pasteur affermò: «Il nostro istituto sarà al tempo stesso un dispensario per il trattamento della rabbia, un centro di ricerca per le malattie infettive e un centro di insegnamento», un programma questo che resterà costante per tutta la storia dell'istituto.

L'attività venne divisa in cinque servizi: il servizio della rabbia, affidato al dottor Grancher, quello di microbiologia generale, diretto da Emile Duclaux, che si occupava anche dell'insegnamento della chimica fisiologica, il servizio di microbiologia tecnica, diretto da Emile Roux, finalizzato all'applicazione delle nuove scoperte e all'insegnamento della microbiologia in senso

stretto, un laboratorio di ricerca, diretto da Ilja Metchnikoff e infine il servizio per la produzione dei vaccini, diretto dal dottor C. Chamberlain.

Il modello pasteuriano, come organizzazione, collocazione istituzionale e soprattutto come individuazione disciplinare, si diffuse rapidamente in molte parti del mondo, con la creazione di numerosi istituti medici e di ricerca. In Italia tale modello si è concretizzato nella creazione dell'Istituto di Igiene dell'Università di Roma, con l'Istituzione del primo centro di profilassi della rabbia da parte di Angelo Celli e lo sviluppo di una scuola di parassitologia, il cui primo grande successo fu la scoperta del meccanismo di trasmissione della malaria nell'uomo, da parte di Grassi, Bastianelli e Bignami nel 1899.

La portata innovativa della tradizione scientifica pasteuriana e la flessibilità istituzionale che la caratterizzava permisero uno sviluppo rapido, che portò, subito dopo la fondazione dell'Istituto Pasteur, a risultati notevoli. Senza fare una lista, che non potrebbe essere esaustiva, ma solo per segnare alcune tappe fondamentali, si possono ricordare la messa in evidenza del modo di azione del bacillo difterico da parte di Roux e Yersin nel 1888, la nascita della sieroterapia nel 1894, con il trattamento della difterite con l'antitossina estratta da cavalli immunizzati, l'identificazione del bacillo della peste da parte di Yersin, allora a Hong Kong, nel 1894 e la chiarificazione del meccanismo della sua trasmissione da parte di Simond nel 1898, i lavori immunologici, rispettivamente sulla fagocitosi e sul complemento, di Metchnikoff e Bordet fra il 1896 e il 1900, la scoperta dei meccanismi di trasmissione del tifo da parte di Nicolle nel 1909, la messa a punto del B.C.G., il vaccino antitubercolare da parte di Calmette e Guérin nel 1921, poi in epoche più recenti le grandi scoperte di chemioterapia, i sulfamidici, gli antistaminici e i curarizzanti di sintesi, da parte di Daniel Bovet tra il 1937 e il 1947, e infine la biologia molecolare, coronata dal premio Nobel a Jacob, Lwoff e Monod nel 1965, e l'immunologia moderna che hanno posto l'Institut Pasteur fra i pochi centri che nel mondo hanno dato origine alla rivoluzione molecolare.

È ben noto che tutte le istituzioni hanno come scopo fondamentale quello di perpetuarsi. Questa caratteristica così spesso negativa e che ha portato alla produzione di numerosi fossili istituzionali, nel caso dell'Institut Pasteur ha permesso il mantenimento di una specificità particolarmente utile e produttiva, il permanere di un «esprit de maison», difeso con orgoglio, un respiro di vita diverso da tutte le altre istituzioni, che si percepisce con chiarezza e con nettezza e che penetra nei pensieri. Alla base vi è la coscienza presente nei ricercatori e nei dirigenti, in tutti gli operatori, di gestire una grande eredità scientifica e culturale, la continuità di una tradizione nella scienza che ha permesso di associare sin dall'inizio settori disciplinari diversi, le ricerche sulla fagocitosi alla microbiologia, la chimica fisiologica alla parassitologia. Il permanere di indirizzi tradizionali, ma senza rigidismi, assume talvolta un valore simbolico come nel caso del veleno del cobra, studiato da Albert Calmette, che è lo stesso usato da Jean-Pierre Changeux per studiare la trasmissione tra nervo e muscolo.

Le caratteristiche fondamentali dell'Institut Pasteur come istituzione possono essere individuate in tre settori: la ricerca fondamentale, l'applicazione

industriale e medica e la didattica. Per quel che riguarda la ricerca fondamentale una caratteristica essenziale è sempre stata la libertà di azione nella scelta dei collaboratori e dei problemi da studiare, senza badare troppo alla posizione accademica e nemmeno alla nazionalità, dato che fra i grandi pasteuriani vi erano il russo Metchnikoff, Alexandre Yersin svizzero, D'Herelle canadese, Bordet belga, Bovet svizzero, Nitti italiano. Una così grande libertà d'azione può portare, ed ha talvolta portato, a scelte errate ma produce anche la flessibilità necessaria alla permeabilità alle idee più nuove, la disponibilità a dare rapidamente spazio a programmi di ricerca innovativi e anche poco ortodossi. È tale flessibilità che ha permesso, ad esempio, ad André Lwoff di non curarsi troppo degli inviti a ridurre il personale e gli ospiti del proprio servizio di fisiologia dei microrganismi, accusato di svolgere ricerche senza interesse e che invece ospitava gli elementi che avrebbero dato origine alla scuola francese di biologia molecolare ed anche molti ospiti stranieri che stavano sviluppando questa disciplina in altri contesti scientifici e istituzionali. Questa libertà di azione ha permesso anche l'uso delle tecniche più avanzate e lo scambio di ricercatori fra i diversi servizi, sia stabilmente che temporaneamente, per apprendere metodi o tecniche.

L'orientamento applicativo è stato sin dall'inizio una caratteristica dell'istituto, come abbiamo visto dalla citazione del discorso inaugurale di Louis Pasteur. D'altronde, tutta la carriera dello stesso Pasteur era stata caratterizzata dal costante legame con le applicazioni della scienza e molte delle sue ricerche, come quelle sulle fermentazioni, avevano un punto di partenza applicativo, un problema pratico da risolvere. Dopo l'origine della microbiologia, l'individuazione di agenti patogeni spingeva immediatamente alla ricerca dei metodi per produrre i relativi vaccini. Alla attività di ricerca e alla produzione di vaccini si legò presto anche la attività dell'Hopîtal Pasteur, fondato da Emile Roux e Louis Martin nel 1900, che divenne un modello per l'applicazione delle tecniche igieniche e di asepsi, con una associazione strettissima con i laboratori di ricerca. Altre esperienze in questo campo possono essere considerate i dispensari antitubercolari di Calmette dell'Institut Pasteur di Lille. Queste iniziative furono all'inizio apertamente criticate dagli ambienti medici, che vi vedevano una indebita intromissione di chimici e di biologi non medici nel campo dell'assistenza sanitaria. Si giunse ad esempio sino alla pubblicazione nel 1901 di un manifesto da parte dei medici farmacisti delle regioni del Nord della Francia contro i dispensari di Calmette. Questa posizione, che sembrava difendere lo statuto professionale del medico, dimenticava che proprio una delle caratteristiche della ricerca microbiologica, non solo in Francia, ma anche in Germania ed in Italia, che si era manifestata vincente, era il legame fra medicina e biologia fondamentale, in particolare la zoologia, l'ecologia e l'etologia dei parassiti e dei vettori.

La didattica si sviluppò immediatamente all'Institut Pasteur subito dopo la sua fondazione, in stretto legame con la pratica di laboratorio e la clinica. A partire dal 1889 Emile Roux organizzò un grande corso di microbiologia tecnica, finalizzato all'insegnamento «dei metodi microbici nella loro applicazione alla medicina», come aveva indicato lo stesso Pasteur. Divenuto rapida-

mente celebre nel mondo sotto il nome di «Cours de Monsieur Roux», questo corso legava strettissimamente l'insegnamento ai lavori pratici ed a esso si associavano dei corsi speciali, organizzati dai diversi servizi e dedicati agli argomenti più di punta, come ad esempio le 12 lezioni sull'infiammazione nel 1891, organizzate da Metchnikoff, e le 5 sulla peste nel 1899, a pochi anni dalla identificazione del bacillo della peste da parte di Yersin e subito dopo l'individuazione della pulce come vettore da parte di Simond. La tradizione didattica è rimasta viva costantemente, con le sole interruzioni dovute alle due guerre mondiali, e sino ad oggi, così come hanno avuto sempre importanza i corsi speciali. Si possono ricordare ad esempio i due corsi organizzati dal servizio di biochimica cellulare di Jacques Monod nel '55 e nel '56, che furono il momento di formazione di una vera scuola francese di biologia molecolare.

Alla base del progetto istituzionale originale dell'Institut Pasteur e della sua tradizione nel secolo trascorso vi era comunque una innovazione teorica, un nuovo concetto scientifico e medico che aveva permesso la creazione della microbiologia o batteriologia da parte di Pasteur in Francia e di Robert Koch in Germania: l'idea rivoluzionaria che le malattie potevano essere provocate da agenti patogeni esterni all'organismo, agenti che si potevano individuare, selezionare e combattere. Sorsero così anche le immagini metaforiche che hanno accompagnato la storia della microbiologia, l'immagine della guerra contro nemici invisibili ma che possobo essere vinti, utilizzando gli adatti mezzi di indagine e di lotta, mezzi teorici ed istituzionali. L'Institut Pasteur si è sentito sin dall'inizio in prima linea in questa guerra continua, in Francia e soprattutto nei paesi tropicali. E questa guerra è la stessa che con armi diverse, teoriche e pratiche, continua ad essere combattuta aspramente anche oggi ed è — occorre ribadirlo — la sola guerra che meriti di essere combattuta. È per questo che il centenario dell'Institut Pasteur, più che una commemorazione, è una occasione per riflettere sulla strada percorsa e sulle tante cose che restano ancora da fare.

Parassitologia 30: 163-164, 1988

INTERVENTO PER IL CENTENARIO DELL'ISTITUTO PASTEUR DI PARIGI ALL'UNIVERSITÀ DI ROMA «LA SAPIENZA»

D. Bovet

Premio Nobel per la Chimica.

Siamo qui riuniti per celebrare il centenario della fondazione dell'Istituto Pasteur di Parigi, una data che segnò una svolta nella medicina moderna, una pietra miliare nella storia della ricerca.

Le principali date, i fatti, sono noti a tutti. Il nome stesso di Pasteur è diventato nel linguaggio comune sostantivo per indicare un microbo, la pasteurella, una malattia, la pasteurellosi, un metodo di sterlizzazione, la pastorizzazione e un aggettivo per riferirsi a quei concetti che dalle teorie di Pasteur si ispirano. Ma anche per caratterizzare il ricercatore che ha il privilegio di operare nella «grande maison», privilegio che è stato il mio per vent'anni della mia vita.

L'atmosfera del tutto particolare di questo grande istituto, che sfugge a leggi e regole precise, che ignora i concorsi, finisce col creare un tipo di ricercatore particolare. In un'intervista François Jacob li ha definiti così: «medici senza clientela, farmacisti senza famarcia, chimici senza industria, universitari senza cattedra che si distinguono soltanto per il loro stile».

Avevo 22 anni quando sono entrato nell'Istituto Pasteur e, in quel tempo, gli allievi di Pasteur vi lavoravano ancora: Emile Roux, che ne era il direttore e che aveva condiviso con il maestro le battaglie e le vittorie nella lotta contro il carbonchio e la rabbia, Martin, uno dei primi studiosi del bacillo del tifo, Calmette, che doveva legare il suo nome alla vaccinazione antitubercolare.

Cinquant'anni erano trascorsi, le grandi speranze degli inizi non si erano tutte avverate e malattie terribili come la polmonite minacciavano ancora le popolazioni. Basti pensare che alla fine della prima guerra mondiale, la «febbre spagnola» aveva mietuto nel mondo intero 25 milioni di vite.

Con l'indipendenza di spirito che ha sempre caratterizzato l'Istituto Pasteur e pur senza rinnegare le sue origini, esso aveva intanto intuito il ruolo preponderante che la chimica avrebbe avuto in terapie e istituito un reparto di chimica terapeutica affidato a uno dei maggiori ricercatori del nostro tempo, Ernest Fourneau, il mio maestro.

È con lui, con i Tréfouël e soprattutto con Federico Nitti che abbiamo vissuto l'esaltante avventura della scoperta dell'azione antibatterica del sulfamidico, che doveva segnare una svolta nella terapia e l'inizio di fondamentali ricerche.

Questi studi avevano preso l'avvio in Germania dove erano stati messi in luce gli effetti antibatterici di una materia colorante, il Prontosil. Ma fu dato a noi, nell'Istituto Pasteur, di scoprire che non era quella sostanza ad agire sull'infezione microbica bensì una assai più semplice, derivante dalla sua scissione nell'organismo e che ne rappresentava al tempo stesso la materia prima. La sua efficacia era assai più marcata e si estendeva a malattie allora considerate inguaribili come la meningite.

Fra i ricordi più commoventi della mia carriera vi è appunto la prima guarigione di un bambino colpito da meningite, ricoverato nell'Ospedale Pasteur e che abbiamo potuto seguire giorno dopo giorno fino alla vittoria finale.

Ma, prima ancora che gli antibiotici facessero la loro apparizione, è sulla polmonite, in quel tempo la prima fra le cause di morte, che gli effetti del sulfamidico apparvero quasi miracolosi: nei soli Stati Uniti ammontavano a 200.000 ogni anno i malati di polmonite destinati a morire e salvati dal farmaco, una piccola Hiroshima alla rovescia.

Da allora innumerevoli malati sono stati guariti dai sulfamidici e più di 5000 molecole nuove apparentate sono state preparate dai chimici e sperimentate in clinica. Dirò soltanto che fra esse sono state individuate nuove classi di farmaci quali i diuretici, gli antidiabetici, gli antitubercolari e uno dei primi derivati attivi nella lebbra.

Quando abbiamo compiuto le nostre ricerche sui sulfamidici i quattro laboratori di «microbies» ideati da Pasteur erano diventati trenta. Oggi vi sono 80 reparti nell'Istituto e la biologia molecolare vi predomina. Fra le ricerche più importanti ricorderemo soltanto la messa in evidenza, da parte del gruppo di Jacques Monod e di François Jacob, della fisiologia della crescita microbica e della regolazione della sintesi proteica.

Ma, fedele alla sua tradizione, l'Istituto Pasteur è oggi all'avanguardia nella ricerca di un vaccino contro l'A.I.D.S., il flagello del nostro tempo che ci trova impreparati.

Si deve a Luc Montagnier la scoperta di due virus implicati nell'infezione da A.I.D.S. e l'interesse di sviluppare rapidamente dei tests diagnostici che permettono di rivelare nel sangue la presenza di anticorpi specifici. La struttura completa del materiale genetico del virus è stata compiuta e costituisce un apporto prezioso per le applicazioni, in particolar modo per la messa a punto di un vaccino. Anche se con metodi più elaborati e a un secolo di distanza, si tende alla creazione di un «falso virus», come lo aveva fatto Pasteur, per la protezione contro la malattia.

Poche istituzioni nella storia della scienza sono state più illuminate e più generose dell'Istituto Pasteur che, sempre aperto alla ricerca, non è mai venuto meno alla sua vocazione umana.

Nel celebrare i cento anni della sua vita gloriosa, con la riconoscenza dell'allievo, vorrei esprimere qui la mia fiducia nel suo luminoso avvenire.

Parassitologia 30: 165-169, 1988

Il CENTENARIO DELL'ISTITUTO PASTEUR DI PARIGI E L'ISTITUTO PASTEUR FONDAZIONE CENCI BOLOGNETTI DELL'UNIVERSITÀ DI ROMA «LA SAPIENZA»

E. Biocca

Istituto di Parassitologia, Università di Roma «La Sapienza».

Louis Pasteur, figlio di un modesto conciatore di pelli, era nato il 27 dicembre 1822 a Dôle, nella Francia orientale. A 16 anni partiva per Parigi per completare gli studi.

Su una targa di marmo posta dal Comune di Parigi in via di Ulm sulla parete di un edificio contiguo alla Scuola Normale dove Pasteur realizzò gran parte delle sue maggiori scoperte, è scritto: «Qui fu il laboratorio di Pasteur; 1857 fermentazioni; 1860 generazione spontanea; 1865 malattie dei vini e delle birre; 1881 virus e vaccini; 1885 profilassi della rabbia». Con queste pochissime parole è stata riassunta l'immensa opera di Louis Pasteur, che ha segnato la nascita di nuove discipline e che ha permesso inimmaginabili applicazioni pratiche.

Le sue fondamentali ricerche sulla rabbia e sulla vaccinazione antirabbica, che portarono poi alla fondazione di quell'Istituto Pasteur di Parigi il cui centenario oggi celebriamo, sono la conseguenza logica delle ricerche sul colera e sul carbonchio e hanno avuto inizio nel 1879-1880. Nel 1885 egli era riuscito a preparare un vaccino antirabbico con tessuto nervoso di coniglio rabbioso, che doveva essere inoculato in fasi decrescenti di attenuazione: era quindi un vaccino ritenuto molto pericoloso. Egli scriveva dunque all'amico Jules Vercel: «Mio caro Jules, nelle mie ultime esperienze sulla rabbia ho dimostrato in quest'anno che si può vaccinare o rendere refrattari alla rabbia i cani che sono stati morsi. Non ho ancora osato trattare gli uomini dopo il morso di cani rabbiosi. Ma questo momento non può essere lontano e ho un grande desiderio di cominciare da me, cioè di inocularmi la rabbia per arrestarne le conseguenze, tanto io comincio ad agguerrirmi ed essere sicuro dei miei risultati».

L'occasione di provare il suo vaccino sull'uomo non tardò. Il 6 luglio 1885 un giovane alsaziano, Joseph Meister, veniva assalito e morso ben 14 volte da un cane rabbioso. Pasteur decideva di vaccinarlo sotto l'occhio critico di illustri personaggi del mondo accademico. Dopo pochi giorni un secondo caso commosse l'opinione pubblica: Jean Baptiste Jupille, pastorello di un pae-

sino del Jura affrontava un cane rabbioso per proteggere i suoi più giovani amici e veniva dilaniato dai morsi. Pasteur ripeteva con successo la vaccinazione. La fama di Pasteur rapidamente superava allora i confini stessi della Francia e cominciavano ad affluire a Parigi sempre nuovi morsicati per farsi vaccinare.

Ma nel novembre 1885 moriva il giovane Rouger che aveva iniziato la vaccinazione non subito dopo il morso, ma solo dopo 12 giorni. Veniva ordinata un'inchiesta giudiziaria e presenziava all'autopsia quale accusatore e negatore delle scoperte di Pasteur un medico che diverrà poi uno dei personaggi più significativi della futura storia di Francia, Georges Clémenceau, simbolo della vittoria e del militarismo francese nella Prima guerra mondiale.

Gli attacchi ingenerosi e i dubbi sul significato della vaccinazione antirabbica e le denunce avanzate dalla «Lega internazionale degli antivaccinatori» — che si era costituita a Londra e che aveva ufficialmente protestato persino contro la decisione del Ministero della Pubblica Istruzione di portare la pensione di Pasteur da 12 a 25 mila franchi annui — non raggiunsero il loro scopo. Una commissione inglese di cui faceva parte J. Lister, il grande chirurgo che aveva introdotto le pratiche di asepsi in chirurgia, venne a Parigi e, dopo 14 mesi di studio e di controlli, confermò le scoperte di Pasteur.

Forte ormai delle centinaia di casi umani trattati col nuovo vaccino, il 1° marzo 1886, dopo un'ampia relazione all'Accademia di Medicina, Pasteur affermò: «Si vede, a tener conto delle statistiche anche più rigorose, quale alto numero di persone è stato già sottratto alla morte... Vi è ragione di creare uno stabilimento di vaccinazione contro la rabbia».

Fu nominata allora dall'Accademia una Commissione che aprì una sottoscrizione pubblica alla quale parteciparono anche l'Imperatore del Brasile e lo Zar di Russia: era di quel periodo — marzo 1886 — il trattamento vaccinico dei russi di Smolensk morsi da lupo rabbioso. Rapidamente furono superati i 2 milioni e mezzo di franchi che permisero l'acquisto di quel terreno in Rue Dutot, oggi Rue du Dr. Roux, dove fu costruito il complesso di edifici che formano l'Istituto Pasteur di Parigi.

Nasceva così un secolo fa quello «stabilimento di vaccinazione contro la rabbia» come lo aveva indicato Pasteur, che fu inaugurato il 14 novembre 1888. Intorno a Pasteur, nel suo Istituto, si riunirono i più illustri nomi della scienza dell'epoca. Quando nel 1895 Pasteur morì, fu chiamato a dirigere l'Istituto uno dei più illustri collaboratori di Pasteur, Emile Roux.

Non esiste esempio nella storia delle istituzioni scientifiche che possa vantare, come l'Istituto Pasteur, scoperte di fondamentale importanza per il progresso della cultura medica e biologica e che al tempo stesso abbia dato aiuto all'umanità sofferente, al di sopra di qualsiasi divisione di carattere etnico, politico o religioso. Tutti noi sappiamo cosa ha significato per la difesa della vita e della salute umana la scoperta da parte di Yersin dell'agente etiologico della peste che oggi chiamiamo *Yersinia pestis* o la scoperta del vaccino anti-tubercolare BCG dovuta a Calmette e Guérin, o la identificazione dell'agente trasmettitore del tifo esantematico — uno dei maggiori flagelli che hanno accompagnato le guerre e le carestie del passato — legato al nome di

Nicolle; o la preparazione dell'anatossina difterica da parte di Ramon, o le ricerche sulla immonulogia e sulla sieroterapia dovute a Metchnikoff, a Bordet, a Salimbeni. In tempi a noi più vicini sono state realizzate nell'Istituto Pasteur le scoperte sull'attività chemioterapica dei sulfamidici alle quali ha dato un contributo essenziale Bovet, e poi gli studi di biologia molecolare e di genetica che hanno aperto i campi più nuovi e fecondi della moderna biologia. Aver citato solo i nomi di alcuni grandi scienziati pasteuriani significa averne tralasciato ingiustamente altri e di questo mi scuso.

Già nel 1891 quando Pasteur era ancora vivo, e per sua volontà, partivano dall'Istituto Pasteur di Parigi illustri discepoli per fondare nuovi Istituti sul modello di quello di Parigi nei più diversi paesi del mondo: il primo fu a Saigon (oggi Ho-Chi-Minville) nel 1891, poi a Costantinopoli e Rio de Janeiro nel 1892, a Tunisi nel 1893, ad Algeri nel 1894 e a Nha Dang in Vietnam nel 1895. Dopo la morte di Pasteur venivano successivamente creati gli Istituti del Senegal, di Madagascar, del Congo, di Martinica, della Nuova Caledonia, della Guinea Francese, dell'Iran, della Grecia, di Guadalupe, ancora di Hanoi e Danat nel Vietnam, di Guinea, di Cina, di Etiopia, del Cameroun, della Repubblica Centro-africana, della Costa d'Avorio.

Nel 1976 è stato creato a Roma l'Istituto Pasteur Fondazione Cenci Bolognetti di cui è Presidente il Rettore dell'Università «La Sapienza» di Roma. È nato ultimo cronologicamente degli Istituti Pasteur, ma in una Università legata al mondo pasteuriano da vincoli antichi. Già nel 1° numero di *Nuovi Annali d'Igiene* pubblicato nel 1889, Angelo Celli, professore illustre d'Igiene nella nostra Facoltà di Medicina — a cui dobbiamo tra l'altro le grandi realizzazioni nella lotta antimalarica, — scriveva «...sarà posta nel pianterreno (dell'Istituto di Igiene) una *Stazione di vaccinazione antirabbica* a nome e per conto del Municipio di Roma e a vantaggio altresì delle Province limitrofe e quindi dell'opera filantropica. L'Università di Roma — continuava Celli — è lieta di contribuire col dare gratuitamente locali, personale direttivo e quanto può occorrere dei suoi laboratori, che non sia di uso esclusivo, per la cura di Pasteur».

Quindi fin dal 1889, quando ancora non era stato creato il primo Istituto Pasteur di Oltremare, quello di Hochiminville del 1891, veniva così istituito presso la nostra Università a Roma nei locali dell'Istituito d'Igiene una «Stazione di vaccinazione antirabbica» destinata alla «cura di Pasteur» secondo l'espressione di Celli, stazione del tutto analoga allo «stabilimento di vaccinazione contro la rabbia» voluto da Pasteur e inaugurato appena un anno prima a Parigi. Giuseppe Sanarelli, che nel 1913 ha sostituito Angelo Celli nella direzione dell'Istituto di Igiene, è stato un allievo diretto di Pasteur, con cui ha lavorato negli anni 1892-1894; è stato proprio Sanarelli ad introdurre nell'Istituto Pasteur di Parigi, l'italiano Salimbeni, divenuto poi uno dei ricercatori e dirigenti scientifici più stimati dell'Istituto stesso.

A Giuseppe Sanarelli sono succeduti nella direzione dell'Istituto di Igiene dell'Università di Roma, Dante De Blasi, Vittorio Puntoni, Vittorio Del Vecchio e Salvatore D'Arca, che hanno seguito tutti l'opera e il pensiero di Louis Pasteur.

L'Istituto Pasteur di Roma si distingue dagli altri Istituti Pasteur non solo perché fa parte di una istituzione universitaria, «La Sapienza» di Roma, una delle più antiche Università del mondo, ma perché, accanto al nome di Pasteur ha anche un altro nome, quello di Cenci Bolognetti, famiglia romana che ha dato nei secoli illustri personaggi e che richiama alla nostra mente, accanto a ricordi storici, anche ricordi drammatici dell'alterno e lento cammino dei diritti umani.

L'11 ottobre 1599 venivano infatti decapitati di fronte a Castel Sant'Angelo in Roma Beatrice Cenci una giovane e, secondo le cronache, bellissima donna di 22 anni, il fratello Giacomo e Lucrezia, seconda moglie del padre Francesco Cenci. In base all'accusa e al verdetto, Francesco Cenci, trovato morto sotto le mura del Castello di Petrella, sarebbe stato fatto uccidere dai tre e poi fatto gettare dal Castello. All'epoca a Roma i cittadini comuni poteva essere torturati dagli inquirenti, ma per torturare i nobili era necessario un «motu proprio» del papa. Reggeva in quel momento il pontificato Clemente Ottavo (Ippolito Aldobrandini), personaggio importante nella storia della Chiesa, che ha legato il suo nome alla revisione del Vulgata e alla riedizione del Pontificale, del Breviario e del Messale. Il papa Clemente VIII trasmise la sua autorizzazione agli inquirenti attraverso il Governatore di Roma, Principe Taverna. La tortura era stata richiesta e fu usata per ottenere la confessione, cioè l'autoaccusa, necessaria per poter condannare a morte. Non esisteva a quell'epoca oscura il diritto, che hanno oggi in molti paesi gli accusati, di non dare risposte che potrebbero essere a proprio danno, ma esisteva il diritto degli accusatori di torturare affinché il torturato confessasse la colpa.

La storia racconta che durante l'esecuzione pubblica dei tre condannati, il papa angosciato si ritirò per pregare per le loro anime. Quattro mesi dopo, in un'altra piazza di Roma, a Campo dei Fiori, ardeva il rogo di Giordano Bruno.

La tragedia dei Cenci, che ha avuto tanta importanza nella storia del diritto e della tortura, ha ispirato anche grandi artisti, da Shelley che ha pubblicato il dramma «I Cenci» quasi contemporaneamente al suo copolavoro «Prometeo liberato», a Stendhal che ha scritto il saggio storico «Cenci» su documenti e manoscritti inediti, al Guerrazzi e, più recentemente al Ricci che ha compiuto una approfondita analisi della tragedia su documenti originali del celebre processo. Nel Palazzo Barberini a Roma si trova un magnifico ritratto di Guido Reni che, secondo molti, rappresenterebbe Beatrice Cenci.

Il ramo a cui apparteneva Beatrice Cenci si è spento nel XVII secolo, mentre è sopravvissuto il ramo parallelo che nel 1722, in seguito al matrimonio di Virginio Cenci con Marianna Bolognetti, ha preso il nome di Cenci Bolognetti.

Beatrice Fiorenza Cenci Bolognetti, Principessa di Vicovaro, ultima erede di una grande fortuna, ha ceduto gran parte degli averi della famiglia Cenci Bolognetti all'Università di Roma «per incrementare — è scritto di sua mano nel testamento — gli studi e le ricerche in armonia con i fini perseguiti dall'Istituto Pasteur di Parigi e di oltremare». La cessione testamentaria di beni è stata decisa — è doveroso a suo merito ricordarlo — nell'ottobre 1940

ed è stata una testimonianza viva della fiducia nella vita e nel futuro dell'uomo, proprio nel momento in cui sembravano affermarsi nel mondo l'odio folle, il razzismo e la guerra.

Il centenario dell'Istituto Pasteur di Parigi cade in un momento particolarmente significativo per la storia della rabbia. La forma silvestre della infezione che si era largamente diffusa nei paesi europei a noi confinanti, era penetrata in molte province nord-orientali italiane a partire dal 1977, e la sua marcia sembrava ormai inarrestabile verso gli Appennini. In seguito ad una intensa e organica campagna di vaccinazione orale delle volpi con vaccino antirabbico vivo e modificato, distribuito con esche nel terreno — campagna iniziata nel 1978 con crescente successo in Svizzera e poi in Germania Federale e Italia — nessun nuovo caso di rabbia è stato più segnalato a partire dall'11 luglio 1986 nel nostro territorio.

L'Italia è stato il primo grande paese a liberarsi della rabbia silvestre in seguito a questo nuovo metodo di lotta che non cerca di distruggere il vettore (la volpe) ma di immunizzarlo e di proteggerlo in modo che possa resistere al morso di animali infetti, trasformandolo da strumento di diffusione dell'infezione, in strumento di difesa del territorio e quindi dell'uomo e degli animali.

L'Istituto Pasteur Fondazione Cenci Bolognetti, in collaborazione diretta con l'Istituto Pasteur di Parigi ed insieme ad altre Istituzioni scientifiche italiane e straniere, ha prestato il suo contributo contro la rabbia silvestre in accordo con il piano di studio e di intervento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e del Ministero della Sanità Italiano, Direzione Generale dei Servizi Veterinari, come è documentato in questi Atti del Convegno Internazionale «La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa», tenutosi a Sirmione e Trento dal 19 al 22 ottobre 1987.

Parassitologia 30: 171-173, 1988

Il CENTENARIO DELL'ISTITUTO PASTEUR DI PARIGI ALL'UNIVERSITÀ «LA SAPIENZA» DI ROMA

A. Ruberti

Ministro per la Ricerca Scientifica, Roma.

È la prima volta che sono qui in forma ufficiale, nell'Università di cui sono parte ed in cui ho avuto l'onore di ricoprire la funzione di Rettore per quasi undici anni, in un'aula ricca per me di ricordi e di impegni. E dunque i miei sentimenti sono anzitutto di emozione ed il mio saluto non è certo formale e tantomeno di circostanza.

Sento quanto profonde sono le mie radici in questo Ateneo e me lo conferma la presenza qui di Presidi, docenti, non docenti che hanno con me condiviso la responsabilità della conduzione dell'Ateneo negli anni più difficili ed in quelli più sereni, comunque in periodi sempre complessi, perché complesso era ed è il nostro Ateneo. Come è naturale e fisiologicamente sano in ogni comunità, vi possono essere stati ed esservi momenti dialettici e di confronto, ma certo siamo stati tutti uniti dall'impegno per l'istituzione e, dunque, un legame ci unisce, quello di essere parte della Comunità accademica della stessa università e di aver lavorato per essa.

Sono lieto di essere qui in occasione della cerimonia celebrativa del Centenario dell'Istituto Pasteur di Parigi e dell'inaugurazione dell'eposizione di posters sull'attività degli Istituti Pasteur di Francia e d'Oltremare, sia per il rilievo che ha, in sé, il centenario di questa istituzione di ricerca, così ricca di storia e così rilevante nel panorama scientifico internazionale, sia per la possibilità di fare il punto su un decennio di attività della Fondazione «Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti».

Un secolo di ricerca finalizzata alla salute dell'uomo, sono un pezzo della storia scientifica alla quale guardiamo con ammirazione e con rispetto, ed è un grande onore per il nostro Ateneo avere la responsabilità di una Fondazione inserita nella grande rete internazionale degli Istituti Pasteur.

Proprio sentendo questa responsabilità, nel primo anno del mio rettorato — il tormentato e difficile 1977 — diedi vita a questo organismo, che aveva avuto una incubazione di trentacinque anni per giungere dal lascito nel 1940 alla convenzione con l'Istituto Pasteur di Parigi ed al riconoscimento di ente morale nel 1975.

Per dieci anni, salvo un breve periodo di delega, ho esercitato direttamente la funzione di Presidente della Fondazione, secondo le seguenti linee:

a) il sostegno alla crescita di quelle risorse umane, che ho sempre considerato — e che considero anche nella nuova funzione — decisive per il consolidamento e lo sviluppo del nostro sistema scientifico: ottantasette borse di studio all'estero, nel campo delle scienze pasteuriane, in una fase di sostanziale restrizione dei canali di immissione dei giovani, sono un contributo concreto dato dal nostro Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti;
b) il sostegno ad una infrastruttura di ricerca — la banca degli enzimi — che ho sempre considerato il modo migliore per sostenere la ricerca di base e che nella nuova funzione ha ispirato la proposta, accolta nella finanziaria, di un impegno nazionale sulle infrastrutture di ricerca;
c) il sostegno a programmi pluriennali di ricerca tesi a favorire la cooperazione scientifica su aree ben definite;
d) lo stimolo, in parte accolto, di diversificare le fonti di finanziamento, acquisendo commesse di ricerca.

Il 28 luglio di quest'anno — nell'ultimo Consiglio che ho presieduto, nel giorno precedente al mio giuramento al Quirinale — ho proposto, a conclusione di un'analisi che si era sviluppata per più di un anno, di finanziare uno studio di fattibilità per avviare una seconda fase dell'Istituto, che avesse come obiettivo la realizzazione di laboratori propri, di un centro di ricerche di eccellenza nelle scienze pasteuriane. Vi sono le premesse e le possibilità per l'Istituto, anche in relazione agli impegnativi programmi nazionali, di assumere un ruolo di rilievo nel sistema della ricerca del nostro paese, valorizzando anche il suo prestigioso ed importante collegamento internazionale. La proposta fu accolta e i nuovi responsabili avranno sul loro tavolo le basi per una seconda fase, per la quale mi è gradito formulare un augurio vivamente sentito ed insieme l'attenzione e la disponibilità dovute a tutte le iniziative che riguardano il fronte della ricerca ed hanno un respiro internazionale.

Ma non posso concludere questo breve intervento senza fermare il pensiero al ricordo di Pasteur, che qui ci offre l'occasione di questo incontro, illustrato dalla presenza prestigiosa di due premi Nobel, Daniel Bovet e Rita Levi Montalcini, del Prof. Ettore Biocca — che nella Fondazione in questi dieci anni si è intensamente impegnato — e del graditissimo ospite, Porf. Raymond Dedonder, Direttore dell'Istituto Pasteur. Saranno essi, più propriamente, a ricordare la figura di Pasteur e la storia dell'Istituto. Ma io non posso non sottolineare il fatto che Pasteur non fu solo un grande scienziato ma anche un uomo che dedicò il suo cuore ed il suo genio al servizio dell'umanità.

La sua concezione del ruolo della scienza riecheggia nelle parole che pronunciò nell'inaugurare nel 1888 il nuovo istituto che assumeva il suo nome: «Due leggi contrarie sembrano oggi contrapporsi l'una all'altra; una legge di sangue e di morte che escogita sempre nuovi mezzi di distruzione e costringe le nazioni ad essere costantemente pronte a combattere sui campi di battaglia; una legge di pace, lavoro e salute, che cerca sempre nuovi mezzi per liberare l'uomo dai flagelli che lo assillano».

Pasteur, «incatenato — come lui diceva — dalla scienza come passione dominante», svolse il suo lavoro di ricercatore e di scienziato con una dedizio-

ne completa e profonda, tanto che non si può pensare alla sua vita senza parlare di «entusiasmo». «I Greci ci hanno dato una delle più belle parole del nostro linguaggio, la parola *entusiasmo*, un dio dentro di noi. Felice colui che porta un dio dentro di sé».

Ed ancora oggi, accanto al grande contributo scientifico e pratico che ha dato come scienziato, ci consegna un grande messaggio per i giovani pronunciato in occasione della solenne cerimonia per il suo settantesimo compleanno.

«Giovani, abbiate fede in questi metodi potenti e sicuri di cui non conosciamo ancora tutti i segreti e, quale che possa essere la vostra carriera, non scoraggiatevi per la tristezza di certi momenti che inevitabilmente passano sopra le nazioni. Vivete nella pace serena dei laboratori e delle biblioteche...».

È un messaggio così pregno di fiducia e di speranza, di entusiasmo per la scienza, che a me pare sia il migliore stimolo al nostro lavoro.

Parassitologia 30: 175-177, 1988

L'ISTITUTO PASTEUR - FONDAZIONE CENCI BOLOGNETTI DELL'UNIVERSITÀ DI ROMA «LA SAPIENZA»

L. FRONTALI

Direttore Scientifico dell'Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti.

Il Prof. Biocca ha presentato la storia della nostra Fondazione e io vengo adesso a parlarvi delle sue attività attuali. Prima di passare ad esporre le nostre attività vorrei però soffermarmi un attimo sulle finalità della nostra Fondazione, così come esse appaiono nell'art. 2 dello statuto: «... incrementare gli studi e le ricerche nel campo della microbiologia fondamentale e applicata e più generalmente nelle discipline puramente pasteuriane e in campi affini in armonia con i fini perseguiti dal Pasteur di Parigi e oltremare».

Devo dire che ad una prima lettura questa dizione mi apparve — e forse a molti è apparsa — in qualche modo insoddisfacente. Insegnavo, come insegno tutt'ora, Chimica delle Fermentazioni, e certo vedevo nell'approccio di Pasteur allo studio delle fermentazioni la soluzione di un problema fondamentale quale quello della generazione spontanea, insieme alla soluzione del problema pratico industriale — un momento originalissimo della storia della biologia.

Ma cosa vuol dire attualmente «scienze pasteuriane»? Ebbene, oggi, attraverso il lavoro che la Fondazione ha fatto in questi anni, ma soprattutto attraverso i contatti con l'Istituto Pasteur e con gli Istituti Pasteur sparsi in tutto il mondo, mi sembra veramente che i termini «scienze pasteuriane» o «comunità pasteuriana» abbiano, proprio oggi, un grande significato. Mi sembra che l'essenza di questo significato stia nel rapporto originalissimo tra ricerca fondamentale e applicazione; qualcosa di diverso, in qualche modo, dalla ricerca che chiamiamo «finalizzata», perché è una ricerca in cui l'impronta fondamentale è determinante, una ricerca, quella che si è svolta al Pasteur, strettamente intrecciata per tutto questo secolo all'avanzare delle frontiere della biologia, ma in cui continua quell'originalissimo rapporto tra ricerca di base, tra la frontiera della biologia e l'applicazione che ne è conseguenza immediata, conferma, stimolo.

Ma non voglio portar via tempo, vorrei arrivare al problema che ci si proponeva all'inizio dell'attività della Fondazione. Quale può essere l'originalità di questo Istituto Pasteur tutto particolare, ciò che può distinguerlo da altri enti erogatori di fondi, qual'è la funzione che può esercitare. I risultati dell'ultimo triennio di questo lavoro sono riassunti nella pubblicazione che proprio il centenario Pasteur ci ha spinto a preparare per questa occasione.

La prima scelta è stata la formazione di giovani ricercatori all'estero. Ci è sembrato allora, e mi pare che fino a oggi la scelta si sia rivelata giusta, che questa attività di formazione fosse un punto essenziale per lo sviluppo della ricerca nell'Università di Roma: che si toccasse in questo settore un nodo fondamentale della nostra necessità di interagire strettamente con l'Istituto Pasteur e molti altri centri di ricerca. Si trattava di favorire la formazione, ma anche altri centri di ricerca. Si trattava di favorire la formazione, ma anche di stabilire collaborazioni internazionali che si sono poi mantenute e sviluppate anche dopo il ritorno a Roma dei giovani ricercatori.

Abbiamo poi scelto alcune linee di ricerca, su cui impegnare la Fondazione. Credo si possa dire che si è trattato in tutti i casi di ricerche aventi un'impronta fortemente interdisciplinare, a carattere generalmente fondamentale, ma in alcuni casi strettamente legate ad applicazioni pratiche.

Rhabdovirus ed epidemiologia della rabbia silvestre. È stato uno dei primi programmi della Fondazione e si è concluso quest'anno con un convegno tenuto a Sirmione e Trento. Si è trattato di una ricerca dedicata, nella sua parte di base, ai meccanismi di penetrazione dei rhabdovirus in diversi tipi di cellule, ma allo stesso tempo, in collaborazione con il Ministero della Sanità, è stato svolto un ampio programma di vaccinazione delle volpi mediante esche contenenti vaccino vivo e attenuato nelle province di Trento, Brescia e Bolzano. Tale programma ha praticamente arrestato la diffusione della rabbia silvestre in Italia.

Ingegneria genetica: banca degli enzimi e dei precursori. Nato originariamente da un'idea di F. Amaldi, questo progetto rappresenta un tipo di contributo alle ricerche di ingegneria genetica abbastanza originale e diverso da quanto fanno altri enti erogatori di fondi. La istituzione della banca non ha soltanto consentito una diminuzione dei costi, ma ha rappresentato soprattutto uno stimolo all'uso delle nuove tecnologie del DNA ricombinante. È infatti possibile per chiunque voglia iniziare l'uso delle nuove tecniche, rivolgersi senza formalità alla banca. Ai programmi sopra menzionati, che hanno avuto inizio con l'attività della Fondazione, altri se ne sono aggiunti nel secondo triennio.

Genetica dei parassiti e vettori. La possibilità di combattere le malattie provocate da parassiti dipende in larga misura da una definizione precisa delle entità tassonomiche responsabili: agenti patogeni e vettori. Tale definizione è spesso difficile se è basata solo sui dati di morfologia convenzionale. Dunque lo studio dei metodi genetici applicati allo studio dei parassiti e vettori, lo studio dei meccanismi di speciazione, è una condizione indispensabile per avare programmi di controllo efficaci e per studiare i modelli di rapporto parassita/ospite.

Un primo sottoprogetto riguarda la caratterizzazione tassonomica di certi gruppi con analisi di sistemi gene-enzima. Un secondo sottoprogetto riguarda l'analisi cromosomica e epidemiologica dei vettori di malaria in Africa tropicale e ha portato, ad esempio, alla identificazione di specie diverse a diversa antropofilia, identificabili soltanto in base all'analisi cromosomica.

Regolazione della risposta immunitaria mediata da linfochine. È un programma volto a indagare il ruolo delle linfochine e in particolare dell'interferone gamma nel processo di attivazione dei macrofagi, dei linfociti T e B e delle cellule effettrici dell'immunità naturale. Di nuovo una ricerca di base ma in cui il legame con i problemi medici della regolazione dell'immunità e con le condizioni morbose che li coinvolgono sono evidenti.

Nuove sostanze ed attività antimicrobica. Il progetto riguarda la sintesi di vari derivati di composti di cui è già nota l'attività antibatterica e antifungina, che abbiano ad esempio diminuita tossicità o aumentata attività antimicrobica. Si tratta di una ricerca interdisciplinare perché tutti i nuovi composti vengono saggiati per l'attività antimicrobica, ecc., per stabilire i rapporti tra attività antimicrobica e struttura chimica.

Volge al fine il ciclo triennale e i nuovi programmi a cui andiamo pensando hanno una ancor più forte impronta interdisciplinare.

Stiamo anche pensando a varie ipotesi di ampliamento delle attività della Fondazione e alla possibilità di istituire laboratori propri dell'Istituto Pasteur di Roma ed è anche per questo, per il collegamento sempre più stretto che vogliamo stabilire con l'Istituto Pasteur di Parigi, che ringraziamo ancora una volta il Prof. Schwartz di aver partecipato a questa manifestazione.

Tipolitografia SAT - 06013 Lama (PG)