



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia  
tel: +420 517 363 321-4 e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

## **1E. Măsurile de siguranță după administrarea înzecită a dozei maxime recomandate – șoarece alb de laborator**

### Rezumat:

Vaccinul Lysvulpen por. ad us. vet. a fost testat după administrarea de zece ori a dozei maxime recomandate a virusului testat asupra a 25 de subiecți șoareci de laborator pe cale subcutanată (s.c.) dar și asupra altor 25 de subiecți șoareci de laborator pe cale orală (p.o.). În 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. nu au fost înregistrate simptome de turbare/rabie asupra șoarecilor experimentali. După încheierea perioadei de examinare, șoarecii au fost exterminați iar virusul rabic nu a fost demonstrat prin imunofluorescență în cortexul cerebral, cerebel, medulla oblongata sau în colțul Amon. Turbarea nu s-a manifestat în niciunul dintre animalele experimentale. Stabilirea anticorpilor antirabici a avut rezultat pozitiv în 1, 2, 3 și 6 luni după administrarea virusului.

### Dezbateri:

Șoarecele alb de laborator este extrem de sensibil la rabie și din acest motiv este folosit pentru diagnosticarea acesteia în cadrul experimentelor biologice. Șoarecele alb de laborator este un model corespunzător pentru testarea patogenității reziduale a virusului rabic, în scopul imunizării orale a vulpilor și a altor animale carnivore împotriva turbării. După administrarea subcutanată, chiar și după cea orală, nu a putut fi demonstrată nicio formă de turbare la animalele experimentale. După administrarea virusului, au fost descoperiți la toate animalele testate anticorpi specifici de neutralizare a virusului. Rabia nu a putut fi demonstrată pe durata perioadei de monitorizare de 180 de zile (după administrarea virusului testat la animalele parte din acest experiment). După finalizarea perioadei de observație, toate animalele au fost exterminate nedescoperindu-se niciun fel de tip de turbare în respectivele părți ale creierului (laboratorul a utilizat imunofluorescența).

Perioada de monitorizare de 180 de zile este în mod general considerată ca suficientă pentru manifestarea simptomelor de rabie la toate speciile de animale. Metoda imunofluorescenței este considerată ca fiind una sensibilă și de încredere pentru diagnosticarea rabiei la toate speciile de animale.

### Concluzii:

Siguranța Lysvulpen por. ad us. vet. a fost demonstrată după administrarea orală și subcutanată de zece ori a dozei maxime recomandate asupra șoarecilor albi de laborator. Această concluzie este sprijinită de rezultatele observației clinice a unor șoareci experimentali timp de 180 de zile după administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. și după examinarea ulterioară a creierului lor cu rezultate negative în ceea ce privește prezența virusului rabic.



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia  
tel: +420 517 363 321-4 e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

## Lista și caracteristicile animalelor implicate în testarea siguranței

### a) Administrare subcutanată

Nr. crt. șoarece	Nr. ID șoarece	Caracteristicile animalelor			Observații
		Vârsta	Sex	Starea sănătății	
1.	MB1	1 lună	♀	bună	
2.	MB2	1 lună	♂	bună	
3.	MB3	1 lună	♀	bună	
4.	MB4	1 lună	♀	bună	
5.	MB5	1 lună	♂	bună	
6.	MB6	1 lună	♂	bună	
7.	MB7	1 lună	♀	bună	
8.	MB8	1 lună	♀	bună	
9.	MB9	1 lună	♀	bună	
10.	MB10	1 lună	♂	bună	
11.	MB11	1 lună	♂	bună	
12.	MB12	1 lună	♀	bună	
13.	MB13	1 lună	♂	bună	
14.	MB14	1 lună	♀	bună	
15.	MB15	1 lună	♂	bună	
16.	MB16	1 lună	♀	bună	
17.	MB17	1 lună	♂	bună	
18.	MB18	1 lună	♀	bună	
19.	MB19	1 lună	♀	bună	
20.	MB20	1 lună	♂	bună	
21.	MB21	1 lună	♂	bună	
22.	MB22	1 lună	♀	bună	
23.	MB23	1 lună	♀	bună	
24.	MB24	1 lună	♀	bună	
25.	MB25	1 lună	♂	bună	



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia  
tel: +420 517 363 321-4 e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

**b) Administrare orală**

Nr. crt. șoarece	Nr. ID șoarece	Caracteristicile animalelor			Observații
		Vârstă	Sex	Starea sănătății	
1.	MB1	1 lună	♂	bună	
2.	MB2	1 lună	♀	bună	
3.	MB3	1 lună	♂	bună	
4.	MB4	1 lună	♀	bună	
5.	MB5	1 lună	♀	bună	
6.	MB6	1 lună	♂	bună	
7.	MB7	1 lună	♀	bună	
8.	MB8	1 lună	♂	bună	
9.	MB9	1 lună	♀	bună	
10.	MB10	1 lună	♀	bună	
11.	MB11	1 lună	♂	bună	
12.	MB12	1 lună	♂	bună	
13.	MB13	1 lună	♀	bună	
14.	MB14	1 lună	♀	bună	
15.	MB15	1 lună	♀	bună	
16.	MB16	1 lună	♂	bună	
17.	MB17	1 lună	♂	bună	
18.	MB18	1 lună	♂	bună	
19.	MB19	1 lună	♀	bună	
20.	MB20	1 lună	♀	bună	
21.	MB21	1 lună	♀	bună	
22.	MB22	1 lună	♂	bună	
23.	MB23	1 lună	♂	bună	
24.	MB24	1 lună	♀	bună	
25.	MB25	1 lună	♂	bună	



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia  
tel: +420 517 363 321-4 e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

## **PROTOCOL DE TESTARE**

### **a) Descrierea metodelor utilizate**

#### **a1) Monitorizarea și evaluarea reacțiilor adverse**

Observarea reacțiilor adverse și înregistrarea acestora, a simptomelor clinice asociate turbării – comportament schimbat, schimbarea vocii, pareza mușchilor, paralizia mușchilor, acumularea și excreția salivei, paralizia grupelor de mușchi toate ducând la decesul animalului.

#### **a2) Diagnosticarea „postmortem” a rabiei**

Imunofluorescență directă (Dean și Abelseths, 1973).

#### **a3) Stabilirea anticorpilor antirabici**

Testul FAVN – detectarea anticorpilor antirabici (Cliquet și Barrat, 1996).

### **b) Descrierea instrumentelor și echipamentelor utilizate**

- seringă de 1 ml cu aplicator
- seringă de 0.1 ml – tip Hamilton
- microscop imunofluorescență, lame
- instrumente de disecție
- frigider 2-8° C, congelator -18° C, contor congelare puternică -80° C
- termostat 37° C cu 5% CO<sub>2</sub>
- vase de plastic pentru lucrul cu culturi de țesut
- pipete pentru lucrul cu culturi de țesut.

### **c) Descrierea materialului utilizat:**

- jurnal pentru înregistrarea stării clinice zilnice a animalului
- material testat MSV Bio 10+1 de zece ori doza maximă de vaccin utilizat
- conjugat antirabic
- standarde pentru randamentul imunofluorescenței directe și a testului FAVN

### **d) Utilizarea animalelor pentru testare:**

#### **d1) Specii**

- șoarece

#### **d2) Categoria animalului**



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia  
tel: +420 517 363 321-4 e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

- șoarece alb de laborator

**d3) Originea animalului**

- Anlab, Praga

**d4) Identificarea animalului**

- animalele experimentale au fost așezate într-o cuvă de reproducere pe toată durata experimentului

**d5) Numărul animalelor**

- 50 de subiecți

**d6) Condiții pentru așezarea și păstrarea animalelor**

- animalele experimentale au fost așezate într-o cuvă de reproducere

**d7) Hrănirea animalelor**

- dietă granulată, apă și libitum

**d8) Numele proprietarului animalelor**

- Bioveta, a.s. cu sediul în Ivanovice na Hané

**e) Doza de administrare, metoda de administrare, graficul de administrare, monitorizarea temperaturii și observarea reacțiilor adverse clinice:**

- Doza de administrare** - 0,2 ml de virus rabic de testare pe cale subcutanată, 0,05 ml de virus rabic de testare pe cale orală
- Metoda de administrare** - se utilizează o seringă cu un volum de 1 ml și de 0,1
- Graficul de administrare** - virusul de testare a fost administrat o singură dată prin metoda artificială
- Observarea reacțiilor adverse** - șoarecii experimentali au fost monitorizați zilnic fiind înregistrate toate reacțiile adverse sau neobișnuite ale animalelor, cu accent pe prezența rabiei
- Diagnosticarea „postmortem” a rabiei** - rabia a fost diagnosticată din cortexul cerebral, cerebel, medulla oblongata și colțul Amon prin imunofluorescență directă (Dean și Abelseth, 1973).
- Stabilirea anticorpilor antirabici** - anticorpii antirabici au fost stabiliți din serurile animalelor testate extrase la intervale fixe. Anticorpii antirabici au fost stabiliți prin testul FAVN (Cliquet și Barrat, 1996).



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia  
tel: +420 517 363 321-4 e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

**Numele, adresa, funcția și calificarea cercetătorului:**

**Medic Veterinar Dr. Vladimír Vrzal, CSc.**

Data nașterii: 26 noiembrie 1953

**Educație:**

- 1969-1973: Școala Secundară Tehnică și de Agricultură – studii veterinare, Kroměříž
- 1973-1979: Universitatea Veterinară, Brno
- 01/04/1979: Bioveta Ivanovice na Hané, orientarea angajaților
- 1979-1980: Serviciul militar în cadrul departamentului veterinar al poliției de frontieră
- 1980-1987: Controlor tehnic independent, Managementul și Controlul Calității
- 1985-1990: Lucrarea de disertație a candidatului asupra disciplinei Igiena și Epidemiologia Animalelor
- 1987-1995: Director al Departamentului Managementul și Controlul Calității
- 1995-1998: Manager Producție la Bioveta, s.r.o.
- 1998-2003: Director Producție și Dezvoltare a Produselor Biologice Veterinare
- 2003-2007: Director Inovație și Dezvoltare a Produselor Biologice
- Începând cu 01/01/2007: Director Adjunct al Companiei, Manager de Proiect, Bioveta, a.s.

**Membru în organizații profesionale:**

Societatea Cehoslovacă de Microbiologie – din 1980

Societatea Științifică Cehoslovacă de Microbiologie – din 1980

Societatea Cehoslovacă de Imunologie – din 1981

**Activitate profesională:**

**Publicații:**

Autor și co-autor a 131 de publicații științifice

**Certificate de autor:**

Autor și co-autor a 25 de patente/ brevete

**Rapoarte finale peer view (comitet de referenți)**



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia  
tel: +420 517 363 321-4 e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

Autor și co-autor a 23 de rapoarte finale asupra unor produse introduse în practică

*Experiență profesională:* imunologie, virusologie

**Medic Veterinar Dr. Vladimír Vrzal, CSc.**



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia

tel: +420 517 363 321-4

e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

## Verificarea vaccinului Lysvulpen pe șoarecii albi de laborator

### a) Administrarea subcutanată a 0,2 ml de virus testat

Nr. șoarece alb de laborator	Administrarea subcutanată a virusului LYSVULPEN	Clinic (180 de zile)	Recoltare sânge (IU/ml)				Post mortem - IF			
			0- <i>inic</i>	1 <i>lună</i>	3 <i>luni</i>	6 <i>luni</i>	<i>cortex</i>	<i>cerebel</i>	<i>medulla oblongata</i>	<i>colț Amon</i>
1.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,87	0,96	0,33	neg.	neg.	neg.	neg.
2.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,65	0,80	0,48	neg.	neg.	neg.	neg.
3.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,85	0,92	0,51	neg.	neg.	neg.	neg.
4.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,73	0,88	0,44	neg.	neg.	neg.	neg.
5.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,75	0,93	0,56	neg.	neg.	neg.	neg.
6.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,68	0,81	0,51	neg.	neg.	neg.	neg.
7.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,75	0,89	0,48	neg.	neg.	neg.	neg.
8.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,65	0,84	0,44	neg.	neg.	neg.	neg.
9.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,93	0,99	0,61	neg.	neg.	neg.	neg.
10.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,58	0,71	0,35	neg.	neg.	neg.	neg.
11.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,82	0,92	0,64	neg.	neg.	neg.	neg.
12.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,71	0,89	0,52	neg.	neg.	neg.	neg.
13.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,87	0,95	0,55	neg.	neg.	neg.	neg.
14.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,96	0,99	0,73	neg.	neg.	neg.	neg.
15.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,84	0,96	0,70	neg.	neg.	neg.	neg.
16.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,98	0,99	0,69	neg.	neg.	neg.	neg.





BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia

tel: +420 517 363 321-4

e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

17.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,80	0,97	0,52	neg.	neg.	neg.	neg.
18.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,77	0,88	0,50	neg.	neg.	neg.	neg.
19.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,57	0,73	0,36	neg.	neg.	neg.	neg.
20.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,69	0,81	0,48	neg.	neg.	neg.	neg.
21.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,59	0,77	0,33	neg.	neg.	neg.	neg.
22.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,73	0,87	0,53	neg.	neg.	neg.	neg.
23.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,81	0,95	0,62	neg.	neg.	neg.	neg.
24.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,74	0,88	0,51	neg.	neg.	neg.	neg.
25.	0,2 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,86	0,92	0,58	neg.	neg.	neg.	neg.
<b>Rezultat</b>		<b>neg.</b>	<b>0</b>	<b>0,77</b>	<b>0,89</b>	<b>0,52</b>	<b>neg.</b>	<b>neg.</b>	<b>neg.</b>	<b>neg.</b>

### Verificarea vaccinului Lysvulpen pe șoarecii albi de laborator

#### b) Administrarea orală a 0,05 ml de virus testat

Nr. șoarece alb de laborator	Administrarea orală a virusului LYSVULPEN	Clinic (180 de zile)	Recoltare sânge (IU/ml)				Post mortem - IF			
			0- <i>inic</i>	1 <i>lună</i>	3 <i>luni</i>	6 <i>luni</i>	<i>cortex</i>	<i>cerebel</i>	<i>medulla oblongata</i>	<i>colț Amon</i>
1.	0,05 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,35	0,51	0,44	neg.	neg.	neg.	neg.
2.	0,05 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,41	0,58	0,49	neg.	neg.	neg.	neg.
3.	0,05 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,29	0,44	0,38	neg.	neg.	neg.	neg.
4.	0,05 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,44	0,61	0,52	neg.	neg.	neg.	neg.
5.	0,05 x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,38	0,53	0,49	neg.	neg.	neg.	neg.



BIOVETA a.s. Komenského 212, 683 23, Ivanovice na Hané, Republica Cehia

tel: +420 517 363 321-4

e-mail: [comm@bioveta.cz](mailto:comm@bioveta.cz)

6.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,52	0,77	0,47	neg.	neg.	neg.	neg.
7.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,68	0,83	0,65	neg.	neg.	neg.	neg.
8.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,44	0,72	0,48	neg.	neg.	neg.	neg.
9.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,39	0,55	0,43	neg.	neg.	neg.	neg.
10.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,62	0,82	0,60	neg.	neg.	neg.	neg.
11.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,59	0,80	0,66	neg.	neg.	neg.	neg.
12.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,51	0,74	0,58	neg.	neg.	neg.	neg.
13.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,66	0,88	0,68	neg.	neg.	neg.	neg.
14.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,49	0,66	0,52	neg.	neg.	neg.	neg.
15.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,50	0,72	0,52	neg.	neg.	neg.	neg.
16.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,66	0,83	0,68	neg.	neg.	neg.	neg.
17.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,48	0,59	0,53	neg.	neg.	neg.	neg.
18.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,37	0,49	0,45	neg.	neg.	neg.	neg.
19.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,53	0,77	0,55	neg.	neg.	neg.	neg.
20.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,59	0,76	0,61	neg.	neg.	neg.	neg.
21.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,44	0,67	0,50	neg.	neg.	neg.	neg.
22.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,38	0,49	0,42	neg.	neg.	neg.	neg.
23.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,57	0,72	0,59	neg.	neg.	neg.	neg.
24.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,51	0,79	0,52	neg.	neg.	neg.	neg.
25.	$0,05 \times 10^{9,0}$ TCID <sub>50</sub>	neg.	0	0,59	0,77	0,59	neg.	neg.	neg.	neg.
<b>Rezultat</b>		<b>neg.</b>	<b>0</b>	<b>0,50</b>	<b>0,68</b>	<b>0,53</b>	<b>neg.</b>	<b>neg.</b>	<b>neg.</b>	<b>neg.</b>

## **Studiu privind siguranța tulpinii virusului rabic SAD Bio-10 asupra șoarecilor imunodeficienți**

V. Vrzal

Bioveta a.s., Ivanovice na Hané, Republica Cehia

**REZUMAT:** Având ca bază recomandarea OMS (Organizației Mondiale a Sănătății), patogenitatea reziduală a tulpinii virusului rabic SAD Bio-10 pentru vaccinare (componentă a vaccinului Lysvulpen por. ad us. vet.) a fost testată pe șoareci imunodeficienți din clasa Nud (fără păr) (CRL: CD1-FOXN1 NU) și pe cei din clasa SCID (CB17/ICR-PRKDC-SCID). O cantitate de  $0,02 \text{ ml} \times 10^{9,0} \text{ TCID}_{50}$  de tulpină de virus a fost administrată la câte 10 șoareci din fiecare clasă pe cale orală și la câte alți 10 șoareci din fiecare clasă pe cale intramusculară. Zece șoareci din fiecare clasă au rămas ca puncte de control fără a li se administra virusul. Animalele au fost monitorizate timp de 28 de zile. Ulterior, animalele care au supraviețuit au fost exterminate și diferite părți ale corpului lor au fost examinate prin imunofluorescență directă (creierul) și prin metoda PCR (restul de mostre prelevate), cercetându-se prezența rabiei. De asemenea, apariția anticorpilor antirabici, anterior și ulterior administrării virusului, a fost cercetată cu ajutorul testului FAVN.

Din 10 șoareci din clasa Nud (CRL: CD1-FOXN1 NU) cărora le-a fost administrat virusul pe cale orală, s-a descoperit rabie la 1 șoarece. Similar, din 10 șoareci din clasa Nud (CRL: CD1-FOXN1 NU) cărora le-a fost administrat virusul pe cale intramusculară, s-a descoperit rabie la 1 șoarece.

În ceea ce privește clasa SCID (CB17/ICR-PRKDC-SCID), nu s-a descoperit rabie la niciunul din cei 10 șoareci cărora le-a fost administrat virusul pe cale orală, și s-a descoperit rabie la 4 șoareci din 10 cărora le-a fost administrat virusul pe cale intramusculară.

**CUVINTE CHEIE:** rabie/turbare, virus de vaccinare, Bio-10, patogenitate reziduală, șoarece imunodeficientar, administrarea orală, administrare intramusculară, mortalitate.

Imunizarea pe cale orală a animalelor sălbatice împotriva rabiei a devenit parte integrantă din lupta împotriva acestei boli fatale atât în Europa cât și în America de Nord.

Orice vaccin oral pentru imunizarea animalelor sălbatice ar trebui să fie eficient (de exemplu, să producă imunitate protectoare la speciile de animale țintă) și trebuie să fie inofensiv atât pentru speciile de animale țintă cât și pentru cele care nu sunt țintă. Caracterul inofensiv este evaluat la speciile de animale țintă dar și la alte specii de animale (care nu sunt țintă) care pot intra în contact cu vaccinul în urma răspândirii lui în mediul înconjurător. Vaccinul nu trebuie nici să inducă rabia la animale și nici s-o răspândească animalelor sensibile la această boală prin intermediul celor vaccinate.

Organizația Mondială a Sănătății (OMS)<sup>1</sup>, Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (OMSA)<sup>2,3</sup> și Farmacopeea Europeană<sup>4</sup> au identificat condiții și au publicat recomandări legate de cerințele vaccinurilor intenționate a fi utilizate pentru imunizarea orală a animalelor sălbatice. Din moment ce există posibilitatea ca persoane slab imunizate să intre în contact cu virusul rabic vaccinabil folosit pentru imunizarea orală a animalelor în libertate, OMS<sup>5</sup> a recomandat realizarea de teste adiționale de siguranță pe animale de laborator imuno deficitare – șoareci.

## **MATERIALE ȘI METODE**

A fost folosită tulpina virusului rabic SAD Bio-10 (derivată din tulpina SAD Bern) în primul lot de producție (MSV + 1). Titrul folosit al tulpinii virusului rabic SAD Bio-10 a fost  $10^{9,0}$  TCID<sub>50</sub> per ml care este înzecit față de titrul maxim al virusului din vaccinul Lysvulpen por. ad us. vet. folosit în teren. Virusul era identic cu cel utilizat în mod obișnuit pentru prepararea vaccinului oral Lysvulpen por. ad us. vet. în vederea imunizării animalelor sălbatice împotriva rabiei.

## **ANIMALE DE STUDIU**

Grupul animalelor de studiu a fost alcătuit din 30 de șoareci din clasa Nud (fără păr) (CRL: CD1-FOXN1 NU) și din 30 de șoareci din clasa SCDI (CB17/ICR-PRKDC-SCID), în vârstă de 3 luni, nevaccinați împotriva rabiei, absolut sănătoși, deparazitați, cu origine slab imunizată (Laboratoarele Charles River, Modele și Servicii de Cercetare GmbH, Germania). Animalelor li s-a permis să se adapteze timp de 7 zile într-un dispozitiv izolat înainte de administrarea virusului. După administrarea vaccinării virusului, animalele au fost ținute într-o cuvă de reproducere (10 șoareci într-o cuvă) pe întreaga perioadă de probă de 28 de zile. Dispozitivul izolat a fost echipat cu o linie de alimentare de aer steril. Hrana și apa au fost, de asemenea, sterile.

## **ADMINISTRAREA VIRUSULUI, RECOLTAREA DE SÂNGE ȘI PRELEVAREA PROBELOR**

Tulpina virusului rabic SAD Bio-10 a fost administrată șoarecilor în cantitate de 0,02 ml x  $10^{9,0}$  TCID<sub>50</sub> (de zece ori doza maximă folosită în teren pentru virusul de vaccinare). Au fost folosite două căi de administrare: orală (administrare prin cavitatea bucală) și intramusculară (administrare în mușchiul membrului pelvin). Nu au fost administrate medicamente sedative șoarecilor înainte de administrarea virusului. Pentru administrarea orală, șoarecele a fost imobilizat și după ce i s-a deschis gura, virusul test a fost administrat foarte încet cu ajutorul unei seringi (volum total de 0,1 ml) fără ac. Șoarecele a fost monitorizat în timp ce înghițea virusul pe durata administrării lente a acestuia. Pentru administrarea intramusculară, un ac foarte fin a fost atașat seringii și virusul a fost administrat intramuscular în mușchiul membrului pelvin al animalului. Șoarecii au fost monitorizați zilnic cu accent pe apariția simptomelor de rabie. În perioada de 28 de zile de monitorizare, s-a recoltat sânge de la toate animalele care au supraviețuit pentru a descoperi anticorpi antirabici în el, apoi animalele au fost exterminate. Mostre din creier, glandele salivare, splină, plămâni, esofag și mucoasă bucală au fost prelevate în timpul autopsiei pentru depistarea rabiei prin metoda imunofluorescenței și prin metoda PCR.

## **EXAMINAREA PROBELOR BIOLOGICE**

Mostrele de ser din sângele recoltat după testare au fost analizate pentru depistarea prezenței de anticorpi antirabici cu ajutorul testului FAVN.

Mostrele din creier, glandele salivare, splină, plămâni, esofag și mucoasă bucală au fost examinate prin metoda imunofluorescenței<sup>6</sup> sau prin metoda PCR pentru depistarea prezenței antigenului virusului.

## **REZULTATE**

Animalele de studiu au fost monitorizate zilnic și a fost înregistrată starea lor de sănătate. Imediat după decesul lor, șoarecii au fost colectați și depozitați la rece la temperaturi de 2° C - 8° C, supuși autopsiei prin care li s-au prelevat câteva organe care au fost examinate în vederea depistării rabiei prin imunofluorescență directă (creierul) și prin metoda PCR (alte mostre).

Din cei 10 șoareci din clasa Nud (CRL: CD1-FOXN1 NU) cărora le-a fost administrat virusul pe cale orală, 1 șoarece a fost infectat cu rabie și a murit din această cauză în 20 de zile. Similar, din cei 10 șoareci din clasa Nud (CRL: CD1-FOXN1 NU) cărora le-a fost administrat virusul pe cale intramusculară, 1 șoarece a fost infectat cu rabie și a murit din această cauză în 19 zile.

În ceea ce privește clasa SCID (CB17/ICR-PRKDC-SCID), nu s-a descoperit rabie la niciunul din cei 10 șoareci cărora le-a fost administrat virusul pe cale orală, și s-a descoperit rabie la 4 șoareci din 10 cărora le-a fost administrat virusul pe cale intramusculară; șoarecii afectați au murit în 15, 18, 20 și respectiv 21 de zile.

Rabia a fost descoperită prin examinarea prin imunofluorescență a creierului șoarecilor care au murit din cauza acestei boli. Mostre din organele care au rămas, de exemplu glandele salivare, splină, plămâni, esofag și mucoasă bucală au rezultat negativ în urma examinării PCR, cu excepția unei singure mostre de mucoasă bucală a unui singur șoarece din clasa Nud (CRL: CD1-FOXN1 NU) în urma administrării orale a virusului.

La momentul inițial, testul FAVN nu a descoperit anticorpi antirabici la șoareci. Nu au fost descoperiți anticorpi la șoarecii din clasa CRL: CD1-FOXN1 NU în urma administrării orale a virusului Bio-10. Anticorpi antirabici specifici la nivelurile 0,5 până la 0,87 IU/ml au fost descoperiți la toți șoarecii care au supraviețuit și cărora le-a fost administrat virusul pe cale intramusculară. În cazul clasei de șoareci CB17/ICR-PRKDC-SCID, nu au fost detectați anticorpi antirabici specifici nici după administrarea orală nici după cea intramusculară a virusului Bio-10.

## **DEZBATERI**

Multe țări din Europa s-au angajat în acest proiect, lansat în 1978, de vaccinare orală a animalelor sălbatice împotriva rabiei utilizând vaccinuri ce conțin tulpini vii reduse de rabie, derivate din tulpinile SAD. OMS a lansat o serie de recomandări legate de evaluarea caracterului inofensiv al vaccinurilor orale<sup>7-14</sup>. Cu toate acestea, utilizarea vaccinurilor este asociată cu unele riscuri ale patogenității reziduale reprezentate de derivatele tulpinii SAD.

Patogenitatea reziduală la șoareci și alte rozătoare a fost subiectul multor lucrări<sup>15,16,17</sup>. A fost descrisă turbarea la 1 pui de vulpe, 1 pisică și 1 jder de piatră în urma administrării orale a tulpinii SAD Bern. Rabia a fost identificată la 7 sconși din 11 animale cărora le-a fost administrat virusul vaccin SAD B-19 per os<sup>18</sup>.

La babuini, rabia a fost identificată la 2 din 4 animale cărora le-a fost administrată tulpina SAD Bern pe cale orală<sup>19</sup>.

Un caz de rabie în Austria identificat la o vulpe după administrarea de tulpină de vaccin a fost confirmat prin documente<sup>20</sup>. Patru vulpi cu rabie indusă de virusul SAD B19 au fost identificate în Germania în timpul campaniilor de vaccinare orală împotriva rabiei din 2001, 2002, 2004 și 2005<sup>21</sup>.

Din păcate, acest risc este indicat și de noile vaccinuri antirabice. Tulpina mutagenă de rabie SAG 1 reține patogenitate reziduală în urma administrării intracerebrale la șoareci sugari. Unei femei tinere, mușcată de un câine când încerca să îi îndepărteze din gură mâncarea momeală, i-au apărut leziuni ale pielii de tipul variolei, din cauza recombinantului de tulpină de rabie VRG.<sup>22</sup>

Cazul de patogenitate reziduală al tulpinii SAD Bern, în urma administrării orale a 2 ml la titru de  $10^{7,5}$  TCID<sub>50</sub> fiecăruia dintre cei 4 babuini și care a indus rabie fatală la 2 dintre aceștia (perioadă de incubare între 11 și 13 zile)<sup>19</sup>, a fost citat în mod frecvent în legătură cu apariția acesteia la derivatele tulpinii SAD. Organizația Mondială a Sănătății<sup>5</sup> recomandă testarea patogenității tulpinilor de virus rabic utilizate în prepararea vaccinurilor antirabice pentru imunizarea orală a animalelor sălbatice dar și a animalelor cu imunitate slabă. De fapt, contactul unei persoane cu imunitate slabă cu vaccinuri de virus rabic folosite pentru imunizarea animalelor sălbatice împotriva acestei boli nu este complet imposibil. Urmând recomandările relevante ale OMS<sup>5</sup>, am decis să testăm pe șoareci cu imunitate scăzută caracterul inofensiv al tulpinii de virus rabic Bio-10 care este conținută de vaccinul Lysvulpen por. ad us. vet.

A fost descrisă testarea realizată pe șoareci cu imunitate slabă din clasele Nud (CD1-nu/nu) și SCID<sup>17</sup>. Tulpina SAD B19 a fost administrată șoarecilor pe cale orală și intramusculară în cantitate de 0,02 ml de  $2,5 \times 10^{7,0}$  FFU. În urma administrării orale, 2 dintre cei 6 șoareci din clasa Nud au murit de rabie (Ziua 15) în timp ce niciunul dintre cele 6 exemplare din clasa SCID nu a contactat boala. În urma administrării intramusculare, toți cei 6 șoareci din clasa Nud și 5 șoareci din 6 din clasa SCID au murit. Toate animalele experimentale cărora nu le-a fost administrat virusul au rămas sănătoase.

Artois<sup>16</sup> a analizat patogenitatea potențială a tulpinilor de rabie în rozătoarele sălbatice, tulpini destinate imunizării orale antirabice a animalelor sălbatice. El a folosit virusuri vaccin cu tulpini V-RG, SAG-1, SAD Bern și SAD B19. Patogenitatea potențială a fost examinată după administrarea fiecărei tulpini de vaccinare în cavitatea bucală într-o doză de 0,03 ml cu ajutorul unei micro-pipete. Când s-a folosit tulpina SAD Bern, rabia a fost observată la 1 dintre cele 8 exemplare din specia *Apodemus flavicollis* (sero conversia împotriva rabiei n-a fost demonstrată la niciunul dintre cei 7 șoareci care au supraviețuit); niciunul dintre cei 6 șoareci din specia *Clethrionomys glareolus* nu a contactat rabie (2 șoareci au prezentat sero conversie împotriva rabiei); și 1 din cei 4 șoareci din specia *Microtus agrestis* au contactat rabie (3 șoareci au prezentat sero conversie împotriva rabiei). Rezultate similare au fost obținute prin vaccinarea cu tulpina SAD B19.

Testarea clinică a caracterului inofensiv al tulpinii de virus rabic Bio-10, care este o componentă a vaccinului folosit pentru imunizarea orală a animalelor sălbatice comercializat sub numele de Lysvulpen, a fost realizată în condiții Optime de Practică de Laborator în cadrul infrastructurii de la Bioveta a.s. din Ivanovice na Hané, Republica Cehia. Șoarecii au fost ținuti în izolare în 6 cuve de reproducere, au fost hrăniți o dată pe zi și au avut apă la discreție. Identificarea animalelor a fost asigurată prin etichetarea cuvelor. Primul lot de producție al virusului Master

seed (MSV + 1) a fost utilizat pentru testare. Documentul OMS recomandă utilizarea unui titru maxim înzecit în teren. Deci, o doză de  $10^{9,0}$  TCID<sub>50</sub> per ml a fost utilizată în acest test.

Conținutul de virus SAD Bio-10 al unei doze de vaccin Lysvulpen por. ad uş. vet. nu este mai mică de  $1,8 \text{ ml} \times 10^{6,0}$  TCID<sub>50</sub> / ml și nici mai mare de  $1,8 \text{ ml} \times 10^{8,0}$  TCID<sub>50</sub>/ ml. Deci, doza maximă înzecită a fost  $1,8 \text{ ml} \times 10^{9,0}$  TCID<sub>50</sub>/ ml. Luând în considerare greutatea animalului experimental (șoarece), doza totală administrată a fost redusă: volumul virusului Bio-10 folosit pentru administrarea orală sau intramusculară a fost de 0,02 ml.

Greutatea șoarecilor experimentali a fost între 20 și 25 g, vârsta de 3 luni. Animalelor li s-a permis să se adapteze timp de 7 zile înainte de începerea testului. Pe perioada cât șoarecii au fost supuși examinării clinice, starea lor de sănătate a fost bună.

Animalele nu au fost nici anesteziate nici sedate. De fapt, anestezia sau sedarea pot conduce la administrarea incorectă a virusului: virusul poate pătrunde în cavitățile nazale unde nu poate intra în condiții fiziologice normale. Cavitățile nazale sunt foarte sensibile la contactarea rabiei. Administrarea rapidă a virusului vaccin în cavitatea bucală poate, de asemenea, modifica în mod necorespunzător calea de pătrundere a virusului în corpul animalului. Noi am administrat virusul cu o seringă specială cu volum de 0,1 ml. Șoarecii au fost imobilizați iar virusul a fost aplicat la rădăcina limbii. Datorită administrării lente șoarecele a înghițit virusul, deci efectul fiziologic a fost identic cu cel scontat dacă animalul ar fi mâncat o momeală ce conținea virusul în cadrul unei campanii naturale de imunizare. Pentru administrarea intramusculară, seringii i s-a atașat un ac foarte fin și virusul a fost administrat adânc intramuscular în mușchiul membrul pelvin al animalului. Volumul utilizat, 0,02 ml este foarte mic pentru o aplicare exactă cu o seringă obișnuită. Prin urmare, s-a folosit o seringă specială cu volum de 0,1 ml astfel încât volumul mic să poată fi administrat cu o precizie corespunzătoare. Faptul că virusul a intrat în contact cu organele imuno competente prin administrare intramusculară a fost evidențiat prin formarea de anticorpi antirabici de neutralizare a respectivului virus, observată la șoarecii din clasa CRL: CD1-FOXN1 NU în 28 de zile de la administrarea virusului. Anticorpii antirabici de neutralizare a virusului au fost detectați cu ajutorului testării FAVN, o metodă care permite titrului anticorpilor antirabici specifici să se exprime în unități recunoscute la nivel internațional (UI/ml). Nu au fost detectați anticorpi antirabici specifici la clasele de șoareci rămase în urma administrării virusului pe alte căi.

Din cei 10 șoareci din clasa Nud (CRL: CD1-FOXN1 NU) cărora le-a fost administrat virusul Bio-10 pe cale orală, 1 șoarece a contactat rabie. Și în mod similar, din cei 10 șoareci din clasa Nud (CRL: CD1-FOXN1 NU) cărora le-a fost administrat virusul Bio-10 pe cale intramusculară, 1 șoarece a fost depistat cu rabie.

În ceea ce privește clasa SCID (CB17/ICR-PRKDC-SCID), nu a fost depistată rabia la niciunul dintre șoarecii cărora le-a fost administrat virusul pe cale orală, și s-a depistat la 4 șoareci din 10 cărora le-a fost administrat virusul pe cale intramusculară.

Rezultatele sunt similare acelor obținute în cazul administrării altor virusuri rabice folosite pentru imunizarea orală a animalelor sălbatice împotriva acestei boli și indică o patogenitate reziduală relativ scăzută a tulpinii SAD Bio-10 în urma administrării la 2 clase de șoareci imunodeficienți.

## BIBLIOGRAFIE

1. Blancou J, Meslin FX. *Modified live-virus rabies vaccines for oral immunization of carnivores*. În: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*, a 4-a ediție, Geneva: Organizația Mondială a Sănătății, 1996, 324-37.
2. Bingham J, Foggin CM, Gerber H, et al. *Pathogenicity of SAD rabies vaccine given orally in chacma baboons (*Papio ursinus*)*, Vet Rec 1992, 131: 55 -6.
3. Dean și Abelseth, 1973.
4. *Rabies Vaccine (Live, oral) for foxes, Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem*, Farmacopeea Europeană 2007, 9.952-953.
5. WHO Expert Consultation on Rabies, OMS Geneva, WHO Technical Report Series, 2005, nr. 931, p. 87.
6. Capitolul Rabia (2.1.13) din Manualul OIE, 2008, paragraful despre vaccinarea orală.
7. *The oral vaccination of foxes against rabies*, Raport al Comisiei Științifice asupra Sănătății și Bunăstării Animalelor, 2002, p. 55.
8. Al Optulea Raport al Comisiei de Experți a OMS asupra rabiei, OMS, Geneva, 1992.
9. Raport al Departamentului de Consultare al OMS asupra cerințelor și criteriilor de testare în teren a vaccinului antirabic asupra câinilor și carnivorelor sălbatice, Geneva, 1-2 martie 1989, doc. EHO/Rab.Res./89-32.
10. Raport al celui de-al 3-lea Departament de Consultare al OMS asupra imunizării orale a câinilor împotriva rabiei, Geneva, 21-22 iulie 1992, Doc WHO/Rab.Res./92.38.
11. Cea de-a 4-a ședință de analiză asupra controlului rabiei în Europa, Piestany, 5-7 octombrie 1993.
12. Raport al celui de-al 4-lea Departament de Consultare al OMS asupra imunizării orale a câinilor împotriva rabiei, Geneva, 14-15 iunie 1993, Doc. WHO/Rab.Res./94.42.
13. Raport al celui de-al 5-lea Departament de Consultare al OMS asupra imunizării orale a câinilor împotriva rabiei, Geneva, 20-22 iunie 1994, Doc. WHO/Rab.Res./94.45.
14. Imunizarea orală a câinilor împotriva rabiei: raportul celui de-al 6-lea Departament de Consultare al OMS, Geneva, 24-25 iulie 1995, Doc WHO/EMC/ZDI/98.13, p.28.
15. Administrarea în teren a vaccinurilor antirabice orale pentru câini. consultare WHO-OIE, Geneva, 20-22 iulie 1998, WHO/EMC/ZD/98.15, p.24.
16. Mueller, T., Geue, L., Kliemt, J., Selhorst, T., Frost, J., Bunzenthall, C., Zimmer, K, Vanek, E., Revilla-Fernández, S., McElhinney, L., Fooks, A.: *Vaccine associated rabies cases in Germany and Austria*. RITA XVI, A 16-a conferință internațională asupra rabiei din America, Canada, 16-21 octombrie, 2005.
17. Elisabeth Vanek, Eveline Wodak, Sandra Revilla-Fernández, Zotán Bagó, Hermann Schildorfer, Andrea Hoeflechner, Michael Schoenbauer: *Fox rabies in Carinthia, Austria: A case report*. *Rabies Bulletin Europe*, volumul 28, nr. 2, Trimestrul 2, 2004, p.9.



18. Artois, M., Guittre, C., Thomas, I., Leblois, H., Brochier, B., și Barrat, J., (1992). *Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: a comparison Vaccine*, 10: 524-528.
19. Bingham, J., Foggin, C.M., Gerber, H., Hill, F.W.G., Kappeler, A., King, A., Perry, B.D., și Wandeler, A., (1992). *Pathogenicity of SAD vaccine rabies vaccine given orally in Chacma baboons (Papio ursinus)*, Vet. Rec., 131: 55-56.
20. Rupprecht, C.E., Charlton, K.M., Artois, M., Casey, G.A., Webster, W.A., Campbell, J.B., Lawson, K.F., și Schneider, L.G. (1990). *Ineffectiveness and comparative pathogenicity of attenuated rabies virus vaccines for the striped skunk (Mephitis mephitis)*. J. Wildl. Dis., 26: 99 – 102.
21. Rupprecht, C.E., Blass, L., Smith, K., Orcinari, L.A., Niezgoda, M., Whitfield, S.G., Gibbons, R.V., Guerra, M., și Hanlon, C.A., (2001). *Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus*. New England. J. Med., 345: 582-586.
22. Steck, F., Wandeler, A., Bischel, P., Haflinger, U., și Schneider, L., (1982). *Oral immunization of foxes against rabies. Laboratory and field studies*. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 5: 165-171.
23. Vos, A., Neubert, A., Aylan, O., Schuster, P., Pommerening, E., Müller, T., și Chivatsi, D.C., (1999). *An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species*. I. Epidermiol. Infect., 123: 165-75.









**Tabel 5**

**Bio-10: examinarea organelor, clasa de șoareci CRL: CD1-FOXN1 NU, administrare orală**

Șoarece #	Sex	Doză de virus (oral)	Examinarea post autopsie – IF și PCR						Rezultate clinice (28 de zile)
			<i>Creier</i>	<i>Glande salivare</i>	<i>Splină</i>	<i>Plămâni</i>	<i>Esofag</i>	<i>Mucoasă bucală</i>	
1	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	poz.*	N	N	N	N	N	poz.
2	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
6	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
7	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
8	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
9	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
10	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

\* - Stabilizat prin metoda imunofluorescenței (alte concluzii prin PCR)

N – Examinare neefectuată

**Tabel 6****Bio-10: examinarea organelor, clasa de șoareci CRL: CD1-FOXN1 NU, administrare intramusculară**

Șoarece #	Sex	Doză de virus (intramuscular)	Examinarea post autopsie – IF și PCR						Rezultate clinice (28 de zile)
			<i>Creier</i>	<i>Glande salivare</i>	<i>Splină</i>	<i>Plămâni</i>	<i>Esofag</i>	<i>Mucoasă bucală</i>	
1	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
6	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	poz.*	N	N	N	N	N	poz.
7	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
8	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
9	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
10	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

\* - Stabilizat prin metoda imunofluorescenței (alte concluzii prin PCR)

N – Examinare neefectuată

**Tabel 7**

**Bio-10: Lysvulpen por. ad us. vet: examinarea organelor, clasa de șoareci CB17/ICR-PRKDC-SCID, administrare orală**

Șoarece #	Sex	Doză de virus (oral)	Examinarea post autopsie – IF și PCR						Rezultate clinice (28 de zile)
			<i>Creier</i>	<i>Glande salivare</i>	<i>Splină</i>	<i>Plămâni</i>	<i>Esofag</i>	<i>Mucoasă bucală</i>	
1	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
6	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
7	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
8	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
9	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
10	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

\* - Stabilit prin metoda imunofluorescenței (alte concluzii prin PCR)

N – Examinare neefectuată



**Tabel 8**

**Bio-10: examinarea organelor, clasa de șoareci CB17/ICR-PRKDC-SCID, administrare intramusculară**

Șoarece #	Sex	Doză de virus (intramuscular)	Examinarea post autopsie – IF și PCR						Rezultate clinice (28 de zile)
			<i>Creier</i>	<i>Glande salivare</i>	<i>Splină</i>	<i>Plămâni</i>	<i>Esofag</i>	<i>Mucoasă bucală</i>	
1	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	poz.*	N	N	N	N	N	poz.
3	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	poz.*	N	N	N	N	N	poz.
5	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
6	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
7	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
8	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	poz.*	N	N	N	N	N	poz.
9	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	poz.*	N	N	N	N	N	poz.
10	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Neg.*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

\* - Stabilit prin metoda imunofluorescenței (alte concluzii prin PCR)

N – Examinare neefectuată

**Tabel 9****Bio-10: răspunsul anticorpilor, clasa de șoareci CRL: CD1-FOXN1 NU, administrare orală**

Șoarece #	Sex	Doză de virus (oral)	Anticorpi antirabici (IU/ml)		Observații
			0 (înaintea testării)	28 de zile (după testare)	
1	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	Nespecificat	Rabie – post mortem
2	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
3	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
4	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
5	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
6	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
7	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
8	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
9	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
10	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
<b>Rezultat</b>		<b>0,02 ml x 109,0 TCID<sub>50</sub>/ml</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

**Tabel 10****Bio-10: răspunsul anticorpilor, clasa de șoareci CRL: CD1-FOXN1 NU, administrare intramusculară**

Șoarece #	Sex	Doză de virus (intramuscular)	Anticorpi antirabici (IU/ml)		Observații
			0 (înaintea testării)	28 de zile (după testare)	
1	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,87	
2	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,50	
3	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,66	
4	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,50	
5	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,87	
6	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	Nespecificat	Rabie – pozitiv
7	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,55	
8	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,80	
9	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,65	
10	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0,75	
<b>Rezultat</b>		<b>0,02 ml x 10<sup>9,0</sup> TCID<sub>50</sub>/ml</b>	<b>0</b>	<b>0,68</b>	

**Tabel 11****Bio-10: răspunsul anticorpilor, clasa de șoareci SCID (CB17/ICR-PRKDC-SCID), administrare orală**

Șoarece #	Sex	Doză de virus (oral)	Anticorpi antirabici (IU/ml)		Observații
			0 (înaintea testării)	28 de zile (după testare)	
1	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
2	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
3	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
4	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
5	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
6	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
7	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
8	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
9	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
10	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
<b>Rezultat</b>		<b>0,02 ml x 109,0 TCID<sub>50</sub>/ml</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

**Tabel 12**

**Bio-10: răspunsul anticorpilor, clasa de șoareci (CB17/ICR-PRKDC-SCID), administrare intramusculară**

Șoarece #	Sex	Doză de virus (intramuscular)	Anticorpi antirabici (IU/ml)		Observații
			0 (înaintea testării)	28 de zile (după testare)	
1	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
2	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	Nespecificat	Rabie – deces
3	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
4	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	Nespecificat	Rabie – deces
5	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
6	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
7	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
8	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	Nespecificat	Rabie – deces
9	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	Nespecificat	Rabie – deces
10	Feminin	0,02 ml x 10 <sup>9,0</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	0	0	
<b>Rezultat</b>		<b>0,02 ml x 10<sup>9,0</sup> TCID<sub>50</sub>/ml</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

**Tabel 13****Bio-10: mortalitatea din cauza rabiei**

<b>Clasa de șoareci</b>	<b>Număr de șoareci</b>	<b>Număr de supraviețuitori</b>	<b>Număr de decese</b>	<b>Rata mortalității, %</b>	<b>Observații</b>
<i>CRL; CD1-FOXNI NU, p.o.</i>	10	9	1	10%	Rabie - pozitiv
<i>CRL; CD1-FOXNI NU, i.m.</i>	10	9	1	10%	Rabie – pozitiv
<i>CB17/ICR-PRKD-SCID, p.o.</i>	10	10	0	0%	Rabie – pozitiv
<i>CB17/ICR-PRKD-SCID, i.m.</i>	10	6	4	40%	Rabie - pozitiv
<i>CRL; CD1-FOXNI NU</i>	10	10	0	0%	Animale experimentale nevaccinate
<i>CB17/ICR-PRKD-SCID</i>	10	10	0	0%	Animale experimentale nevaccinate

Administrare: p.o. - orală, i.m. – intramusculară

## **Studiu privind siguranța tulpinii Bio-10-SAD Bern a virusului rabic asupra speciei de maimuțe rhesus macaque**

Vladimir Vrzal

Bioveta a.s., Ivanovice na Hané, Republica Cehia

*Recepționat 18 mai 2012*

*Acceptat 29 noiembrie 2012*

### **Rezumat**

Având ca bază recomandarea OMS, patogenitatea reziduală a tulpinii virusului rabic Bio-10-SAD Bern (componentă a vaccinului Lysvulpen por. ad us. vet.) a fost testată pe maimuțe rhesus macaque. Fiecăreia din cele zece maimuțe, femele, în vârstă de doi ani i s-au administrat pe cale orală  $2 \text{ ml} \times 10^9$  TCID<sub>50</sub> de tulpină de virus rabic Bio-10-SAD Bern. Animalele au fost monitorizate timp de 90 de zile. Ulterior, animalele au fost exterminate și creierelor au fost examinate prin metoda imunofluorescenței și cea PCR, cercetându-se prezența virusului rabic. Apariția anticorpilor antirabici anterior și ulterior administrării virusului a fost de asemenea evaluată. Nu au fost observate simptome clinice de rabie și niciunul dintre animale nu a decedat de rabie în urma administrării virusului. Nu s-a detectat prezența rabiei în urma examinării *post mortem* a animalelor de studiu. Toate animalele au dezvoltat anticorpi antirabici pe durata celor 90 de zile ulterioare administrării virusului rabic. Se poate conchide că, virusul Bio-10-SAD Bern administrat într-o doză egală cu doza maximă înzecită specifică utilizării în teren este sigură pentru maimuțele din specia rhesus macaque. Acest studiu este primul de acest tip realizat asupra maimuțelor din specia rhesus macaque.

*Virus vaccin, administrare orală, patogenitate reziduală, autopsie, anticorpi antirabici*

Imunizarea pe cale orală a animalelor sălbatice împotriva rabiei a devenit parte integrantă din lupta împotriva acestei boli fatale atât în Europa cât și în America de Nord.

Orice vaccin oral pentru imunizarea animalelor sălbatice ar trebui să fie eficient (de exemplu, să producă imunitate protectoare la speciile de animale țintă) și trebuie să fie inofensiv atât pentru speciile de animale țintă cât și pentru cele care nu sunt țintă. Caracterul inofensiv este evaluat la speciile de animale țintă dar și la alte specii de animale (care nu sunt țintă) care pot intra în contact cu vaccinul în urmă răspândirii lui în mediul înconjurător. Vaccinul nu trebuie nici să inducă rabia la animale și nici s-o răspândească animalelor sensibile la această boală prin intermediul celor vaccinate.

Organizația Mondială a Sănătății (OMS 2005), Organizația Mondială pentru Sănătatea Animalelor (OMSA 2002, 2008) și Farmacopeea Europeană (2007) au identificat condiții și au publicat recomandări legate de cerințele vaccinurilor intenționate a fi utilizate pentru imunizarea orală a animalelor sălbatice, care trebuie îndeplinite înainte ca vaccinurile să fie lansate pentru utilizarea în teren. Blancou și Meslin (1996) au recomandat ca testul de patogenitate reziduală să fie realizat pe maimuțe.

Scopul acestui studiu a fost verificarea siguranței tulpinii de virus rabic Bio-10-SAD Bern asupra maimuțelor rhesus macaque în condiții optime de practică de laborator (GLP).

## **Materiale și metode**

### **Tulpina de virus rabic Bio-10-SAD Bern**

În cadrul acestui studiu s-a folosit tulpina virusului rabic Bio-10-SAD Bern în primul lot de producție (MSV + 1). Virusul Bio-10-SAD Bern își are originea în tulpina SAD Bern (tulpină de vaccin utilizată pentru imunizarea animalelor sălbatice împotriva rabiei).

Titrul folosit al tulpinii virusului rabic Bio-10-SAD Bern a fost  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml (TCID<sub>50</sub> este definit ca o diluare a virusului necesară pentru a infecta 50% din cultura de celule inoculată) care este de 10 x titrul maxim al virusului din vaccinul Lysvulpen por. ad us. vet. folosit în teren pentru vaccinarea orală a animalelor sălbatice împotriva rabiei.

Adresă de corespondență:  
Dr. MV Vladimir Vrzat, CSs.  
Bioveta, a.s., Komenského 212  
683 23 Ivanovice na Hané  
Republica Cehia

E-mail: [vrzal.vladimir@bioveta.cz](mailto:vrzal.vladimir@bioveta.cz)  
[http:// actavet\\_vlu.cz/](http://actavet_vlu.cz/)

## **Animale de studiu**

Grupul animalelor de studiu a fost alcătuit din 10 maimuțe femele din rasa rhesus macaque (*Macaca mulatta*) din propriul nostru laborator de reproducere Biotest Konávorice, în vârstă de 2 ani, cu o masă corporală între 3,3 până la 4,2 kg, nevaccinate împotriva rabiei, deparazitate de către Ivomec (Merial, Franța) cu o doză de 0,2 mg ivermectină per kg de masă corporală înainte de examinarea din laborator. Experimentul a fost aprobat de Ministerul Agriculturii (Nr. 10984/2010-MZE-17210). Inițial maimuțele au fost așezate în cuști în mod individual. Temperatura ambiantă a fost 20-24° C, umiditatea relativă 30-70%; variabilele de ambient au fost monitorizate și înregistrate zilnic. Cuștile au fost curățate de două ori pe săptămână iar aerul proaspăt era furnizat zilnic. Condițiile au inclus și lumina naturală. Maimuțele au fost hrănite cu hrană normală granulată, suplimentată cu fructe sau legume proaspete. Animalelor li s-a permis să se adapteze timp de 2 săptămâni în cuștile lor înainte de administrarea virusului. După administrarea virusului, fiecare animal a fost ținut în cușca sa pe întreaga perioadă de 90 de zile.



## **Administrarea virusului, recoltarea de sânge și prelevarea probelor**

Tulpina virală a Bio-10-SAD Bern a fost administrată pe cale orală la rădăcina limbii în cantitate de  $2,0 \text{ ml} \times 10^{9,0} \text{ TCID}_{50}$  (de zece ori doza maximă a virusului din teren). Nu au fost administrate niciun fel de medicamente sedative. Fiecare maimuță a fost imobilizată fizic, i-a fost introdus un căluș și după ce i s-a deschis gura, virusul test a fost administrat foarte încet cu ajutorul unei seringi de plastic prevăzută cu un dispozitiv de cauciuc în loc de ac. Maimuța a fost monitorizată în timp ce înghițea virusul pe durata administrării lente a acestuia. Înainte de administrare, animalele au fost cântărite și li s-a recoltat sânge pentru a măsura volumul de anticorpi antirabici din el. Maimuțele au fost monitorizate zilnic cu accent pe apariția simptomelor clinice de rabie. Animalele au fost cântărite zilnic. În a 90-a zi a perioadei de monitorizare li s-a recoltat sânge din nou pentru măsurarea anticorpilor antirabici, apoi animalele au fost exterminate prin administrarea intravenoasă a preparatului farmaceutic T 61 (producător Intervet Internațional B.V., Olanda) într-o doză de  $0,5 \text{ ml/ 1 kg}$  de masă corporală. Mostre din cortexul cerebral, cerebel, medulla oblongata și hipocamp au fost prelevate în timpul autopsiei pentru depistarea rabiei prin metoda imunofluorescenței și prin metoda PCR.

## **Examinarea probelor biologice**

Mostrele de ser din sângele recoltat, atât înainte cât și după testare, au fost analizate pentru depistarea prezenței de anticorpi antirabici cu ajutorul testului Neutralizare Fluorescentă a Virusului Anticorp (FAVN) (Clinquet et al. 1998).

Mostrele din creier (cortex cerebral, cerebel, medulla oblongata și hipocamp) au fost examinate prin metoda fluorescenței directe pentru depistarea prezenței antigenului virusului. (Dean și Abelseth 1973).

Aceleași mostre de creier (cortex cerebral, cerebel, medulla oblongata și hipocamp) au fost examinate prin metoda Reacției de Polimerizare în Lanț (PCR) pentru depistarea prezenței antigenului virusului. (Wakeley et al. 2005).

ARN-ul complet a fost izolat direct din 20% țesut cerebral omogenizat folosind un dispozitiv de lucru BioRobot M48 și un Kit MagAttract Viral RNA M48, așa cum a fost recomandat de către producător (Qiagen). ARN a fost folosit TaqMan RT-PCR ca model în procedura în timp real și într-o singură fază, folosind ș kit-ul Qiagen One Step RT-PCR. Pentru un singur rezervor de apă au fost utilizate următoarele:  $5,75 \mu\text{l}$  RNase,  $5 \mu\text{l}$  5 x amortizor de reacție RT-PCR,  $1 \mu\text{l}$  amestec dNTP ( $100\text{mM}$ ),  $6 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  ( $25\text{inM}$ ),  $0,1 \mu\text{l}$  RNAsin (Promega),  $1 \mu\text{l}$  amestec de enzime,  $0,2 \mu\text{l}$  fiecare pentru primer pentru înainte și înapoi ( $50 \mu\text{M}$ ) și  $0,25 \mu\text{l}$  amestec de sondă ( $30 \mu\text{M}$ ). Primerii și sondele folosite în cadrul testului au fost publicate de Wakely et al. 2005. La final s-au folosit  $5 \mu\text{l}$  de ARN la un volum total de  $25 \mu\text{l}$ . Au fost efectuate RT-PCR-uri pe un Ciclu iQ5 (BioRad). A fost folosit următorul profil de temperatură: 30 min la  $60^\circ \text{C}$  (transcriere inversă), 15 min la  $95^\circ \text{C}$  (inactivare transcriptază inversă/ activare polimerizare) urmată de 45 de cicluri la 10 s la  $95^\circ \text{C}$  (denaturare), 45 s la  $55^\circ \text{C}$  (călire) și 30 s la  $72^\circ \text{C}$  (prelungire). Valorile de fluorescență au fost înregistrate în timpul fazelor de călire. Pentru testul în timp real TaqMan RT-PCR, ciclul limită al virusului SAD Bern cu titrul  $10^{7,63} \text{ TCID}_{50}/ \text{ml}$  a fost folosit ca dispozitiv de control pozitiv și a fost stabilit ca egal cu 22.

Nr. animal	Anticorpi antirabici (IU/ml) 3 luni după testare
1	7,8
2	7,8
3	1,5
4	> 40
5	5,0
6	13,5
7	1,5
8	> 40
9	> 40
10	10,3

### Rezultate

Nu au fost înregistrate deviații de la starea fiziologică normală și nici simptome de rabie prin monitorizarea zilnică a celor 10 maimuțe. Toate mostrele (cortex cerebral, cerebel, medulla oblongata și hipocamp) prelevate în timpul autopsiei după finalizarea testării virusului rabic atât prin fluorescență directă cât și prin metodă, au rezultat ca fiind negative.

Folosind metoda FAVN, nu au fost detectați anticorpi la animale înainte de testare. După finalizarea testului toate cele 10 maimuțe au manifestat anticorpi antirabici specifici de la 1,5 IU/ml până la mai mult de 40 IU/ml (Tabel 1).

### Dezbateri

Multe țări din Europa s-au angajat în acest proiect, lansat în 1978, de vaccinare orală a animalelor sălbatice împotriva rabiei utilizând vaccinuri ce conțin tulpini vii reduse de rabie derivate din tulpinile SAD. OMS a lansat o serie de recomandări legate de evaluarea caracterului inofensiv al vaccinurilor orale (OMS 1989, 1992, 1992b, 1993, 1993 b, 1994, 1995, 1998). Cu toate acestea, utilizarea vaccinurilor este asociată cu unele riscuri ale patogenității reziduale reprezentate de derivatele tulpinii SAD.

Patogenitatea reziduală superioară la rozătoare a fost subiectul lucrărilor lui Winkler et al. (1976), Wachendöfer et al. (1978), Steck et al. (1982), Leblois et al. (1988), Artois et al. (1992) și Vos et al. (1999). Wandeler (1988) a descris rabia la un pui de vulpe, o pisică și un jder de piatră în urma administrării orale a tulpinii SAD Bern. Rupprecht (1990) a raportat rabie la 7 sconeși din 11 animale cărora le-a fost administrat virusul vaccin SAD B-19 *per os*.

Rabia a fost identificată de către Bingham et al. (1992) la 2 din 4 *Papio ursinus* cărora le-a fost administrată tulpina SAD Bern pe cale orală. Un caz de rabie la vulpi în urma administrării orale a virusului SAD B19 în vederea imunizării orale a fost identificat în Austria (Vanek et al. 2004). Patru vulpi cu rabie indusă de virusul SAD B19 au fost identificate în Germania în timpul campaniilor de vaccinare orală împotriva rabiei din 2001, 2002, 2004 și 2005 (Mueller et al. 2005). Șaisprezece cazuri de rabie post-vaccinare au fost înregistrate în Canada între 1989-2004

la 4 vulpi roșii, 2 câini enot, 2 sconeși și 1 vițel printre alte animale (întâlnirea RITA Brazilia 2006).

Din păcate, acest risc este indicat și de noile vaccinuri antirabice. Tulpina mutagenă de rabie SAG 1 reține patogenitatea reziduală în urma administrării intracerebrale la șoareci sugari (Schumacher et al. 1993). Unei femei tinere, mușcată de un câine când încerca să îi îndepărteze din gură mâncarea momeală, i-au apărut leziuni ale pielii de tipul variolei, din cauza recombinantului de tulpină de rabie VRG (Rupprecht et al. 2001).

Cazul de patogenitate reziduală al tulpinii SAD Bern, în urma administrării orale a 2 ml la titru de  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub> fiecăruia dintre cei 4 babuini și care a indus rabie fatală la 2 dintre aceștia (perioadă de incubare între 11 și 13 zile), a fost citat în mod frecvent în legătură cu apariția acesteia la derivatele tulpinii SAD (Bingham et al. 1992). Totuși, multe aspecte ale acestui caz sunt neclare. Inocularea exactă a virusului în cavitatea bucală nu este clară; virusul ar fi putut fi administrat în cavitatea nazală sporind astfel predispoziția animalelor la rabie (virusul vaccin a fost administrat animalelor anesteziate). În plus, starea sănătății animalelor este necunoscută, în special în ceea ce privește statutul imunității lor (dacă animalele au o slabă imunizare), contaminarea lor cu diferiți paraziți, etc. Nu există informații despre găzduirea babuinilor, tiparele de alimentație, tratamentul sau alte informații relevante pentru evaluarea experimentului. De aceea am decis (în concordanță cu recomandările OMS) să reproducem testarea pe o specie similară de maimuțe și anume rhesus macaque și pe un grup mai mare de animale (n = 10) în condiții obiective stricte.

În contrast cu testarea mai sus menționată de către Bingham et al. (1992) și cu testarea mai recentă a lui Vos et al. (1999), maimuțele din experimentul nostru nu au fost anesteziate sau sedate cu nici un fel de medicament farmaceutic. De fapt, anestezia sau sedarea pot conduce la administrarea incorectă a virusului; virusul poate pătrunde în cavitățile nazale unde nu poate intra în condiții fiziologice normale. Acest loc este foarte predispus la inducerea rabiei. Noi am administrat virusul cu ajutorul unei seringi de plastic prevăzută cu un dispozitiv de cauciuc. Maimuțele au fost imobilizate de personalul laboratorului (membrele toracice au fost fixate în urma corpului, capul a fost ținut în poziție fixă de către o asistentă și gură a fost ținută deschisă cu un căluș prevăzută cu o deschizătură). Virusul a fost administrat prin deschizătura călușului la rădăcina limbii cu ajutorul unei seringi de plastic prevăzută cu un dispozitiv de cauciuc. Datorită administrării lente, maimuța a înghițit virusul, deci efectul fiziologic a fost identic cu cel scontat dacă animalul ar fi mâncat o momeală ce conținea virusul în cadrul unei campanii naturale de imunizare. Faptul că virusul a intrat în contact cu organele imuno competente (amigdale) a fost evidențiat prin formarea de anticorpi antirabici de neutralizare a respectivului virus. Anticorpilor antirabici de neutralizare a virusului au fost detectați cu ajutorului testării FAVN, o metodă care permite titrului anticorpilor antirabici specifici să se exprime în unități recunoscute la nivel internațional.

Nu au fost observate deviații de la starea normală de sănătate a animalelor în timpul perioadei de monitorizare de 90 de zile după administrarea virusului. Animalele experimentale au dat impresia de sănătate, au mâncat foarte bine cu un apetit normal și au luat în greutate. Examinarea *post mortem* a celor 4 părți ale creierului care sunt foarte sensibile la rabie, de exemplu cortexul cerebral, cerebelul, medulla oblongata și hipocampusul, folosindu-se testarea senzitivă cu fluorescență directă sau testarea PCR extrem de senzitivă, nu au indicat rabie la niciun animal.

Administrat în doze egale cu doza maximă înzecită specifică pentru speciile de animale țintă, tulpina virusului rabic Bio-10-SAD Bern a fost absolut inofensivă pentru animalele experimentale din specia maimuțelor rhesus macaque.

### Bibliografie

Artois, M., Guittre, C., Thomas, I., Leblois, H., Brochier, B., și Barrat, J., (1992). *Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies: a comparison* Vaccine, 10: 524-528.

Bingham J, Foggin CM, Gerber H, Hill FWG, Kappeler A, King AA, Perry BD, Wandeler AI 1992: *Pathogenicity of SAD rabies vaccine given orally in chacma baboons (Papio ursinus)*, Vet Rec 1992, 131: 55 -6.

Blancou J, Meslin FX 1996. *Modified live-virus rabies vaccines for oral immunization of carnivores*. În: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H (Ed). *Laboratory techniques in rabies*, Organizația Mondială a Sănătății, Geneva, p. 324-337.

Clinquet F, Aubert M, Sangé L 1998: *Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies – neutralizing antibody*. J Immunol Methods 212: 79-87.

Dean DJ, Abelseth MK 1973: *The fluorescent antibody test*. În: Kaplan MM, Koprowski H: *Laboratory Techniques in Rabies*, Organizația Mondială a Sănătății, Geneva, p. 73-84.

Al Optulea Raport al Comisiei de Experți a OMS asupra rabiei (1992). OMS, Geneva.

Farmacopeea Europeană 2007: *Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem* (live, oral): 0746.

Administrarea în teren a vaccinurilor antirabice orale pentru câini. Departamentul de Consultare al WHO-OIE, Geneva, 20-22 iulie 1998, Doc. WHO/EMC/ZD/98.15, p. 24.

Mueller, T., Geue, L., Kliemt, J., Selhorst, T., Frost, J., Bunzenthal, C., Zimmer, K, Vanek, E., Revilla-Fernández, S., McElhinney, L., Fooks, A.: *Vaccine associated rabies cases in Germany and Austria*. RITA XVI, A 16-a conferință internațională asupra rabiei din America, Canada, 16-21 octombrie, 2005.

Capitolul Rabia (2.1.13) din Manualul OIE, 2008, paragraful despre vaccinarea orală.

Raport al Departamentului de Consultare al OMS asupra cerințelor și criteriilor de testare în teren a vaccinului antirabice asupra câinilor și carnivorelor sălbatice, Geneva, 1-2 martie 1989, doc. EHO/Rab.Res./89-32.

Raport al celui de-al 3-lea Departament de Consultare al OMS asupra imunizării orale a câinilor împotriva rabiei, Geneva, 21-22 iulie 1992, Doc WHO/Rab.Res./92.38.

Raport al celui de-al 4-lea Departament de Consultare al OMS asupra imunizării orale a câinilor împotriva rabiei, Geneva, 14-15 iunie 1993, Doc. WHO/Rab.Res./94.42.

Raport al celui de-al 5-lea Departament de Consultare al OMS asupra imunizării orale a câinilor împotriva rabiei, Geneva, 20-22 iunie 1994, Doc. WHO/Rab.Res./94.45.

Raport al celui de-al 6-lea Departament de Consultare al OMS asupra imunizării orale a câinilor împotriva rabiei, Geneva, 24-25 iulie 1995, Doc. WHO/EMC/ZDI/98.13, p. 28.

Rupprecht, C.E., Charlton, K.M., Artois, M., Casey, G.A., Webster, W.A., Campbell, J.B., Lawson, K.F., și Schneider, L.G. 1990. *Ineffectiveness and comparative pathogenicity of attenuated rabies virus vaccines for the striped skunk (Mephitis mephitis)*. J. Wildl. Dis., 26: 99 – 102.

Rupprecht, C.E., Blass, L., Smith, K., Orcinari, L.A., Niezgod, M., Whitfield, S.G., Gibbons, R.V., Guerra, M., și Hanlon, C.A., 2001: *Human infection due to recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus*. New England. J. Med., 345: 582-586.

Steck, F., Wandeler, A., Bischof, P., Haflinger, U., și Schneider, L., 1982. *Oral immunization of foxes against rabies. Laboratory and field studies*. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 5: 165-171.

*The oral vaccination of foxes against rabies* (2002): Raport al Comisiei Științifice asupra Sănătății și Bunăstării Animalelor, p. 55.

Wakeley PR, Johnson N, McElhinney LM, Marston D, Sawyer J, Fooks AR 2005: *Development of a real-time, TaqMan reverse transcription – PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5 and 6*, J Clin Microbiol 43: 2786-2792.

Vanek E, Wodak E, Revilla-Fernández S, Bagó, Schildorfer H, Hoellechner A, Schoenbauer M 2004: *Fox rabies in Carinthia, Austria: A case report*. Rabies Bulletin Europe 28: 9.

Vos, A., Neubert, A., Aylan, O., Schuster, P., Pommerening, E., Müller, T., și Chivatsi, D.C., (1999). *An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species*. I. Epidemiol. Infect., 123: 165-75.

Ședința de analiză WHO/OIE asupra controlului rabiei în Europa, Piestany, 5-7 octombrie 1993.

WHO Expert Consultation on Rabies, OMS Geneva (2005): WHO Technical Report Series, nr. 931, p. 87.