

## **Protocol de testare**

### **a) Descrierea metodelor aplicate**

- a1) Monitorizarea și evaluarea reacțiilor totale – monitorizarea totală a animalului și înregistrarea reacțiilor totale (cu atenție specială acordată înregistrării simptomelor clinice asociate rabiei)
- a2) Diagnosticarea „post mortem” a rabiei – imunofluorescență directă (Dean și Abelseth, 1973)

### **b) Descrierea instrumentelor aplicate:**

- microscop pentru imunofluorescență – tip: Phasenkontrast mit Mikroval- Mikroskopen, Carl-Zeiss Jena
- seringi de 0,1 ml – tip: Hamilton
- incubator – 37 °C și CO<sub>2</sub> 5% - de fabricație Hereus
- frigider 250 l Calex (temperatură între 2 și 8 °C)
- instrumentar de disecție

### **c) Descrierea materialelor utilizate:**

- notes pentru luarea notițelor
- LYSVULPEN por. ad us. vet., lot 36 06 – titru virus TCID<sub>50</sub> = 10<sup>8,0</sup>/ml
- conjugat antirabic și negativ de fabricație Bioveta, a.s. Ivanovice na Hané

### **d) Animale de testare utilizate**

- d1) Specia – șoarece
  - d2) Clasă sau soi – șoarece alb de laborator
  - d3) categoria animalelor – animale cu greutatea între 15 și 18 gr, de diferite sexe
  - d4) Origine – compania Anlab, Praga
  - d5) Identificare – etichetarea acvariilor, găurirea urechii
  - d6) Număr animale – 100
  - d7) Condițiile în care au fost ținute animalele – animalele au fost ținute în acvarii din plastic tradiționale destinate creșterii șoarecilor de laborator. Capacul a fost realizat din sârmă inoxidabilă. Acvariile au fost păstrate în săli cu aer condiționat la temperatură, umezeală și flux de aer stabile. Șoarecii au fost crescuți câte zece într-un acvariu.
  - d8) Hrănirea animalelor – animalele au fost hrănite cu hrană amestec sub formă de granule, disponibilă în comerț, destinată șoarecilor. Apa a fost disponibilă ad libitum din dozatoare automate de apă.
  - d9) Denumirea proprietarului animalelor - Bioveta, a.s. Ivanovice na Hané
  - d10) Denumirea institutului de testare - Bioveta, a.s. Ivanovice na Hané
  - e) Doza administrată, modalitatea de administrare, schema de administrare, schema de monitorizare a temperaturii și monitorizarea reacțiilor locale și totale
- Doza administrată – aprox. 0,5 ml de virus – vaccin LYSVULPEN disponibil în comerț, por. ad us. vet., lot 36 06, titru TCID<sub>50</sub> = 10<sup>8,0</sup>/ml
- Modalitatea de administrare – per os din pompa de apă
- Schema de administrare
- În cazul a 50 de șoareci albi de laborator li s-a administrat aprox. 0,5 ml p.o (în cazul a 50 de șoareci nu s-a administrat vaccinul – grup de control). În fiecare acvariu s-au ținut cinci șoareci vaccinați și cinci nevaccinați.

### **Monitorizarea reacțiilor totale**

Animalele au fost monitorizate timp de 180 de zile (monitorizarea simptomelor clinice ale rabiei). După finalizarea testului, animalele au fost sacrificați, diagnosticându-se rabia în creierul acestora cu ajutorul metodei fluorescenței directe.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul nr. 11.

Diagnosticarea „post mortem” a rabiei în laborator – rabia a fost diagnosticată în creierul animalelor sacrificate cu ajutorul metodei fluorescenței directe (Dean și Abelseth, 1973).

Numele, adresa, funcția și calificarea persoanei care a efectuat analiza:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Născut la 26 noiembrie 1953

Studii: 1969 – 1973: Liceul Tehnico-agricol – specializarea veterinară, Kromeriz

1973-1979 Facultatea de Medicină Veterinară din Brno

1 aprilie 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea activității

1979-1980: Serviciul militar la Serviciul veterinar al Poliției de frontieră

1980-1987: Controlor tehnic independent la Departamentul de control calitate și management

1985-1990: studii pentru teza în domeniul epizotologiei și zooigienei

1987-1995: Șeful departamentului de control calitate și management

Din 1 februarie 1995: Director de producție la Bioveta s.r.o.

Din 1 ianuarie 1998 până în prezent: Directorul secției de producție și dezvoltare a biopreparatelor și produselor farmaceutice de uz veterinar

Membru în organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie – din 1980

Asociația științifică cehoslovacă de fungologie – din 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie – din 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul și coautorul a 101 publicații profesionale.

Certificate de autor:

Este autorul și coautorul a 15 brevete și 5 proiecte.

Rapoarte finale de recenzie:

Este autorul și coautorul a 19 rapoarte finale pentru preparate puse în folosință.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Siguranța rozătoarelor de laborator, testate în condiții experimentale (demonstrarea faptului că tulpina virală nu se răspândește de la un animal la altul)

Tabelul nr. 11

Evaluare clinică

| Nr. animale | Specia                   | Administrarea virului SAD-Bern LYSVULPEN por. Ad us. vet. Lot 36 06        | Ziua administrării | Diagnosticarea rabiei la nivelul organelor |         |                                    |                                    |         |         | Diagnosticarea rabiei prin metoda fluorescenței directe | Notă                                                                                                             |
|-------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|---------|------------------------------------|------------------------------------|---------|---------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |                          |                                                                            |                    | 1 lună                                     | 2 luni  | 3 luni                             | 4 luni                             | 5 luni  | 6 luni  |                                                         |                                                                                                                  |
| 50 buc.     | Șoarece alb de laborator | La aprox. 0,5 ml x 10 <sup>8,0</sup> TCID <sub>50</sub> (adăpare naturală) | 18.8.1999          | conform                                    | conform | conform 1 buc. mort (rabie – neg.) | conform                            | conform | conform | Negativ                                                 | Creșterea la comun a animalelor cărora li s-a administrat virusul împreună cu animalele de control (5+5 animale) |
| 50 buc.     | Șoarece alb de laborator | Fără administrarea virusului (animale de control)                          | -                  | conform                                    | conform | conform                            | conform 1 buc. mort (rabie – neg.) | conform | conform | Negativ                                                 | Creșterea la comun a animalelor cărora li s-a administrat virusul împreună cu animalele de control (5+5 animale) |

## **6. Examinarea performanței reproductive**

Vaccinul antirabic „LYSVULPEN por. ad us. vet” destinat imunizării pe cale orală a vulpilor conține virusul rabic viu atenuat cu tulpină vaccinală SAD-Bern. Animalele țintă sunt vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) și enoții (*Nyctereutes procyonoides*). După consumarea momelii și îngurgitarea blisterului de aluminiu, virusul viu intră în contact cu sistemul imunitar în regiunea nazofaringiană inducând dezvoltarea anticorpilor specifici antirabici de neutralizare a virusului și dezvoltarea imunității protectoare a animalului vaccinat. Administrarea vaccinului antirabic pentru imunizarea orală a vulpilor și principiul dezvoltării imunității protectoare active nu au nici un impact negativ asupra parametrilor de reproducere a speciei țintă. Monitorizarea parametrilor de reproducere la specia țintă nu se bazează pe vreun test (nu sunt animale domestice). Dovezile se bazează pe populația de vulpi în continuă creștere în ciuda imunizării antirabice areale efectuate timp de mai mulți ani.

## **7. Examinarea funcțiilor imunologice**

După consumarea momelii în capsulă de aluminiu/plastic și după desfacerea acesteia, virusul rabic viu atenuat cu tulpina SAD Bern intră în contact cu cavitatea orală a animalelor țintă și stimulează sistemul imunitar al regiunii nazofaringiene ducând la formarea anticorpilor specifici antirabici de neutralizare a virusului. În consecință, acești anticorpi creează o imunitate protectoare la animalele imunizate împotriva infecțiilor cu virusul rabic. După consumarea momelii, virusul vaccinului ajunge în tractul alimentar și digestiv unde este rapid inactivat, în special datorită pH-ului scăzut al stomacului. De aceea, aici nu se formează răspuns imun.

Astfel, imunitatea împotriva infecției cu rabie se formează în mod imunobiologic natural și nu are impact negativ asupra organelor imunitare ale animalelor.

Vaccinul antirabic „LYSVULPEN por. ad us. vet” pentru imunizarea pe cale orală a vulpilor este destinat și a fost verificat pe două specii de animale libere – vulpea roșie (*Vulpes vulpes*) și enotul (*Nyctereutes procyonoides*). Pe lângă imunizarea orală împotriva rabiei, nu s-a efectuat nicio altă imunizare împotriva altor boli infecțioase și nu s-a administrat nici un tratament profilactic la niciuna dintre specii.

Din acest motiv, nu s-au realizat experimente exacte de monitorizare a funcției imunobiologice.

## **8. Cerințele specifice ale vaccinurilor vii**

### **8.1. Propagarea tulpinii vaccinale**

Virusul rabic viu atenuat cu tulpină vaccinală SAD-Bern este destinat exclusiv imunizării orale a animalelor sălbatice împotriva rabiei. Este ambalat în blistere de plastic/aluminiu, acoperite și ascunse într-o momeală care atrage animalele țintă. Momelile conținând virusul de vaccinare sunt amplasate în câmp manual sau din avion. Animalele țintă consumă aceste momeli, iar după deschiderea blisterelor de plastic/aluminiu, virusul viu intră în contact cu organele din regiunea nazofaringiană imunocompetente pentru dezvoltarea anticorpilor specifici antirabici de neutralizare a virusului și pentru dezvoltarea imunității protectoare a animalelor imunizate. Animalele vaccinate nu excretă virusul vaccinal SAD-Bern întrucât virusul care nu rămâne la nivelul regiunii nazofaringiene, este inactivat rapid la nivelul tractului alimentar și digestiv al animalelor, în special datorită pH-ului scăzut al stomacului.

Având în vedere particularitatea administrării (distribuția în cele mai variate condiții din teren), se întâmplă adesea ca momelile să fie consumate parțial sau în întregime și de către alte animale decât animalele țintă. Se consideră extrem de important să se verifice dacă tulpina virală nu se răspândește de la un animal la altul în cazul rozătoarelor libere în condiții naturale. Rezultatele acestei verificări efectuate în condiții experimentale sunt prezentate în partea IIIC, Capitolele 4 și 5 din Documentația de înregistrare. S-a demonstrat și dovedit în mod exact că, în condiții de laborator, tulpina vaccinală SAD Bern nu se răspândește de la un animal la altul nici în cazul rozătoarelor sălbatice, și nici la cele domestice.

Demonstrarea faptului că, în condiții naturale, tulpina virală nu se răspândește de la un animal la altul în cazul rozătoarelor sălbatice rezultă și din utilizarea efectivă în practică a vaccinului „LYSVULPEN por. ad us. vet” cu virusul vaccinal SAD Bern timp de șapte ani. Din 1992, când acest preparat imunobiologic a fost utilizat pentru prima dată în Cehia, și până în 2002, s-au amplasat în total 17.744.000 momeli vaccinale în Cehia. Toate cazurile pozitive de rabie la animale (atât la cele domestice, cât și la cele sălbatice) au fost analizate de Laboratorul Național de Referință pentru cazuri de Rabie din Liberec prin anticorpi monoclonali, făcându-se distincția dintre virusul nativ de virusul tulpinii vaccinale SAD Bern. În întreaga perioadă de administrare a vaccinului „LYSVULPEN por. ad us. vet.”, adică din 1992 până în 2002, prin această metodă s-au examinat în total 2368 de animale, inclusiv toate rozătoarele furnizate. Rabia cauzată de virusul rabic cu tulpina vaccinală SAD Bern nu a fost demonstrat în niciunul din cazuri la nicio specie, nici în cazul rozătoarelor sălbatice.

#### **Concluzie:**

Virusul rabic viu atenuat cu tulpina SAD Bern nu se răspândește printre animalele țință și nici în rândul altor specii de animale domestice sau sălbatice, inclusiv rozătoarele sălbatice. Rezultatele au fost obținute prin verificarea efectuată în condiții de laborator și pe baza evaluării și a verificării minuțioase efectuate în decursul utilizării efective în practică a vaccinului „LYSVULPEN por. ad us. vet.” în condiții de teren.

#### **8.2. Răspândirea printre animalele vaccinate**

Virusul rabic viu atenuat cu tulpina SAD Bern este destinat exclusiv imunizării orale a animalelor sălbatice împotriva rabiei. Este ambalat în blistere de plastic/aluminiu, acoperite și ascunse într-o momeală care atrage animalele țință. Momelile conținând virusul de vaccinare sunt amplasate în câmp manual sau din avion. Animalele țință consumă aceste momeli, iar după deschiderea blisterelor de plastic/aluminiu, virusul viu intră în contact cu organele din regiunea nazofaringiană imunocompetente pentru dezvoltarea anticorpilor specifici antirabici de neutralizare a virusului și pentru dezvoltarea imunității protectoare a animalelor imunizate. Animalele vaccinate nu excretă virusul vaccinal SAD-Bern întrucât virusul care nu rămâne la nivelul regiunii nazofaringiene, este inactivat rapid la nivelul tractului alimentar și digestiv al animalelor, în special datorită pH-ului scăzut al stomacului.

#### **Concluzie:**

Virusul rabic viu atenuat cu tulpina vaccinală SAD Bern nu se răspândește printre animalele vaccinate. Intră în contact și stimulează doar organele imunitare de la nivelul regiunii nazofaringiene la animalele imunizate.

#### **8.3. Modificarea virulenței în cazul vaccinurilor atenuate**

Virusul rabic cu tulpina vaccinală SAD Bern destinat imunizării animalelor sălbatice împotriva rabiei este un virus viu atenuat. Atenuarea (atenuare stabilă) a fost obținută prin repicare pe termen lung pe culturi tisulare de origine extraneurală. În acest mod și cu ajutorul acestei metode, virusul vaccinal SAD Bern și-a păstrat proprietățile imunogene corespunzătoare și și-a redus virulența. Virusul rabic cu tulpina SAD Bern este virulent doar administrat intracerebral șoarecilor albi, nefiind însă virulent în cazul acestei specii după administrare orală sau subcutanată. Nu este virulent după administrare orală la animalele țință sau alte animale sălbatice (inclusiv rozătoare) și nu este virulent la animalele domestice (rezultatele testului sunt prezentate în partea III C din documentația de înregistrare).

Modificarea virulenței în cazul vaccinurilor atenuate are o importanță extraordinară în ceea ce privește administrarea acestui vaccin. De aceea, se acordă atenție sporită testării stabilității atenuării. Testarea stabilității atenuării a fost efectuată în toate fazele de lucru admisibile (5 faze de lucru din germenele principal al virusului) și rezultatul a fost corespunzător. De asemenea, testarea stabilității atenuării s-a

efectuat la fiecare lot al vaccinului livrat „LYSVULPEN por. ad us. vet.”, cu titlu de verificare finală a vaccinului înainte de livrare.

#### Concluzie:

Virusul rabic viu atenuat cu tulpina SAD Bern destinat exclusiv imunizării orale a animalelor împotriva rabiei își păstrează o atenuare stabilă. Testarea acestui parametru biologic a fost efectuată la nivelul lotului germenilor principali și al lotului germenilor de lucru și este efectuat pe fiecare lot de vaccin înainte de livrare.

#### 8.4. Proprietățile biologice ale tulpinii vaccinale

Virusul rabic viu atenuat cu tulpina SAD Bern utilizat pentru imunizarea orală a animalelor împotriva rabiei are proprietățile biologice prezentate în tabelul nr. 12.

#### Concluzie:

Virusul rabic viu atenuat cu tulpina SAD Bern demonstrează că deține proprietăți corespunzătoare atât din punctul de vedere imunogenității și inofensivității, cât și alte proprietăți, îndeplinind toate cerințele stabilite pentru selectarea tulpinii vaccinale pentru imunizarea animalelor sălbatice împotriva rabiei, conform specificațiilor Farmacopeii.

Tabelul nr. 12

#### Proprietățile biologice ale tulpinii vaccinale SAD Bern

| Proprietatea biologică                                 | Caracteristici                                                                                                                 | Notă                                         |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Cultivarea pe culturi tisulare de origine extraneurală | Cultivarea pe culturi tisulare din rinichi de hamster                                                                          |                                              |
| Virulența după administrare i.c.                       | Virulent în cazul șoarecilor albi între 6-10 gr după administrarea a 0,03 ml i.c.                                              |                                              |
| Virulența după administrare s.c.                       | Nevirulent în cazul șoarecilor albi între 15-18 gr după administrarea a 0,2 ml s.c.                                            |                                              |
| Virulența după administrare p.o.                       | Nevirulent în cazul șoarecilor albi între 15-18 gr după administrarea p.o.                                                     | Partea IIIC din documentația de înregistrare |
| Virulența la vulpi și enoți                            | Nevirulent în urma administrării orale a dozei recomandate și a unei cantități de zece ori mai mari decât doza recomandată     | Partea IIIC din documentația de înregistrare |
| Virulența la câini și pisici                           | Nevirulent în urma administrării orale a unei cantități de zece ori mai mari decât doza recomandată                            | Partea IIIC din documentația de înregistrare |
| Virulența la animale sălbatice                         | Tulpina virală nu se răspândește de la un animal la altul în cazul rozătoarelor sălbatice în condiții naturale și de laborator | Partea IIIC din documentația de înregistrare |
| Marker genetic                                         | Tulpina virală are markeri genetici pe baza cărora se distinge de alte tulpini virale de rabie                                 | Partea IIIC din documentația de înregistrare |
| Imunogenitate la vulpi și enoți                        | Induce imunitate protectoare                                                                                                   | Partea IIIC din documentația de              |

|  |                                                                            |              |
|--|----------------------------------------------------------------------------|--------------|
|  | împotriva rabiei la speciile țintă – vulpi și enoți după administrare p.o. | înregistrare |
|--|----------------------------------------------------------------------------|--------------|

### 8.5. Recombinarea sau substituirea genomilor tulpinilor

Virusul rabic al vaccinului cu tulpina SAD Bern utilizat pentru imunizarea orală a animalelor sălbatice împotriva rabiei este un virus viu atenuat. Atenuarea a fost obținută prin repicare pe termen lung pe culturi tisulare de origine extraneurală. Astfel, virusul nu a fost obținut prin tehnologie recombinantă ca în cazul tulpinii rabice V-RG.

#### Concluzie:

Virusul rabic al vaccinului cu tulpina SAD Bern este un virus atenuat; nu este un virus obținut prin tehnologie genetică recombinantă.

### 9. Studiarea reziduurilor

Vaccinul antirabic „LYSVULPEN por. ad us. vet.” utilizat pentru imunizarea orală a vulpilor este destinat exclusiv imunizării speciilor de animale sălbatice țintă împotriva rabiei. Vaccinul nu este destinat imunizării animalelor domestice și de fermă crescute pentru hrană. Din acest motiv, nu s-a efectuat studiul reziduurilor.

Un aspect special îl reprezintă adăugarea tetraciclinei clorhidrat în momelă ca biomarker, care face posibilă determinarea acestuia în oasele sau în dinții animalelor capturate și diagnosticarea consumului momelii cu vaccin de către animale.

#### Concluzie:

Vaccinul antirabic „LYSVULPEN por. ad us. vet.” utilizat pentru imunizarea orală a vulpilor nu este destinat animalelor crescute pentru hrană.

### 10. Interacțiuni

Vaccinul antirabic „LYSVULPEN por. ad us. vet.” utilizat pentru imunizarea orală a vulpilor este destinat exclusiv imunizării speciilor țintă: vulpile roșii și enoții. Imunizarea orală împotriva rabiei este doar unul din tratamentele preventive imunologice sau medicale efectuate asupra acestor specii speciale de animale sălbatice. Din acest motiv, nu s-a efectuat studiul interacțiunilor.

#### Concluzie:

Vaccinul antirabic „LYSVULPEN por. ad us. vet.” utilizat pentru imunizarea orală a vulpilor este destinat exclusiv imunizării animalelor sălbatice la care nu se aplică nici un tratament imunologic. Din acest motiv, nu s-a efectuat studiul interacțiunilor.

### D. Studiul de teren

Vaccinul antirabic, „LYSVULPEN por. ad us. vet.”, destinat imunizării orale a vulpilor a fost folosit prima dată în Cehia în 1992. De atunci și până în prezent, s-au amplasat în total 17.744.000 momeli vaccinale în întreaga Cehie. În aceeași perioadă, s-au exportat 5.227.970 momeli vaccinale. În cei zece ani de utilizare a acestui vaccin, au fost produse și livrate în total 23.021.970 momeli de imunizare. În perioada de administrare a vaccinului „LYSVULPEN por. ad us. vet.”, monitorizată și evaluată, s-a diagnosticat rabia la 2368 animale domestice și sălbatice din Cehia. În toate cazurile, diagnosticarea diferențială a rabiei s-a efectuat prin anticorpii specifici monoclonali pentru a se face diferența dintre virusul rabic nativ și virusul vaccinului SAD Bern. Nu s-a înregistrat în niciuna din situații „rabia vaccinală”, adică rabia cauzată de tulpina vaccinală administrată SAD Bern. S-au realizat analize similare în fiecare țară în care s-a exportat

vaccinul „LYSVULPEN por. ad us. vet.” Institutele de testare din străinătate nu au înregistrat nici un caz de rabie provocată de tulpina SAD Bern administrată. Informațiile detaliate cu privire la numărul de momeli vaccinale administrate în cadrul fiecărei campanii și în fiecare an, informațiile privitoare la numărul de specii afectate de rabie, cât și alte informații sunt prezentate în tabelele și diagramele din partea a IV-a a documentației de înregistrare – Eficiență.

#### **Concluzie:**

S-a testat în condițiile de teren inofensivitatea vaccinului „LYSVULPEN por. ad us. vet.” destinat imunizării orale a vulpilor. În perioada de zece ani examinată, în Cehia , s-au amplasat în total 17.744.000 momeli vaccinale. În aceeași perioadă, rabia a fost confirmată la 2368 animale domestice și sălbatice. Nu s-a înregistrat nici un caz de rabie cauzată de tulpina vaccinală SAD Bern. Institutele de testare din țările în care a fost exportat vaccinul au obținut rezultate similare. Rezultatele obținute confirmă și completează informațiile privind inofensivitatea tulpinii rabice vaccinale SAD Bern și caracterul adecvat al acestora în scopul imunizării orale a animalelor sălbatice împotriva rabiei.

#### **E. Ecotoxicitate**

Vaccinul antirabic, „LYSVULPEN por. ad us. vet.”, destinat imunizării orale a vulpilor conține virusul vaccinal viu atenuat cu tulpina SAD Bern. Tulpina este ambalată în blistere de aluminiu/plastic, introduse în momeala care atrage animalele țintă. Momelile vaccinale sunt împachetate câte 20 în ambalaje de hârtie pentru a fi amplasate manual sau în pungi a câte 350 bucăți fiecare pentru distribuirea din avion. Din punctul de vedere al ecotoxicității, blisterele de aluminiu/plastic poluează doar într-o anumită măsură. Anumite animale țintă lasă blisterele mestecate în locul în care le-au consumat, acestea rămânând pe teren. Blisterele sunt, de regulă, mărunțite bine, putând astfel fi consumate de rozătoare mici de genul șoarecilor. De aceea, blisterele vaccinale folosite sunt greu de găsit și se pot descoperi rar în urma campaniilor de vaccinare.



## MODIFICAREA PĂRȚII A III-A – STUDIUL DE SIGURANȚĂ

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A. INTRODUCERE                                                                                                                                                    | 3  |
| B. CERINȚE GENERALE                                                                                                                                               | 3  |
| C. TESTE DE LABORATOR                                                                                                                                             | 3  |
| 1. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată                                                              |    |
| 1A. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată<br>- mistreț ( <i>Sus scrofa</i> )                          | 4  |
| 1B. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată<br>- pescăruș râzător ( <i>Chroicocephalus ridibundus</i> ) | 11 |
| 1C. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată<br>- jderul de piatră ( <i>Martes foina</i> )               | 18 |
| 1D. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată<br>- bursucul ( <i>Meles meles</i> )                        | 25 |
| 1E. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată<br>- șoarecele alb de laborator                             | 32 |

## A. INTRODUCERE

Această parte recapitulează rezultatele testului de siguranță a vaccinului LYSVULPEN por. ad us. vet. Conținând tulpina vaccinală a virusului rabic atenuat SAD Bern: MSV Bio 10 după administrarea acestui preparat imunobiologic la mistreț (Sus scrofa), bursuc (Meles meles), jderul de piatră (Martes foina) și pescărușul râzător (Chroicocephalus ridibundus).

## B. CERINȚE GENERALE

1. Testele de siguranță s-au efectuat la speciile care nu reprezintă ținta preparatului; la mistreț (Sus scrofa), bursuc (Meles meles), jderul de piatră (Martes foina) și pescărușul râzător (Chroicocephalus ridibundus). De asemenea, studiul de siguranță s-a efectuat și pe șoarecii albi de laborator.
2. Doza recomandată a fost administrată în scopul verificării eficienței testului. Testul de inocuitate a fost efectuat în conformitate cu Farmacopeea europeană și cu recomandările OMS.
3. În scopul verificării eficienței testului, au fost utilizate loturile de LYSVULPEN por. ad us. vet. produse în conformitate cu dosarul de înregistrare.

## C. TESTE DE LABORATOR

Testele de laborator au fost efectuate în conformitate cu Farmacopeea europeană 01/2008; 0746 VACCIN ANTIRABIC (VIU, ORAL) PENTRU VULPI (Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem) și cu recomandările OMS.

### 1. 1. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată

#### 1A. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată

##### - mistreț (Sus scrofa)

#### Rezumat:

Din cauza numărului lor mare, mistreții, tipic omnivori, intră în contact cu momelile de Lysvulpen por. ad us. vet. cu ocazia campaniilor sezoniere și le consumă.

În conformitate cu recomandările OMS, vaccinurile orale pentru imunizarea antirabică a animalelor sălbatice trebuie verificate la toate speciile care nu reprezintă ținta acestora și care ar putea consuma vaccinurile în libertate.

Lysvulpen por. ad us. vet. a fost testat după administrarea unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată în cazul a 10 mistreți (Sus scrofa). În 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet., animalele din experiment nu au prezentat semne de rabie. După încheierea perioadei de observație, toate animalele din experiment au fost sacrificate, însă virusul rabic nu a fost descoperit prin imunofluorescență directă la nivelul cortexului cerebral, a cerebelului, al medulei oblongata și al hipocampusului. Rabia nu s-a demonstrat la nici un animal din experiment. Determinarea anticorpilor antorabici a fost pozitivă la 1,2,3 și 6 luni de la administrarea virusului.

#### Dezbateri:

Mistrețul (Sus scrofa) poate fi una din speciile care nu reprezintă ținta vaccinului, ce consumă momelile de Lysvulpen por. ad us. vet. Mistreții sunt, în general, susceptibili moderat la rabie. S-a demonstrat, de asemenea, prin formarea anticorpilor în decurs de 6 luni de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. De asemenea, rabia nu s-a demonstrat pe parcursul perioadei de observație de 180 de zile, iar examinarea ulterioară a creierului în laborator pentru a verifica existența antigenului virusului rabic nu a demonstrat existența rabiei. Perioada de observație de 180 de zile este suficientă pentru manifestarea

simptomelor rabiei la toate speciile de animale și păsări. De asemenea, s-a folosit un examen prin imunofluorescență indirectă foarte sensibil și specific în vederea diagnosticării rabiei în laborator.

#### Concluzie:

Siguranța Lysvulpen por. ad us. vet. a fost demonstrată în urma administrării orale a unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată la mistreți (Sus scrofa). Această concluzie este susținută de rezultatele observațiilor clinice asupra animalelor participante la experiment timp de 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. și de examinarea ulterioară a creierului animalelor din experiment pentru demonstrarea prezenței virusului rabic.

Lista și caracteristicile animalelor cuprinse în testul de siguranță

| Nr. crt. mistreț | Nr. de identificare mistreț | Caracteristicile animalului |       |                    | Notă        |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|--------------------|-------------|
|                  |                             | Vârsta                      | Sexul | Starea de sănătate |             |
| 1                | PD1                         | 3 luni                      | F     | Bună               |             |
| 2                | PD2                         | 4 luni                      | M     | Bună               |             |
| 3                | PD3                         | 5 luni                      | F     | Bună               |             |
| 4                | PD4                         | 3 luni                      | F     | Bună               |             |
| 5                | PD5                         | 6 luni                      | M     | Bună               |             |
| 6                | PD6                         | 4 luni                      | M     | Bună               |             |
| 7                | PD7                         | 7 luni                      | F     | Bună               |             |
| 8                | PD8                         | 3 luni                      | M     | Bună               |             |
| 9                | PD9                         | 1 an                        | M     | Bună               | f. sălbatic |
| 10               | PD10                        | 1 an                        | F     | Bună               |             |

#### PROTOCOL DE TESTARE

##### a) Descrierea metodelor utilizate

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

Observarea reacțiilor adverse și înregistrarea acestora, simptomele clinice asociate rabiei – modificarea comportamentului, modificarea vocii, pareza musculară, paralizia musculară, acumularea și excreția de salivă, paralizia grupurilor musculare ce duc la decesul animalului.

###### a2) Diagnosticarea rabiei „post mortem”

Imunofluorescență directă (Dean și Abelseths, 1973)

###### a3) Determinarea anticorpilor antirabici

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

##### b) Descrierea instrumentarului și echipamentelor utilizate:

- seringă de 2 ml cu aplicator
- microscop pentru imunofluorescență, portobiect
- instrumentar de disecție
- frigider de 2-8 °C, congelator de -18 °C, echipament de congelare de -80 °C
- termostat 37 °C cu 5% CO<sub>2</sub>
- plăcuțe de plastic pentru culturile tisulare
- pipete pentru culturile tisulare

##### c) Descrierea materialelor utilizate

- jurnal pentru înregistrarea stării clinice zilnice a animalelor
- material de testare MSV Bio 10+1 cu de zece ori titrul maxim de vaccin utilizat
- conjugat antirabic
- standarde pentru efectuarea testului de imunofluorescență directă și FAVN

d) Utilizarea animalelor la teste

d1) Specia

- Mistreț

d2) Categoria animalelor

- De la 3 luni la 1 an

d3) Originea animalelor

- Animale din Cehia

d4) Identificarea animalelor

- Crotalie

d5) Număr animale

- 10 buc.

d6) Mediul de viață și locația animalelor

- Animalele din experiment au fost ținute în cuști câte 5

d7) hrănirea animalelor

- Animalele au fost hrănite de 3 ori pe zi, dimineața, la amiază și seara. Dieta consta din amestecuri speciale pentru porci domestici din aceeași categorie.

d8) Denumirea proprietarului animalelor

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

d9) Denumirea echipamentului de testare

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

e) Doza administrată, metoda de administrare, frecvența de administrare, monitorizarea temperaturii și observarea reacțiilor clinice adverse:

Doza de administrare: - 2,0 ml de virus rabic de test

Metoda de administrare: oral, artificial, cu ajutorul unei seringi de plastic cu adaptor de cauciuc

Frecvența de administrare: virusul de testare a fost administrat o dată prin metodă artificială

Observații privind reacțiile adverse: - animalele din cadrul experimentului au fost monitorizate zilnic și toate reacțiile neobișnuite sau adverse ale animalelor au fost înregistrate, acordând atenție prezenței rabiei

Diagnosticarea rabiei „post mortem” - rabia a fost diagnosticată prin imunofluorescență directă la nivelul cortexului cerebral, a cerebelului, al medullei oblongate și al hipocampului. (Dean și Abelseths, 1973)

Determinarea anticorpilor antirabici – anticorpii antirabici au fost determinați din serul animalelor testate la intervale exacte. Anticorpii antirabici au fost determinați prin testul FAVN (Cliquet și Barrat, 1996).

Numele, adresa, funcția și calificarea examinatorului:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Data nașterii: 26 noiembrie 1953

Studii: 1969 – 1973: Liceul Tehnico-agricol – specializarea veterinară, Kromeriz

1973-1979 Facultatea de Medicină Veterinară din Brno

1 aprilie 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea activității

1979-1980: Serviciul militar la Serviciul veterinar al Poliției de frontieră

1980-1987: Controlor tehnic independent la Departamentul de control calitate și management

1985-1990: Studii pentru teza în domeniul zooigienei și epidemiologiei

1987-1995: Șeful departamentului de control calitate și management

1998-2003: Director de producție și dezvoltare a produselor biologice veterinare

2003-2007: Director de inovare și dezvoltare a produselor biologice

Din 01.01.2007: Director adjunct companie, manager de proiect la Bioveta a.s.

Membru în organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie – din 1980

Asociația științifică cehoslovacă de fungologie – din 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie – din 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul și coautorul a 131 publicații științifice.

Certificate de autor:

Este autorul și coautorul a 25 brevete.

Rapoarte finale de recenzie:

Este autorul și coautorul a 23 rapoarte finale pentru preparate puse în folosință.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

| Nr. crt.<br>mistreț | Administrare<br>orală<br>Lysvulpen               | Clinic<br>(180 zile) | Prelevare sânge (IU/ml) |        |        |        | Post mortem - IF |         |                      |          |
|---------------------|--------------------------------------------------|----------------------|-------------------------|--------|--------|--------|------------------|---------|----------------------|----------|
|                     |                                                  |                      | 0-inițial               | 1 lună | 3 luni | 6 luni | Cortex           | Cerebel | Medulla<br>oblongata | Hipocamp |
| 1                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 1,50   | 1,65   | 1,21   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 2                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 2,80   | 2,65   | 2,28   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 3                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0,90   | 1,10   | 0,91   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 4                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 1,15   | 1,05   | 0,84   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 5                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,30   | 2,71   | 2,19   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 6                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 2,60   | 2,37   | 1,67   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 7                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 1,12   | 1,31   | 0,93   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 8                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0,85   | 1,26   | 0,84   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 9                   | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 2,30   | 1,92   | 1,28   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 10                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 2,60   | 1,89   | 1,17   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| Media               |                                                  | Neg.                 | 0                       | 1,912  | 1,791  | 1,332  | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |

**Testarea vaccinului LYSVULPEN la mistreți (Sus scrofa)**

**1B. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată**

**- pescăruș râzător (*Chroicocephalus ridibundus*)**

**Rezumat:**

Din cauza numărului lor mare, pescărușii râzători, tipic omnivori, intră în contact cu momelile de Lysvulpen por. ad us. vet. cu ocazia campaniilor sezoniere și le consumă.

În conformitate cu recomandările OMS, vaccinurile orale pentru imunizarea antirabică a animalelor sălbatice trebuie verificate la toate speciile care nu reprezintă ținta acestora și care ar putea consuma vaccinurile în libertate.

Lysvulpen por. ad us. vet. a fost testat după administrarea unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată în cazul a 10 pescăruși râzători (*Chroicocephalus ridibundus*). În 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet., păsările din experiment nu au prezentat semne de rabie. După încheierea perioadei de observație, toate păsările din experiment au fost sacrificate, însă virusul rabic nu a fost descoperit prin imunofluorescență directă la nivelul cortexului cerebral, a cerebelului, al medullei oblongate și al hipocampusului. Rabia nu s-a demonstrat la nici o pasăre din experiment. Determinarea anticorpilor antirabici a fost pozitivă la 1,2,3 și 6 luni de la administrarea virusului.

**Dezbattere:**

Pescărușul râzător (*Chroicocephalus ridibundus*) poate fi una din speciile care nu reprezintă ținta vaccinului, ce consumă momelile de Lysvulpen por. ad us. vet. Păsările nu sunt, în general, susceptibile la rabie. S-a demonstrat, de asemenea, prin neformarea anticorpilor în decurs de 6 luni de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. (la toți cei 10 pescăruși râzători). De asemenea, rabia nu s-a demonstrat pe parcursul perioadei de observație de 180 de zile, iar examinarea ulterioară a creierului în laborator pentru a verifica existența antigenului virusului rabic nu a demonstrat existența rabiei. Perioada de observație de 180 de zile este suficientă pentru manifestarea simptomelor rabiei la toate speciile de animale și păsări. De asemenea, s-a folosit un examen prin imunofluorescență indirectă foarte sensibil și specific în vederea diagnosticării rabiei în laborator.

**Concluzie:**

Siguranța Lysvulpen por. ad us. vet. a fost demonstrată în urma administrării orale a unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată la pescărușii râzători (*Chroicocephalus ridibundus*). Această concluzie este susținută de rezultatele observațiilor clinice asupra păsărilor participante la experiment timp de 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. și de examinarea ulterioară a creierului animalelor din experiment pentru demonstrarea prezenței virusului rabic.

Lista și caracteristicile animalelor cuprinse în testul de siguranță

| Nr. crt. pasăre | Nr. de identificare pasăre | Caracteristicile animalului |            |                    | Notă            |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|------------|--------------------|-----------------|
|                 |                            | Vârsta                      | Sexul      | Starea de sănătate |                 |
| 1               | RCH1                       | Tânăr (până la 1 an)        | Necunoscut | Bună               |                 |
| 2               | RCH2                       | Bătrân (peste 1 an)         | Necunoscut | Bună               |                 |
| 3               | RCH3                       | Bătrân (peste 1 an)         | Necunoscut | Bună               |                 |
| 4               | RCH4                       | Tânăr (până la 1 an)        | Necunoscut | Bună               |                 |
| 5               | RCH5                       | Tânăr (până la 1 an)        | Necunoscut | Bună               |                 |
| 6               | RCH6                       | Bătrân (peste 1 an)         | Necunoscut | Bună               |                 |
| 7               | RCH7                       | Tânăr (până la 1 an)        | Necunoscut | Bună               | Mai puțin penaj |
| 8               | RCH8                       | Bătrân (peste 1 an)         | Necunoscut | Bună               |                 |
| 9               | RCH9                       | Bătrân (peste 1 an)         | Necunoscut | Bună               |                 |

|    |       |                      |            |      |  |
|----|-------|----------------------|------------|------|--|
| 10 | RCH10 | Tânăr (până la 1 an) | Necunoscut | Bună |  |
|----|-------|----------------------|------------|------|--|

## PROTOCOL DE TESTARE

### a) Descrierea metodelor utilizate

#### a1) Monitorizarea și evaluarea reacțiilor adverse

Observarea reacțiilor adverse și înregistrarea acestora, simptomele clinice asociate rabiei – modificarea comportamentului, modificarea vocii, pareza musculară, paralizia musculară, acumularea și excreția de salivă, paralizia grupurilor musculare ce duc la decesul animalului.

#### a2) Diagnosticarea rabiei „post mortem”

Imunofluorescență directă (Dean și Abelseths, 1973)

#### a3) Determinarea anticorpilor antirabici

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

### b) Descrierea instrumentarului și echipamentelor utilizate:

- seringă de 2 ml cu aplicator
- microscop pentru imunofluorescență, portobiect
- instrumentar de disecție
- frigider de 2-8 °C, congelator de -18 °C, echipament de congelare de -80 °C
- termostat 37 °C cu 5% CO<sub>2</sub>
- plăcuțe de plastic pentru culturile tisulare
- pipete pentru culturile tisulare

### c) Descrierea materialelor utilizate

- jurnal pentru înregistrarea stării clinice zilnice a animalelor
- material de testare MSV Bio 10+1 cu de zece ori titrul maxim de vaccin utilizat
- conjugat antirabic
- standarde pentru efectuarea testului de imunofluorescență directă și FAVN

### d) Utilizarea animalelor la teste

#### d1) Specia

- Pescăruș râzător (*Chirocephalus ridibundus*)

#### d2) Categoria animalelor

- Păsări tinere (până la 1 an) și păsări bătrâne (peste 1 an)

#### d3) Originea animalelor

- Animale capturate în Cehia

#### d4) Identificarea animalelor

- Păsările au fost ținute în colivii separate pe durata perioadei de verificare

#### d5) Număr animale

- 10 buc.

#### d6) Mediul de viață și locația animalelor

- Animalele din experiment au fost ținute în colivii separate. Dimensiunea coliviilor a fost de 1x3x2 m. În colivie erau două stînghii pentru ca păsările să se poată așeza și mișca.

#### d7) Hrănirea animalelor



- Păsările au fost hrănite de 3 ori pe zi, dimineața, la amiază și seara. Dieta consta din bucățele mici de pește, cartofi și fructe. Pe durata întregii perioade de verificare, animalele au avut apă la discreție.

d8) Denumirea proprietarului animalelor

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

d9) Denumirea echipamentului de testare

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

e) Doza administrată, metoda de administrare, frecvența de administrare, monitorizarea temperaturii și observarea reacțiilor clinice adverse:

Doza de administrare: - 2,0 ml de virus rabic de test

Metoda de administrare: oral, artificial, cu ajutorul unei seringi de plastic cu adaptor de cauciuc

Frecvența de administrare: virusul de testare a fost administrat o dată prin metodă artificială

Observații privind reacțiile adverse: - păsările din cadrul experimentului au fost monitorizate zilnic și toate reacțiile neobișnuite sau adverse ale păsărilor au fost înregistrate, acordând atenție prezenței rabiei

Diagnosticarea rabiei „post mortem” - rabia a fost diagnosticată prin imunofluorescență directă la nivelul cortexului cerebral, a cerebelului, al medulei oblongata și al hipocampului. (Dean și Abelseths, 1973)

Determinarea anticorpilor antirabici – anticorpii antirabici au fost determinați din serul păsărilor testate la intervale exacte. Anticorpii antirabici au fost determinați prin testul FAVN (Cliquet și Barrat, 1996).

Numele, adresa, funcția și calificarea examinatorului:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Data nașterii: 26 noiembrie 1953

Studii: 1969 – 1973: Liceul Tehnico-agricol – specializarea veterinară, Kromeriz

1973-1979 Facultatea de Medicină Veterinară din Brno

1 aprilie 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea activității

1979-1980: Serviciul militar la Serviciul veterinar al Poliției de frontieră

1980-1987: Controlor tehnic independent la Departamentul de control calitate și management

1985-1990: Studii pentru teza în domeniul zooigienei și epidemiologiei

1987-1995: Șeful departamentului de control calitate și management

1998-2003: Director de producție și dezvoltare a produselor biologice veterinare

2003-2007: Director de inovare și dezvoltare a produselor biologice

Din 01.01.2007: Director adjunct companie, manager de proiect la Bioveta a.s.

Membru în organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie – din 1980

Asociația științifică cehoslovacă de fungologie – din 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie – din 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul și coautorul a 131 publicații științifice.

Certificate de autor:

Este autorul și coautorul a 25 brevete.

Rapoarte finale de recenzie:

Este autorul și coautorul a 23 rapoarte finale pentru preparate puse în folosință.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

| Nr. crt.<br>pescăruș<br>râzător | Administrare<br>orală<br>Lysvulpen               | Clinic<br>(180 zile) | Prelevare sânge (IU/ml) |        |        |        | Post mortem - IF |         |                      |          |
|---------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------|-------------------------|--------|--------|--------|------------------|---------|----------------------|----------|
|                                 |                                                  |                      | 0-inițial               | 1 lună | 3 luni | 6 luni | Cortex           | Cerebel | Medulla<br>oblongata | Hipocamp |
| 1                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 2                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 3                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 4                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 5                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 6                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 7                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 8                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 9                               | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 10                              | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 0      | 0      | 0      | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| Media                           |                                                  | Neg.                 | 0                       |        | 0      | 0      | 0                | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |

**Testarea vaccinului LYSVULPEN la pescărușii râzători (*Chroicocephalus ridibundus*).**

### 1C. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată - jderul de piatră (Martes foina)

#### Rezumat:

Din cauza numărului lor mare, jderii de piatră, tipic omnivori, intră în contact cu momelile de Lysvulpen por. ad us. vet. cu ocazia campaniilor sezoniere și le consumă.

În conformitate cu recomandările OMS, vaccinurile orale pentru imunizarea antirabică a animalelor sălbatice trebuie verificate la toate speciile care nu reprezintă ținta acestora și care ar putea consuma vaccinurile în libertate.

Lysvulpen por. ad us. vet. a fost testat după administrarea unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată în cazul a 10 jderi de piatră (Martes foina). În 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet., animalele din experiment nu au prezentat semne de rabie. După încheierea perioadei de observație, toate animalele din experiment au fost sacrificate, însă virusul rabic nu a fost descoperit prin imunofluorescență directă la nivelul cortexului cerebral, a cerebelului, al medullei oblongata și al hipocampusului. Rabia nu s-a demonstrat la nici un animal din experiment. Determinarea anticorpilor antirabici a fost pozitivă la 1,2,3 și 6 luni de la administrarea virusului.

#### Dezbatere:

Jderul de piatră (Martes foina) poate fi una din speciile care nu reprezintă ținta vaccinului, ce consumă momelile de Lysvulpen por. ad us. vet. Sunt, în general, moderat susceptibile la rabie. S-a demonstrat, de asemenea, prin formarea anticorpilor în decurs de 6 luni de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. De asemenea, rabia nu s-a demonstrat pe parcursul perioadei de observație de 180 de zile, iar examinarea ulterioară a creierului în laborator pentru a verifica existența antigenului virusului rabic nu a demonstrat existența rabiei. Perioada de observație de 180 de zile este suficientă pentru manifestarea simptomelor rabiei la toate speciile de animale și păsări. De asemenea, s-a folosit un examen prin imunofluorescență indirectă foarte sensibil și specific în vederea diagnosticării rabiei în laborator.

#### Concluzie:

Siguranța Lysvulpen por. ad us. vet. a fost demonstrată în urma administrării orale a unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată la jderii de piatră (Martes foina). Această concluzie este susținută de rezultatele observațiilor clinice asupra animalelor participante la experiment timp de 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. și de examinarea ulterioară a creierului animalelor din experiment pentru demonstrarea prezenței virusului rabic.

Lista și caracteristicile animalelor cuprinse în testul de siguranță

| Nr. crt. jder de piatră | Nr. de identificare jder de piatră | Caracteristicile animalului |       |                    | Notă    |
|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------|--------------------|---------|
|                         |                                    | Vârsta                      | Sexul | Starea de sănătate |         |
| 1                       | KS1                                | 6 luni                      | M     | Bună               |         |
| 2                       | KS2                                | 6 luni                      | F     | Bună               |         |
| 3                       | KS3                                | 6 luni                      | F     | Bună               |         |
| 4                       | KS4                                | 6 luni                      | F     | Bună               |         |
| 5                       | KS5                                | 6 luni                      | M     | Bună               |         |
| 6                       | KS6                                | 6 luni                      | M     | Bună               |         |
| 7                       | KS7                                | 18 luni                     | M     | Bună               | agresiv |
| 8                       | KS8                                | 18 luni                     | F     | Bună               |         |
| 9                       | KS9                                | 18 luni                     | M     | Bună               |         |
| 10                      | KS10                               | 18 luni                     | M     | Bună               |         |

## PROTOCOL DE TESTARE

### a) Descrierea metodelor utilizate

#### a1) Monitorizarea și evaluarea reacțiilor adverse

Observarea reacțiilor adverse și înregistrarea acestora, simptomele clinice asociate rabiei – modificarea comportamentului, modificarea vocii, pareza musculară, paralizia musculară, acumularea și excreția de salivă, paralizia grupurilor musculare ce duc la decesul animalului.

#### a2) Diagnosticarea rabiei „post mortem”

Imunofluorescență directă (Dean și Abelseths, 1973)

#### a3) Determinarea anticorpilor antirabici

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

### b) Descrierea instrumentarului și echipamentelor utilizate:

- seringă de 2 ml cu aplicator
- microscop pentru imunofluorescență, portobiect
- instrumentar de disecție
- frigider de 2-8 °C, congelator de -18 °C, echipament de congelare de -80 °C
- termostat 37 °C cu 5% CO<sub>2</sub>
- plăcuțe de plastic pentru culturile tisulare
- pipete pentru culturile tisulare

### c) Descrierea materialelor utilizate

- jurnal pentru înregistrarea stării clinice zilnice a animalelor
- material de testare MSV Bio 10+1 cu de zece ori titrul maxim de vaccin utilizat
- conjugat antirabic
- standarde pentru efectuarea testului de imunofluorescență directă și FAVN

### d) Utilizarea animalelor la teste

#### d1) Specia

- Jder de piatră (Martes foina)

#### d2) Categoria animalelor

- De la 6 la 18 luni

#### d3) Originea animalelor

- Animale din Cehia

#### d4) Identificarea animalelor

- Tatuaj ureche

#### d5) Număr animale

- 10 buc.

#### d6) Mediul de viață și locația animalelor

- Animalele din experiment au fost ținute în cuști separate.

#### d7) Hrănirea animalelor

- Păsările au fost hrănite de 3 ori pe zi, dimineața, la amiază și seara. Dieta consta din carne fiartă și fructe.

#### d8) Denumirea proprietarului animalelor

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

d9) Denumirea echipamentului de testare

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

e) Doza administrată, metoda de administrare, frecvența de administrare, monitorizarea temperaturii și observarea reacțiilor clinice adverse:

Doza de administrare: - 2,0 ml de virus rabic de test

Metoda de administrare: oral, artificial, cu ajutorul unei seringi de plastic cu adaptor de cauciuc

Frecvența de administrare: virusul de testare a fost administrat o dată prin metodă artificială

Observații privind reacțiile adverse: - animalele din cadrul experimentului au fost monitorizate zilnic și toate reacțiile neobișnuite sau adverse ale animalelor au fost înregistrate, acordând atenție prezenței rabiei

Diagnosticarea rabiei „post mortem” - rabia a fost diagnosticată prin imunofluorescență directă la nivelul cortexului cerebral, a cerebelului, al medullei oblongate și al hipocampusului. (Dean și Ableseths, 1973)

Determinarea anticorpilor antirabici – anticorpii antirabici au fost determinați din serul animalelor testate la intervale exacte. Anticorpii antirabici au fost determinați prin testul FAVN (Cliquet și Barrat, 1996).

Numele, adresa, funcția și calificarea examinatorului:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Data nașterii: 26 noiembrie 1953

Studii: 1969 – 1973: Liceul Tehnico-agricol – specializarea veterinară, Kromeriz

1973-1979 Facultatea de Medicină Veterinară din Brno

1 aprilie 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea activității

1979-1980: Serviciul militar la Serviciul veterinar al Poliției de frontieră

1980-1987: Controlor tehnic independent la Departamentul de control calitate și management

1985-1990: Studii pentru teza în domeniul zooigienei și epidemiologiei

1987-1995: Șeful departamentului de control calitate și management

1998-2003: Director de producție și dezvoltare a produselor biologice veterinare

2003-2007: Director de inovare și dezvoltare a produselor biologice

Din 01.01.2007: Director adjunct companie, manager de proiect la Bioveta a.s.

Membru în organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie – din 1980

Asociația științifică cehoslovacă de fungologie – din 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie – din 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul și coautorul a 131 publicații științifice.

Certificate de autor:

Este autorul și coautorul a 25 brevete.

Rapoarte finale de recenzie:

Este autorul și coautorul a 23 rapoarte finale pentru preparate puse în folosință.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

| Nr. crt.<br>jder de<br>piatră | Administrare<br>orală<br>Lysvulpen               | Clinic<br>(180 zile) | Prelevare sânge (IU/ml) |        |        |        | Post mortem - IF |         |                      |          |
|-------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------|-------------------------|--------|--------|--------|------------------|---------|----------------------|----------|
|                               |                                                  |                      | 0-inițial               | 1 lună | 3 luni | 6 luni | Cortex           | Cerebel | Medulla<br>oblongata | Hipocamp |
| 1                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,64   | 3,19   | 2,92   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 2                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,92   | 3,81   | 3,66   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 3                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 1,98   | 1,78   | 1,63   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 4                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 5,19   | 4,83   | 4,44   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 5                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 4,27   | 4,11   | 3,88   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 6                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,83   | 3,71   | 3,54   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 7                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 2,79   | 2,63   | 2,39   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 8                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 1,91   | 1,74   | 1,66   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 9                             | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 5,52   | 5,38   | 5,27   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| 10                            | $2,0 \times 10^{9,0}$<br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,17   | 3,00   | 2,88   | Neg.             | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |
| Media                         |                                                  | Neg.                 | 0                       | 3,622  | 3,418  | 3,227  | 0                | Neg.    | Neg.                 | Neg.     |

**Testarea vaccinului LYSVULPEN la jderii de piatră (Martes foina).**



## 1D. Siguranța în urma administrării unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată- bursuc (Meles meles)

### Rezumat:

Din cauza numărului lor mare, bursucii, tipic omnivori, intră în contact cu momelile de Lysvulpen por. ad us. vet. cu ocazia campaniilor sezoniere și le consumă.

În conformitate cu recomandările OMS, vaccinurile orale pentru imunizarea antirabică a animalelor sălbatice trebuie verificate la toate speciile care nu reprezintă ținta acestora și care ar putea consuma vaccinurile în libertate.

Lysvulpen por. ad us. vet. a fost testat după administrarea unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată în cazul a 10 bursuci (Meles meles). În 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet., animalele din experiment nu au prezentat semne de rabie. După încheierea perioadei de observație, toate animalele din experiment au fost sacrificate, însă virusul rabic nu a fost descoperit prin imunofluorescență directă la nivelul cortexului cerebral, a cerebelului, al medulei oblongata și al hipocampului. Rabia nu s-a demonstrat la nici un animal din experiment. Determinarea anticorpilor antirabici a fost pozitivă la 1,2,3 și 6 luni de la administrarea virusului.

### Dezbatere:

Bursucul (Meles meles) poate fi una din speciile care nu reprezintă ținta vaccinului, ce consumă momelile de Lysvulpen por. ad us. vet. Bursucii sunt, în general, moderat susceptibili la rabie. S-a demonstrat, de asemenea, prin formarea anticorpilor în decurs de 6 luni de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. De asemenea, rabia nu s-a demonstrat pe parcursul perioadei de observație de 180 de zile, iar examinarea ulterioară a creierului în laborator pentru a verifica existența antigenului virusului rabic nu a demonstrat existența rabiei. Perioada de observație de 180 de zile este suficientă pentru manifestarea simptomelor rabiei la toate speciile de animale și păsări. De asemenea, s-a folosit un examen prin imunofluorescență indirectă foarte sensibil și specific în vederea diagnosticării rabiei în laborator.

### Concluzie:

Siguranța Lysvulpen por. ad us. vet. a fost demonstrată în urma administrării orale a unei cantități de zece ori mai mari decât doza maximă recomandată la bursuci (Meles meles). Această concluzie este susținută de rezultatele observațiilor clinice asupra animalelor participante la experiment timp de 180 de zile de la administrarea Lysvulpen por. ad us. vet. și de examinarea ulterioară a creierului animalelor din experiment pentru demonstrarea prezenței virusului rabic.

Lista și caracteristicile animalelor cuprinse în testul de siguranță

| Nr. crt. bursuc | Nr. de identificare bursuc | Caracteristicile animalului |       |                    | Notă           |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-------|--------------------|----------------|
|                 |                            | Vârsta                      | Sexul | Starea de sănătate |                |
| 1               | JL1                        | 5 luni                      | F     | Bună               |                |
| 2               | JL2                        | 5 luni                      | F     | Bună               |                |
| 3               | JL3                        | 5 luni                      | M     | Bună               |                |
| 4               | JL4                        | 6 luni                      | M     | Bună               | Foarte agresiv |
| 5               | JL5                        | 6 luni                      | M     | Bună               |                |
| 6               | JL6                        | 6 luni                      | F     | Bună               |                |
| 7               | JL7                        | 6 luni                      | M     | Bună               |                |
| 8               | JL8                        | 5 luni                      | F     | Bună               |                |
| 9               | JL9                        | 6 luni                      | M     | Bună               |                |
| 10              | JL10                       | 18 luni                     | F     | Bună               |                |

## PROTOCOL DE TESTARE

### a) Descrierea metodelor utilizate

#### a1) Monitorizarea și evaluarea reacțiilor adverse

Observarea reacțiilor adverse și înregistrarea acestora, simptomele clinice asociate rabiei – modificarea comportamentului, modificarea vocii, pareza musculară, paralizia musculară, acumularea și excreția de salivă, paralizia grupurilor musculare ce duc la decesul animalului.

#### a2) Diagnosticarea rabiei „post mortem”

Imunofluorescență directă (Dean și Abelseths, 1973)

#### a3) Determinarea anticorpilor antirabici

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

### b) Descrierea instrumentarului și echipamentelor utilizate:

- seringă de 2 ml cu aplicator
- microscop pentru imunofluorescență, portobiect
- instrumentar de disecție
- frigider de 2-8 °C, congelator de -18 °C, echipament de congelare de -80 °C
- termostat 37 °C cu 5% CO<sub>2</sub>
- plăcuțe de plastic pentru culturile tisulare
- pipete pentru culturile tisulare

### c) Descrierea materialelor utilizate

- jurnal pentru înregistrarea stării clinice zilnice a animalelor
- material de testare MSV Bio 10+1 cu de zece ori titrul maxim de vaccin utilizat
- conjugat antirabic
- standarde pentru efectuarea testului de imunofluorescență directă și FAVN

### d) Utilizarea animalelor la teste

#### d1) Specia

- Bursuc (Meles meles)

#### d2) Categoria animalelor

- Exemplare tinere de 5 și 6 luni

#### d3) Originea animalelor

- Animale capturate în Cehia

#### d4) Identificarea animalelor

- Tatuaj ureche

#### d5) Număr animale

- 10 buc.

#### d6) Mediul de viață și locația animalelor

- Animalele din experiment au fost ținute în cuști separate. Cuștile aveau dimensiunea de 1x3x2 m. În cușcă s-a amplasat un ascunziș pentru animale.

#### d7) Hrănirea animalelor

- Păsările au fost hrănite de 3 ori pe zi, dimineața, la amiază și seara. Dieta consta din bucățele mici de carne, cartofi și fructe. Pe parcursul perioadei de verificare, animalele au avut apă la discreție.

d8) Denumirea proprietarului animalelor

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

d9) Denumirea echipamentului de testare

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

e) Doza administrată, metoda de administrare, frecvența de administrare, monitorizarea temperaturii și observarea reacțiilor clinice adverse:

Doza de administrare: - 2,0 ml de virus rabic de test

Metoda de administrare: oral, artificial, cu ajutorul unei seringi de plastic cu adaptor de cauciuc

Frecvența de administrare: virusul de testare a fost administrat o dată prin metodă artificială

Observații privind reacțiile adverse: - animalele din cadrul experimentului au fost monitorizate zilnic și toate reacțiile neobișnuite sau adverse ale animalelor au fost înregistrate, acordând atenție prezenței rabiei

Diagnosticarea rabiei „post mortem” - rabia a fost diagnosticată prin imunofluorescență directă la nivelul cortexului cerebral, a cerebelului, al medulei oblongata și al hipocampusului. (Dean și Ableseths, 1973)

Determinarea anticorpilor antirabici – anticorpii antirabici au fost determinați din serul animalelor testate la intervale exacte. Anticorpii antirabici au fost determinați prin testul FAVN (Cliquet și Barrat, 1996).

Numele, adresa, funcția și calificarea examinatorului:

MVDr. Vladimír Vrzał, CSc.

Data nașterii: 26 noiembrie 1953

Studii: 1969 – 1973: Liceul Tehnico-agricol – specializarea veterinară, Kromeriz

1973-1979 Facultatea de Medicină Veterinară din Brno

1 aprilie 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea activității

1979-1980: Serviciul militar la Serviciul veterinar al Poliției de frontieră

1980-1987: Controlor tehnic independent la Departamentul de control calitate și management

1985-1990: Studii pentru teza în domeniul zooigienei și epidemiologiei

1987-1995: Șeful departamentului de control calitate și management

1998-2003: Director de producție și dezvoltare a produselor biologice veterinare

2003-2007: Director de inovare și dezvoltare a produselor biologice

Din 01.01.2007: Director adjunct companie, manager de proiect la Bioveta a.s.

Membru în organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie – din 1980

Asociația științifică cehoslovacă de fungologie – din 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie – din 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul și coautorul a 131 publicații științifice.

Certificate de autor:

Este autorul și coautorul a 25 brevete.

Rapoarte finale de recenzie:

Este autorul și coautorul a 23 rapoarte finale pentru preparate puse în folosință.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzał, CSc.

| Nr. crt.<br>bursuc | Administrare<br>orală<br>Lysvulpen               | Clinic<br>(180 zile) | Prelevare sânge (IU/ml) |        |        |        | Post mortem - IF |         |                   |          |
|--------------------|--------------------------------------------------|----------------------|-------------------------|--------|--------|--------|------------------|---------|-------------------|----------|
|                    |                                                  |                      | 0-inițial               | 1 lună | 3 luni | 6 luni | Cortex           | Cerebel | Medulla oblongata | Hipocamp |
| 1                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 2,55   | 2,39   | 2,19   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 2                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 1,87   | 1,55   | 1,37   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 3                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,06   | 2,87   | 2,44   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 4                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 4,19   | 3,90   | 3,68   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 5                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 1,65   | 1,36   | 1,19   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 6                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 2,91   | 2,88   | 2,49   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 7                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,66   | 3,49   | 3,13   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 8                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 2,87   | 2,67   | 2,46   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 9                  | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,91   | 3,72   | 3,51   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| 10                 | 2,0x10 <sup>9,0</sup><br>TCID <sub>50</sub> / ml | Neg.                 | 0                       | 3,12   | 2,81   | 2,69   | Neg.             | Neg.    | Neg.              | Neg.     |
| Media              |                                                  | Neg.                 | 0                       | 2,979  | 2,764  | 2,515  | 0                | Neg.    | Neg.              | Neg.     |

***Testarea vaccinului LYSVULPEN la bursuci (Meles meles).***