



BIOVETA, a. s. Komenského 212, 683 23 Ivanovice na Hané, Czech Republic,
tel.: +420 517 318 500, e-mail: comm@bioveta.cz

IV: TESTARE DE EFICACITATE



CUPRINS

A. TESTE ÎN LABORATOR

1. Testarea eficacității la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*)
2. Testarea eficacității la ratoni (*Nyctereutes procyonoides*)
3. Testarea formării imunității la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) după imunizarea cu vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet.
4. Testarea imunității anuale la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) după imunizarea pe cale orală cu tulpina SAD Bern (LYSVULPEN por. ad us. vet.)
5. Determinarea dozei de protecție de 50 la sută (PD_{50}) în timpul administrării pe cale orală a tulpinii SAD Bern la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*)
6. Testarea începerii vaccinării împotriva rabiei la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) – testarea impactului anticorpilor colostrali la crearea imunității împotriva rabiei

B. TESTE PE TEREN

A. TESTE ÎN LABORATOR

1. Testarea eficacității la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*)

Testul a fost efectuat în conformitate cu metodologia stipulată în cadrul Farmacopeei Cehe 97, la pagina 3331 „Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem – vaccinul antirabic oral viu pentru vulpi”.

Rezumat

Pentru testare s-a utilizat un număr total de patruzeci și cinci de vulpi roșii (*Vulpes vulpes*). Treizeci și cinci de vulpi au fost vaccinate cu vaccinul antirabic pentru imunizarea pe cale orală a vulpilor, cunoscut sub numele comercial de LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține virusul viu de vaccinare SAD Bern. Imunizarea a fost realizată pe vulpile roșii ținute separat, prin intermediul consumării naturale a unei momeli de vaccinare. Blisterile din aluminiu/material plastic mestecate sau sparte în totalitate, care conțineau virusul, au fost verificate pentru a dovedi consumul. Zece vulpi roșii nu au fost imunizate și au fost utilizate ca animale martor, nevaccinate. Au fost recoltate probe de sânge de la toate animalele testate, la intervale regulate de câte o lună de zile, timp de 6 luni de zile după imunizare, pentru a verifica titrul anticorpilor antirabici, prin determinarea numărului de unități internaționale (IU) prezente în ser. În timpul efectuării testelor, vulpea nr. L73 a decedat ca urmare a unei boli gastrointestinale, la trei luni după imunizare (rabie negativă). În plus, vulpea nr. L85 a fost exclusă din procedura de testare în luna a doua de după imunizare, datorită unei timidități extreme și a automutilării. La șase luni de la imunizare, toate vulpile testate (adică treizeci și trei de vulpi vaccinate și zece vulpi nevaccinate) au fost verificate cu virusul de rabie de stradă prelevat de la o vulpe roșie (*Vulpes vulpes*) provenind de pe teritoriul Republicii Cehe, cu o cantitate totală de 10,000 MICLD₅₀ pentru fiecare animal. Doza de 0,5 ml a fost aplicată pe fiecare mușchi maseter al animalului. Vulpile au fost monitorizate timp de 90 de zile după infectare. Rezultatele serologice au confirmat faptul că imunitatea de protecție a fost generată în totalitate la o lună după imunizare și că s-a menținut un nivel suficient de protecție pe durata întregului interval de testare, adică timp de șase luni după imunizare. Numai vulpile nr. L66 și L81 nu au răspuns din punct de vedere imunologic prin formarea de anticorpi antirabici post-vaccinare.

Testul de verificare a demonstrat o imunitate de protecție bună a vaccinului, în condițiile în care treizeci și una de vulpi imunizate au supraviețuit infectării de verificare (adică 94 la sută) și doar două vulpi (adică 6 la sută) au decedat de rabie. Acestea au fost vulpile L66 și L81, care nu au dispus de titrul de protecție de anticorpi antirabici, așa cum a rezultat din examinarea serologică. Toate animalele testate, atât cele decedate, cât și animalele care au fost eutanasiate fără suferință imediat după încheierea perioadei de testare, au fost verificate cu privire la prezența în creier a virusului de rabie, în baza metodei de imunofluorescență directă și în baza unui test biologic. Prezența rabiei nu a fost demonstrată la animalele vaccinate, care au supraviețuit, dar a fost demonstrată la toate cele zece vulpi martor, care au decedat.

Rezultate eficacității atinse în timpul testării vaccinului LYSVULPEN por. ad us. vet. la vulpi îndeplinește toate criteriile de verificare definite de către Farmacopeea Cehă 97 pentru acest tip de testare.

Dizertație

Testarea eficacității vaccinului antirabic pentru imunizarea pe cale orală a vulpilor, efectuată pe specia țintă prin intermediul administrării naturale a vaccinului comercial și evaluarea eficacității prin intermediul examinării serologice și a testului de supunere la acțiunea virusului, reprezintă cel mai obiectiv test de eficacitate a vaccinului testat. Criteriile de evaluare de bază sunt considerate a fi răspunsul serologic conform la nivelul anticorpilor antirabici specifici care depășesc 0.5 IU, și supraviețuirea a cel puțin 92 la sută din animalele vaccinate în cadrul testării, în condițiile în care 90 la sută din animalele martor, nevaccinate, decedează. În cadrul experimentului nostru, virusul de rabie prelevat de la o vulpe provenind de pe teritoriul Republicii Cehe, a fost utilizat drept virus de verificare. Vulpea roșie reprezintă vectorul principal al rabiei pe teritoriul Europei. Mostra de vaccin LYSVULPEN por. ad us. vet. induce un nivel ridicat de imunitate specifică de protecție împotriva virusului de rabie de stradă, la vulpile imunizate, și are o importanță extraordinară pentru asigurarea

imunoprofilaxiei împotriva acestei boli. Formarea imunității de protecție la vulpile vaccinate este probabil mai ridicată decât cele 94 de procente pe care le-am demonstrat, în condițiile în care atât vulpea decedată (nr. L73) cât și vulpea exclusă din procedura de testare (nr. L85) dispuneau de un titru suficient de anticorpi de protecție și este foarte probabil ca acestea să fi supraviețuit infectării de verificare. În acest caz imunitatea de protecție generată după imunizare ar fi fost de aproape 95 la sută. Rezultatele examinării serologice (determinare IU) au demonstrat o reacție foarte bună de imunizare după imunizarea cu tulpina de vaccinare SAD Bern. Nivelul minim de protecție de 0.5 IU, de anticorpi antirabici specifici, a fost dovedit serologic încă de la prima recoltare de probe de sânge, efectuată la o lună după imunizare. În baza nivelului ridicat de anticorpi detectat la prima prelevare, se poate deduce fără îndoială faptul că imunitatea de protecție se formează mult mai devreme după administrarea vaccinului, înainte de trecerea primei luni de zile, atunci când imunitatea de protecție a fost demonstrată în baza efectuării testului.

Cu privire la efectul solicitat al testelor de eficacitate farmaceutică la vulpi, au fost publicate recent unele rezultate ale testelor obținute de către alți autori. Un test de eficacitate a tulpinii de vaccinare care conține tulpina vie SAD B19 la vulpi a fost descris de către NEUBERT (2001). Rezultate conforme ale testelor de eficacitate au fost obținute de asemenea cu virusul SAD B19 (imunitatea de protecție a fost demonstrată la 92.3 la sută din vulpile roșii vaccinate).

Concluzie

Un test de eficacitate al preparatului LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține tulpina vie de vaccinare SAD Bern, a fost efectuat pe vulpile roșii, în conformitate cu testul farmaceutic. Rezultatele obținute sunt conforme și îndeplinesc cerințele impuse de către Farmacopee cu privire la acest test.

**Lista și caracteristicile animalelor incluse în testarea eficacității
(categorie – vulpe roșie – *Vulpes vulpes*)**

Nr. curent al animalului	Nr. de identificare a animalului	Caracteristicile animalului			Comentarii
		vârstă	sex	stare de sănătate	
1	L61	3,5 luni	♂	bună	
2	L62	3,5 luni	♂	bună	
3	L63	3,5 luni	♀	bună	
4	L64	3,5 luni	♂	bună	
5	L65	3,5 luni	♀	bună	
6	L66	3,5 luni	♂	bună	
7	L67	3,5 luni	♀	bună	
8	L68	3 luni	♀	bună	
9	L69	3 luni	♂	bună	
10	L70	3 luni	♂	bună	
11	L71	3 luni	♀	bună	
12	L72	3 luni	♀	bună	
13	L73	3 luni	♂	bună	cel mai slab individ dintre animalele tinere
14	L74	3,5 luni	♂	bună	
15	L75	3,5 luni	♂	bună	
16	L76	3,5 luni	♀	bună	
17	L77	3,5 luni	♂	bună	
18	L78	3,5 luni	♀	bună	
19	L79	3 luni	♀	bună	
20	L80	3 luni	♀	bună	
21	L81	3 luni	♂	bună	
22	L82	3 luni	♀	bună	
23	L83	3 luni	♀	bună	
24	L84	3 luni	♂	bună	
25	L85	3 luni	♀	bună	timiditate, automutilare
26	L86	3,5 luni	♀	bună	
27	L87	3,5 luni	♂	bună	
28	L88	3,5 luni	♂	bună	
29	L89	3,5 luni	♀	bună	
30	L90	3,5 luni	♀	bună	
31	L91	3,5 luni	♀	bună	
32	L92	3 luni	♂	bună	
33	L93	3 luni	♂	bună	
34	L94	3 luni	♀	bună	
35	L95	3 luni	♀	bună	
36	L96	3 luni	♂	bună	
37	L97	3 luni	♂	bună	
38	L98	3 luni	♀	bună	
39	L99	3 luni	♀	bună	
40	L100	3,5 luni	♀	bună	
41	L101	3,5 luni	♀	bună	
42	L102	3,5 luni	♂	bună	
43	L103	3,5 luni	♀	bună	
44	L104	3,5 luni	♂	bună	
45	L105	3,5 luni	♀	bună	

Protocol de testare

a) Descrierea metodelor aplicate:

a1) Determinarea numărului de IU în serul animalelor vaccinate – metodă de Smith, J. S. și partenerii (1973).

a2) demonstrarea virusului – creierul tuturor vulpilor roșii care au fost incluse în testul de verificare (atât animalele vaccinate, cât și cele martor) a fost verificat după ce animalele au fost eutanasiate sau după ce au decedat, după expirarea perioadei de monitorizare, în vederea detectării prezenței antigenului de rabie, prin intermediul examinării imunofluorescente (Dean și Abelseth, 1973) și prin intermediul unui test biologic efectuat pe șoareci (Koprowski, 1973).

a3) Metode statistice și calcule aplicate în cadrul testării

Titrurile de anticorpi și de virus au fost calculate în baza metodei introduse de către Reed și Muench (1938).

b) Descrierea instrumentelor utilizate:

- pipete automate de 0,05 ml – Sharples
- microscop imunofluorescent – tip: Phasenkontrast mit Mikroval – Mikroskopen, Carl – Zeiss Jena
- seringi de 0,1 ml – tip: Hemilton
- incubator – 37 °C și 5 % CO₂ – de la compania Hereus
- microplăcuțe Dynatech din material plastic, pentru titrarea virusului și a serurilor

c) Descrierea materialelor utilizate:

- LYSVULPEN por. ad us. vet., lot 34 06, titru al virusului TCID₅₀ = 10^{7.1}/ml
- conjugat antirabic și negativ de la producătorul Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané
- ser antirabic de standard internațional
- virus infecțios de rabie prelevat de la glandele salivare ale unei vulpi roșii provenind de pe teritoriul Republicii Ceha, într-o doză de 10,000 MICLD₅₀ per 1 ml per un animal (perioadă de monitorizare de 90 de zile)

d) Animale utilizate în cadrul testului

d1) Specie – vulpe

d2) Gen sau familie – vulpe roșie (*Vulpes vulpes*)

d3) Categorie animal – animale tinere, cu vârsta între 3 și 3,5 luni

d4) Origine – animalele provin de pe teritoriul Republicii Ceha

d5) Identificare – un tatuaj pe auricul

d6) Număr de animale – 45

d7) Condiții în care au fost menținute animalele - vulpile au fost menținute în Țărcuri de câte 5 animale per Țărc. Vulpile de același sex au fost plasate întotdeauna în același Țărc. Țărcul a fost împărțit într-o incintă interioară, cu o zonă de odihnă pentru vulpi, și o zonă exterioară. Incinta interioară a fost betonată și zona exterioară a fost prevăzută cu pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața incintei interioare plus zona adiacentă) a fost de 10 metri pătrați, pentru cinci vulpi.

d8) Hrănirea animalelor – vulpile au fost hrănite cu un amestec granulat complex pentru câini, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă, precum și cu resturi de carne fierte și intestine selectate de la abatoare. Dozele de hrană din amestec comercial au fost determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea vulpilor. Vulpile au fost hrănite o dată pe zi, în speță la ora 2.00 p.m. Apa potabilă a fost la dispoziția vulpilor ad libitum.

d9) Numele proprietarului animalelor - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

d10) Numele institutului de testare - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

e) Doza de administrare, modalitatea de administrare, schema de administrare și orele de administrare, schema de recoltare a sângelui

Doza de administrare – 1 doză de administrare (1 momeală)

Modalitatea de administrare – per os (consum natural), blisterele sparte din aluminiu/material plastic au fost verificate pentru a dovedi consumul

Schema de administrare – doza de administrare recomandată a vaccinului a fost administrată într-o singură tranșă

Schema de recoltare a sângelui – sângele a fost recoltat înainte și la 1, 2, 3, 4, 5 și 6 luni după imunizare

Test de verificare – a fost efectuat la 6 luni după imunizare

Animale martor – 10 vulpi roșii nevaccinate

Numele, adresa, poziția și calificarea persoanei care a realizat examinarea:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Născut la: 26 noiembrie, 1953

Educație: 1969 - 1973: Școala secundară de agricultură și inginerie – specializarea: veterinară, în Kroměříž

1973 - 1979: Universitatea veterinară din Brno

1 aprilie, 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea stagiului de practică

1979 - 1980: serviciu militar la serviciul veterinar al Gărzii de Frontieră

1980 - 1987: controlor independent în cadrul Departamentului pentru controlul calității și management

1985 - 1990: teză de doctorat a disciplinei epizootologie și zooigenă

1987 - 1995: Șef de departament pentru controlul calității și management

începând cu 1 februarie, 1995: director de producție la Bioveta, s.r.o.

începând cu 1 ianuarie, 1998 până în ziua de azi: director de producție și de dezvoltare pentru biopreparatele și medicamentele veterinare

Apartenență la organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie - începând cu 1980

Asociația științifică cehoslovacă pentru micologie - începând cu 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie - începând cu 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul sau coautorul a 101 publicații profesionale.

Certificate de autor:

Este autorul sau coautorul a 15 brevete și 5 design-uri utilitare.

Rapoarte finale de analiză:

Este autorul sau coautorul a 19 rapoarte finale pentru preparate introduse în practică.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Tabelul nr. 1 Testarea eficacității la vulpile roșii(Vulpes vulpes)

Nr. crt.	Nr. vulpe	Lot	Zi aplicare	IU/ml							Zi verificare	Doză verificare (MICLD ₅₀)	Rezultate verificare – la 90 zile	examinare post mortem		Notă
				0 - iniț.	1 luni	2 luni	3 luni	4 luni	5 luni	6 luni				fluorescență directă	test biologic	
1	L61	34 06	16.6.99	0	25,5	45,8	51,5	52,4	51,8	48,5	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
2	L62	34 06	16.6.99	0	9,8	31,5	46	46,2	47,5	46,6	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
3	L63	34 06	16.6.99	0	31,4	61,2	68,4	70,4	61,4	55,8	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
4	L64	34 06	16.6.99	0	21,6	46,2	52,4	61,6	53,8	50,2	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
5	L65	34 06	16.6.99	0	29,4	47,8	52,5	57,7	56,8	51,1	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
6	L66	34 06	16.6.99	0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
7	L67	34 06	16.6.99	0	2,9	17,5	29,4	31,4	30,2	28,7	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
8	L68	34 06	16.6.99	0	31,8	66,1	68,7	70,7	65,8	60,4	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
9	L69	34 06	16.6.99	0	30,1	45,8	60,2	61,7	60,2	57,3	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
10	L70	34 06	16.6.99	0	26,2	38,5	41,9	44,8	45,2	44,8	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
11	L71	34 06	16.6.99	0	25,4	38,1	44,6	47,2	46,7	45,9	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
12	L72	34 06	16.6.99	0	29,4	44,4	48,8	48,9	46,9	47,8	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
13	L73	34 06	16.6.99	0	23,2	35,2	46,2	–	–	–	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	deces – rabie neg.
14	L74	34 06	16.6.99	0	7,8	19,6	31,7	33,1	30,5	30,2	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
15	L75	34 06	16.6.99	0	29,2	39,7	45,5	46,2	48,2	44,7	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
16	L76	34 06	16.6.99	0	32,2	45,5	51,4	53,7	55,7	51,6	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
17	L77	34 06	16.6.99	0	30,6	47,2	42,7	56,2	55,6	54,9	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
18	L78	34 06	16.6.99	0	17,7	30,3	40,3	44,9	51,8	51,8	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
19	L79	34 06	16.6.99	0	18,9	32,4	40,2	41,7	45,2	44,7	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
20	L80	34 06	16.6.99	0	29,4	39,9	46,2	47,2	45,4	45,1	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
21	L81	34 06	16.6.99	0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
22	L82	34 06	16.6.99	0	11,2	27,6	44,6	48,9	45,7	44,8	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
23	L83	34 06	16.6.99	0	16,8	35,4	46,8	51,7	49,9	47,7	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
24	L84	34 06	16.6.99	0	26,7	40,2	49,9	52,2	50,1	49,1	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	

Nr. crt.	Nr. vulpe	Lot	Zi aplicare	IU/ml							Zi verificare	Doză verificare (MICLD ₅₀)	Rezultate verificare – la 90 zile	examinare post mortem		Notă
				0 - iniț.	1 luni	2 luni	3 luni	4 luni	5 luni	6 luni				fluorescență directă	test biologic	
25	L85	34 06	16.6.99	0	29,8	44,8	–	–	–	–	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	prea timidă
26	L86	34 06	16.6.99	0	34	60,1	68,2	72,6	70,5	67,5	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
27	L87	34 06	16.6.99	0	22,7	37,2	44,6	44,6	45,5	44,9	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
28	L88	34 06	16.6.99	0	18,2	33,4	47,1	51,8	50,4	48,6	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
29	L89	34 06	16.6.99	0	24,7	38,6	49,1	50,2	41,9	40,1	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
30	L90	34 06	16.6.99	0	27,2	40,2	49,5	51,6	52,0	48,6	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
31	L91	34 06	16.6.99	0	26,8	40,8	51,4	51,4	50,2	49,1	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
32	L92	34 06	16.6.99	0	25,7	44,5	49,8	49,9	45,2	41,9	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
33	L93	34 06	16.6.99	0	31,2	51,7	55,2	58,2	55,4	50,2	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
34	L94	34 06	16.6.99	0	26,5	46,2	51,7	52,5	50,3	48,9	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
35	L95	34 06	16.6.99	0	24,9	46,8	51,6	52,2	50,8	47,3	22.12.99	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
36	L96	martor	fără administrare	0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
37	L97	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
38	L98	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
39	L99	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
40	L100	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
41	L101	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
42	L102	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
43	L103	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
44	L104	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
45	L105	martor		0	0	0	0	0	0	0	22.12.99	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
titru mediu anticorpi (IU/ml)				0	22,8	38,8	46,4	48,6	50,2	48						

2. Testarea eficacității la ratoni (*Nyctereutes procyonoides*)

Testul a fost efectuat în conformitate cu metodologia stipulată în cadrul Farmacopeei Cehe 97, la pagina 3331 „Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem – vaccinul antirabic oral viu pentru vulpi”.

Rezumat

Pentru testare s-a utilizat un număr total de cincisprezece ratoni (*Nyctereutes procyonoides*). Zece ratoni au fost vaccinați cu vaccinul antirabic pentru imunizarea pe cale orală a vulpilor, cunoscut sub numele comercial de LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține virusul viu de vaccinare SAD Bern. Imunizarea a fost realizată pe ratonii ținuți separat, prin intermediul consumării naturale a unei momeli de vaccinare. Blisterele din aluminiu/material plastic mestecate sau sparte în totalitate, care conțineau virusul, au fost verificate pentru a dovedi consumul. Cinci ratoni nu au fost imunizați și au fost utilizați ca animale martor, nevaccinate. Au fost colectate probe de sânge de la toți ratonii testați, la intervale regulate de câte o lună de zile, timp de 6 luni de zile după imunizare, pentru a verifica titrul anticorpilor antirabici, prin determinarea numărului de unități internaționale (IU) prezente în ser. La șase luni de la imunizare, toți ratonii testați (adică zece ratoni vaccinați și cinci ratoni nevaccinați) au fost supuși virusului de rabie de stradă prelevat de la o vulpe roșie (*Vulpes vulpes*) provenind de pe teritoriul Republicii Cehe, cu o cantitate totală de 10,000 MICLD₅₀ pentru fiecare animal. Doza de 0,5 ml a fost aplicată pe fiecare mușchi maseter al animalului. Ratonii au fost monitorizați timp de 90 de zile după infectare. Rezultatele serologice au confirmat faptul că imunitatea de protecție a fost generată în totalitate la o lună după imunizare și că s-a menținut un nivel suficient de protecție pe durata întregului interval de testare, adică timp de șase luni după imunizare.

Testul de verificare a demonstrat o imunitate bună de protecție a vaccinului, în condițiile în care zece ratoni imunizați au supraviețuit infectării de verificare (adică 100 la sută). Toate animalele testate, atât cele decedate, cât și animalele care au fost eutanasiate fără suferință imediat după încheierea perioadei de testare, au fost verificate cu privire la prezența în creier a virusului de rabie, în baza metodei de imunofluorescență directă și în baza unui test biologic. Prezența rabiei nu a fost demonstrată la animalele vaccinate, care au supraviețuit, dar a fost demonstrată la toți cei cinci ratoni martori, care au decedat.

Rezultate eficacității atinse în timpul testării vaccinului LYSVULPEN por. ad us. vet. la câinii enot îndeplinesc toate criteriile de verificare definite de către Farmacopeea Cehă 97 pentru acest tip de testare.

Dizertație

Testarea eficacității vaccinului antirabic pentru imunizarea pe cale orală a vulpilor, efectuată pe specia țintă prin intermediul administrării naturale a vaccinului comercial și evaluarea eficacității prin intermediul examinării serologice și a testului de supunere la acțiunea virusului, reprezintă cel mai obiectiv test de eficacitate a vaccinului testat. Criteriile de evaluare de bază sunt considerate a fi răspunsul serologic conform la nivelul anticorpilor antirabici specifici care depășesc 0.5 IU, și supraviețuirea a cel puțin 92 la sută din animalele vaccinate în cadrul testării, în condițiile în care 90 la sută din animalele martor, nevaccinate, decedează. În cadrul experimentului nostru, virusul de rabie prelevat de la o vulpe provenind de pe teritoriul Republicii Cehe, a fost utilizat drept virus de verificare. Vulpea roșie reprezintă vectorul principal al rabiei pe teritoriul Europei. Mostra de vaccin LYSVULPEN por. ad us. vet. induce un nivel ridicat de imunitate specifică de protecție împotriva virusului de rabie de stradă, la câinii enot imunizați, și are o importanță extraordinară pentru asigurarea imunoprofilaxiei împotriva acestei boli. Rezultatele examinării serologice (determinare IU) au demonstrat o reacție foarte bună de imunizare după imunizarea cu tulpina de vaccinare SAD Bern. Nivelul minim de protecție de 0.5 IU, de anticorpi antirabici specifici, a fost dovedit serologic încă de la prima recoltare de probe de sânge, efectuată la o lună după imunizare. În baza nivelului ridicat de anticorpi detectat la prima prelevare, se poate deduce fără îndoială faptul că imunitatea de protecție se formează mult mai devreme după consumarea momelii, înainte de trecerea primei luni de zile, atunci când imunitatea de protecție a fost demonstrată în baza efectuării testului.

Concluzie

Un test de eficacitate al preparatului LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține tulpina vie de vaccinare SAD Bern, a fost efectuat pe ratoni, în conformitate cu testul farmacopeic. Rezultatele obținute sunt conforme și îndeplinesc cerințele impuse de către Farmacopee cu privire la acest test.

Lista și caracteristicile animalelor incluse în testarea eficacității
(categorie – raton – *Nyctereutes procyonoides*)

Nr. curent al animalului	Nr. de identificare a animalului	Caracteristicile animalului			Comentarii
		vârstă	sex	stare de sănătate	
1	M31	3,5 luni	♂	bună	
2	M32	3,5 luni	♀	bună	
3	M33	3,5 luni	♂	bună	
4	M34	3,5 luni	♂	bună	
5	M35	3,5 luni	♂	bună	
6	M36	3,5 luni	♀	bună	
7	M37	4 luni	♀	bună	
8	M38	4 luni	♀	bună	
9	M39	4 luni	♂	bună	
10	M40	4 luni	♀	bună	
11	M41	3 luni	♀	bună	
12	M42	3 luni	♂	bună	
13	M43	3 luni	♂	bună	
14	M44	3 luni	♀	bună	
15	M45	3 luni	♀	bună	

Protocol de testare

a) Descrierea metodelor aplicate:

a1) Determinarea numărului de IU în serul animalelor vaccinate – metodă de Smith, J. S. și partenerii (1973).

a2) demonstrarea virusului – creierul tuturor ratonilor care au fost incluși în testul de verificare (atât animalele vaccinate, cât și cele martor) a fost verificat după ce animalele au fost eutanasiate sau după ce au decedat, după expirarea perioadei de monitorizare, în vederea detectării prezenței antigenului de rabie, prin intermediul examinării imunofluorescente (Dean și Abelseth, 1973) și prin intermediul unui test biologic efectuat pe șoareci (Koprowski, 1973).

a3) Metode statistice și calcule aplicate în cadrul testării

Titrurile de anticorpi și de virus au fost calculate în baza metodei introduse de către Reed și Muench (1938).

b) Descrierea instrumentelor utilizate:

- pipete automate de 0,05 ml – Sharples
- microscop imunofluorescent – tip: Phasenkontrast mit Mikroval – Mikroskopen, Carl – Zeiss Jena
- seringi de 0,1 ml – tip: Hemilton
- incubator – 37 °C și 5 % CO₂ – de la compania Hereus
- microplăcuțe Dynatech din material plastic, pentru titrarea virusului și a serurilor

c) Descrierea materialelor utilizate:

- LYSVULPEN por. ad us. vet., lot 34 06, titru al virusului TCID₅₀ = 10^{7.1}/ml
- conjugat antirabic și negativ de la producătorul Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané
- ser antirabic de standard internațional
- virus infecțios de rabie prelevat de la glandele salivare ale unei vulpi roșii provenind de pe teritoriul Republicii Ceha, într-o doză de 10,000 MICLD₅₀ per 1 ml per un animal (perioadă de monitorizare de 90 de zile)

d) Animale utilizate în cadrul testului

d1) Specie – raton

d2) Gen sau familie – raton (*Nyctereutes procyonoides*)

d3) Categorie animal – animale tinere, cu vârsta între 3 și 4 luni

d4) Origine – animalele provin de pe teritoriul Republicii Ceha

d5) Identificare – un tatuaj pe auricul

d6) Număr de animale – 15

d7) Condiții în care au fost menținute animalele - ratonii au fost menținuți în țarcuri de câte 5 animale per țarc. Ratonii de același sex au fost plasați întotdeauna în același țarc. Țarcul a fost împărțit într-o incintă interioară, cu o zonă de odihnă pentru animale, și o zonă exterioară. Incinta interioară a fost betonată și zona exterioară a fost prevăzută cu pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața incintei interioare plus zona adiacentă) a fost de 10 metri pătrați, pentru cinci ratoni.

d8) Hrănirea animalelor – ratonii au fost hrăniți cu un amestec granulat complex pentru câini, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă, precum și cu resturi de carne fierte și intestine selectate de la abatoare. Dozele de hrană din amestec comercial au fost determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea animalelor. Ratonii au fost hrăniți o dată pe zi, în speță la ora 2.00 p.m. Apa potabilă a fost la dispoziția animalelor ad libitum.

d9) Numele proprietarului animalelor - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

d10) Numele institutului de testare - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

e) Doza de administrare, modalitatea de administrare, schema de administrare și orele de administrare, schema de recoltare a sângelui

Doza de administrare – 1 doză de administrare (1 momeală)

Modalitatea de administrare – per os (consum natural), blisterele sparte din aluminiu/material plastic au fost verificate pentru a dovedi consumul

Schema de administrare – doza de administrare recomandată a vaccinului a fost administrată într-o singură tranșă

Schema de recoltare a sângelui – sângele a fost recoltat înainte și la 1, 2, 3, 4, 5 și 6 luni după imunizare

Test de verificare – a fost efectuat la 6 luni după imunizare

Animale martor – cinci ratoni nevaccinați

Numele, adresa, poziția și calificarea persoanei care a realizat examinarea:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Născut la: 26 noiembrie, 1953

Educație: 1969 - 1973: Școala secundară de agricultură și inginerie – specializarea: veterinară, în Kroměříž

1973 - 1979: Universitatea veterinară din Brno

1 aprilie, 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea stagiului de practică

1979 - 1980: serviciu militar la serviciul veterinar al Gărzii de Frontieră

1980 - 1987: controlor independent în cadrul Departamentului pentru controlul calității și management

1985 - 1990: teză de doctorat a disciplinei epizootologie și zooigenă

1987 - 1995: Șef de departament pentru controlul calității și management

începând cu 1 februarie, 1995: director de producție la Bioveta, s.r.o.

începând cu 1 ianuarie, 1998 până în ziua de azi: director de producție și de dezvoltare pentru biopreparatele și medicamentele veterinare

Apartenență la organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie - începând cu 1980

Asociația științifică cehoslovacă pentru micologie - începând cu 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie - începând cu 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul sau coautorul a 101 publicații profesionale.

Certificate de autor:

Este autorul sau coautorul a 15 brevete și 5 design-uri utilitare.

Rapoarte finale de analiză:

Este autorul sau coautorul a 19 rapoarte finale pentru preparate introduse în practică.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.



BIOVETA, a. s. Komenského 212, 683 23 Ivanovice na Hané, Czech Republic,
tel.: 420/517/363321-4 e-mail: comm@bioveta.cz

Tabelul nr. 2 Testarea eficacității la ratoni (*Nyctereutes procyonoides*)

Nr. crt.	Nr. raton	Lot	Zi aplicare	IU/ml							Zi verificare	Doză verificare (MICLD ₅₀)	Rezultate verificare – la 90 zile	examinare post mortem		Notă
				0 - iniț.	1 luni	2 luni	3 luni	4 luni	5 luni	6 luni				fluorescență directă	test biologic	
1	M31	34 06	28.7.99	0	10,2	21,0	23,5	25,0	26,2	24,7	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
2	M32	34 06	28.7.99	0	14,1	19,1	20,8	23,6	25,7	23,9	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
3	M33	34 06	28.7.99	0	12,2	23,2	23,6	24,9	25,3	24,7	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
4	M34	34 06	28.7.99	0	14,1	21,4	23,1	24,6	26,1	25,0	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
5	M35	34 06	28.7.99	0	9,8	20,9	22,5	23,9	25,4	24,1	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
6	M36	34 06	28.7.99	0	10,9	21,4	23,0	25,8	26,1	24,7	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
7	M37	34 06	28.7.99	0	12,1	18,9	21,5	23,7	24,9	23,5	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
8	M38	34 06	28.7.99	0	11,3	22,6	23,3	25,2	26,1	24,2	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
9	M39	34 06	28.7.99	0	12,8	20,8	22,7	24,6	25,9	24,2	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
10	M40	34 06	28.7.99	0	12,6	21,5	21,9	23,8	24,7	23,5	11.2.00	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
11	M41	martor	fără administrare	0	0	0	0	0	0	0	11.2.00	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
12	M42	martor		0	0	0	0	0	0	0	11.2.00	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
13	M43	martor		0	0	0	0	0	0	0	11.2.00	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
14	M44	martor		0	0	0	0	0	0	0	11.2.00	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
15	M45	martor		0	0	0	0	0	0	0	11.2.00	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
Titru mediu anticorpi (IU/ml)				0	12,01	21,08	22,59	24,51	25,64	24,25						

3. Testarea formării imunității la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) după imunizarea cu vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet.

Rezumat

Pentru testare s-a utilizat un număr total de douăzeci și cinci de vulpi roșii (*Vulpes vulpes*) tinere, cu vârsta între 3,5 și 4 luni. Vulpile au fost împărțite în cinci grupe de testare de câte cinci animale. Înainte de începerea testului s-a recoltat sânge de la toate vulpile pentru a determina titrul inițial de anticorpi antirabici. În continuare vulpile din toate grupele de testare au fost imunizate cu vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține virusul viu atenuat de rabie de vaccinare din tulpina SAD Bern. Ulterior vulpile din grupele individuale de testare au fost infectate cu virusul de rabie de stradă, prelevat de la o vulpe roșie provenind de pe teritoriul Republicii Cehe. Infectările au fost realizate la 7, 14, 21, 28 și 35 după imunizare. Doza de infectare pentru un individ a fost de 10,000 MICLD₅₀, împărțită în 0,5 ml aplicați în ambii mușchi maseter ai animalului. Până la momentul infectării, s-a recoltat sânge de la toate animalele imunizate, pentru a examina titrul de anticorpi antirabici, prin determinarea numărului de unități internaționale (IU) prezent în ser. Vulpile au fost monitorizate pe o perioadă de 90 de zile după infectare.

Rezultatele serologice au confirmat faptul că imunitatea de protecție s-a format în totalitate la 21 de zile de la imunizare.

Testul de verificare a demonstrat faptul că imunitatea de protecție s-a format în totalitate la 21 de zile de la imunizare.

Rezultatele testului au demonstrat faptul că imunitatea de protecție la animalele țintă – vulpi roșii (*Vulpes vulpes*) – se formează în totalitate la 21 de zile de la imunizarea cu vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet.

Dizertație

Testarea formării imunității de protecție după aplicarea unui preparat imunobiologic reprezintă unul din parametri calitativi de bază care se testează cu scopul de a dezvolta un preparat nou. Familiarizarea cu momentul în care animalul imunizat este protejat în totalitate împotriva infectării pe teren este de o importanță practică considerabilă pentru determinarea strategiei de vaccinare, cu scopul de a crea o populație protejată, cât se poate de mare, în cadrul animalelor țintă.

Este necesar a lua în calcul faptul că formarea imunității este afectată de mai mulți factori. Factorul principal este titrul de virus al vaccinului. Cu cât mai repede animalele țintă consumă momeala cu virusul de vaccinare (cu cel mai ridicat titru de virus de vaccinare) după distribuirea sa, cu atât mai repede se formează reacția anticorpilor în faza post-vaccinare și cu atât mai solizi sunt aceștia. Următorul factor este temperatura exterioară. La temperaturi care depășesc 30 °C, eficacitatea vaccinului scade rapid. În timpul iernii, la o temperatură de 0 °C și mai scăzută, virusul de vaccinare din momeală îngheață. Astfel, după ce momeala este consumată de către animalele țintă și blisterul este spart, virusul de vaccinare nu este în stare să curgă înspre exterior și nu stimulează zonele de imunitate din cavitatea orală și din nasopharynx, ci este înghițit împreună cu momeala și se dezactivează pe tractul de alimentare, fără a fi indus formarea de anticorpi specifici de neutralizare a virusului și formarea imunității de protecție. Formarea imunității și formarea condițiilor de protecție împotriva infectării în teren cu virusul de rabie sunt afectate de asemenea de către speciile țintă în sine. Starea de sănătate a animalelor în mod special are un impact asupra formării unei reacții ferme de imunizare, după consumarea momelii. Stările indivizilor fără capacitate de imunizare, care nu formează anticorpi specifici, în condiții de întreținere a tuturor condițiilor necesare pentru formarea unei stări de imunitate, nu sunt neobișnuite.

Concluzie

După administrarea vaccinului LYSVULPEN por. ad us. vet. care conține virusul viu atenuat de rabie de vaccinare din tulpina SAD Bern, imunitatea de protecție împotriva infectării cu rabie se formează la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) după 21 de zile.

**Lista și caracteristicile animalelor incluse în testarea verificării formării imunității după
imunizarea împotriva rabiei
(categorie – vulpe roșie – *Vulpes vulpes*)**

Nr. curent al animalului	Nr. de identificare a animalului	Caracteristicile animalului			Comentarii
		vârstă	sex	stare de sănătate	
1	N1	3,5 luni	♀	bună	diaree
2	N2	3,5 luni	♀	bună	
3	N3	3,5 luni	♀	bună	
4	N4	3,5 luni	♂	bună	
5	N5	3,5 luni	♂	bună	
6	N6	3,5 luni	♂	bună	
7	N7	4 luni	♀	bună	
8	N8	4 luni	♀	bună	
9	N9	4 luni	♂	bună	coadă roasă
10	N10	3,5 luni	♀	bună	
11	N11	3,5 luni	♀	bună	
12	N12	3,5 luni	♂	bună	
13	N13	3,5 luni	♀	bună	
14	N14	3,5 luni	♀	bună	
15	N15	3,5 luni	♀	bună	
16	N16	4 luni	♂	bună	
17	N17	4 luni	♂	bună	
18	N18	4 luni	♂	bună	
19	N19	4 luni	♀	bună	
20	N20	4 luni	♂	bună	canin eliminat
21	N21	3,5 luni	♂	bună	
22	N22	3,5 luni	♀	bună	
23	N23	3,5 luni	♂	bună	
24	N24	3,5 luni	♂	bună	
25	N25	3,5 luni	♀	bună	

Protocol de testare

a) Descrierea metodelor aplicate:

a1) Determinarea numărului de IU în serul animalelor vaccinate – metodă de Smith, J. S. și partenerii (1973).

a2) demonstrarea virusului – creierul tuturor vulpilor roșii care au fost incluse în testul de verificare (atât animalele vaccinate, cât și cele martor) a fost verificat după ce animalele au fost eutanasiate sau după ce au decedat, după expirarea perioadei de monitorizare, în vederea detectării prezenței antigenului de rabie, prin intermediul examinării imunofluorescente (Dean și Abelseth, 1973) și prin intermediul unui test biologic efectuat pe șoareci (Koprowski, 1973).

a3) Metode statistice și calcule aplicate în cadrul testării

Titrurile de anticorpi și de virus au fost calculate în baza metodei introduse de către Reed și Muench (1938).

b) Descrierea instrumentelor utilizate:

- pipete automate de 0,05 ml – Sharples
- microscop imunofluorescent – tip: Phasenkontrast mit Mikroval – Mikroskopen, Carl – Zeiss Jena
- seringi de 0,1 ml – tip: Hemilton
- incubator – 37 °C și 5 % CO₂ – de la compania Hereus
- microplăcuțe Dynatech din material plastic, pentru titrarea virusului și a serurilor

c) Descrierea materialelor utilizate:

- LYSVULPEN por. ad us. vet., lot 23 05, titru al virusului TCID₅₀ = 10^{7,3}/ml
- conjugat antirabic și negativ de la producătorul Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané
- ser antirabic de standard internațional
- virus infecțios de rabie prelevat de la glandele salivare ale unei vulpi roșii provenind de pe teritoriul Republicii Ceha, într-o doză de 10,000 MICLD₅₀ per 1 ml per un animal (perioadă de monitorizare de 90 de zile)

d) Animale utilizate în cadrul testului

d1) Specie – vulpe

d2) Gen sau familie – vulpe roșie (*Vulpes vulpes*)

d3) Categorie animal – animale tinere, cu vârsta între 3,5 și 4 luni

d4) Origine – animalele provin de pe teritoriul Republicii Ceha

d5) Identificare – un tatuaj pe auricul

d6) Număr de animale – 25

d7) Condiții în care au fost menținute animalele - vulpile au fost menținute în Țarcuri de câte 5 animale per Țarc. Vulpile de același sex au fost plasate întotdeauna în același Țarc. Țarcul a fost împărțit într-o incintă interioară, cu o zonă de odihnă pentru vulpi, și o zonă exterioară. Incinta interioară a fost betonată și zona exterioară a fost prevăzută cu pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața incintei interioare plus zona adiacentă) a fost de 10 metri pătrați, pentru cinci vulpi.

d8) Hrănirea animalelor – vulpile au fost hrănite cu un amestec granulat complex pentru câini, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă, precum și cu resturi de carne fierte și intestine selectate de la abatoare. Dozele de hrană din amestec comercial au fost determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea vulpilor. Vulpile au fost hrănite o dată pe zi, în speță la ora 2.00 p.m. Apa potabilă a fost la dispoziția vulpilor ad libitum.

d9) Numele proprietarului animalelor - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

d10) Numele institutului de testare - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

e) Doza de administrare, modalitatea de administrare, schema de administrare și orele de administrare, schema de recoltare a sângelui

Doza de administrare – 1 doză de administrare (1 momeală)

Modalitatea de administrare – per os (consum natural), blisterele sparte din aluminiu/material plastic au fost verificate pentru a dovedi consumul

Schema de aplicare – vaccinul a fost aplicat în doza de aplicare recomandată, la animale cu vârsta între 3,5 și 4 luni, într-o singură tranșă

Schema de recoltare a sângelui – sângele a fost colectat înainte de începerea testului și apoi gradual, în cadrul grupelor individuale de testare, până în a 35^a zi după imunizare

Test de verificare – a fost efectuat la 7, 14, 21, 28 și 35 după imunizare

Animale martor – nu au fost utilizate animale martor, nevaccinate

Numele, adresa, poziția și calificarea persoanei care a realizat examinarea:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Născut la: 26 noiembrie, 1953

Educație: 1969 - 1973: Școala secundară de agricultură și inginerie – specializarea: veterinară, în Kroměříž

1973 - 1979: Universitatea veterinară din Brno

1 aprilie, 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea stagiului de practică

1979 - 1980: serviciu militar la serviciul veterinar al Gărzii de Frontieră

1980 - 1987: controlor independent în cadrul Departamentului pentru controlul calității și management

1985 - 1990: teză de doctorat a disciplinei epizootologie și zooigienă

1987 - 1995: Șef de departament pentru controlul calității și management

începând cu 1 februarie, 1995: director de producție la Bioveta, s.r.o.

începând cu 1 ianuarie, 1998 până în ziua de azi: director de producție și de dezvoltare pentru biopreparatele și medicamentele veterinare

Apartenență la organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie - începând cu 1980

Asociația științifică cehoslovacă pentru micologie - începând cu 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie - începând cu 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul sau coautorul a 101 publicații profesionale.

Certificate de autor:

Este autorul sau coautorul a 15 brevete și 5 design-uri utilitare.

Rapoarte finale de analiză:

Este autorul sau coautorul a 19 rapoarte finale pentru preparate introduse în practică.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Tabelul nr. 3 Testarea formării imunității la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) după imunizarea cu vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet.

Nr. grupă	Nr. curent vulpe	Nr. vulpe	Recoltare sânge și determinare IU/ ml						Verificare	Doză verificare (MICLD ₅₀)	Rezultate verificare 90 zile	Examinare post mortem		Notă
			0 - iniț.	7 zile	14 zile	21 zile	28 zile	35 zile				fluorescență directă	test biologic	
1	1	N1	0	0,1	–	–	–	–	7 zile după imunizare	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	2	N2	0	0	–	–	–	–	7 zile după imunizare	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	3	N3	0	0,15	–	–	–	–	7 zile după imunizare	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	4	N4	0	0,1	–	–	–	–	7 zile după imunizare	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	5	N5	0	0,1	–	–	–	–	7 zile după imunizare	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
2	6	N6	0	0	0,35	–	–	–	14 zile după imunizare	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	7	N7	0	0	0,30	–	–	–	14 zile după imunizare	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	8	N8	0	0,15	0,55	–	–	–	14 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	9	N9	0	0,2	0,65	–	–	–	14 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	10	N10	0	0,1	0,55	–	–	–	14 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
3	11	N11	0	0	0,35	4,8	–	–	21 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	12	N12	0	0	0,45	5,5	–	–	21 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	13	N13	0	0,15	0,7	8,5	–	–	21 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	

Nr. grupă	Nr. curent vulpe	Nr. vulpe	Recoltare sânge și determinare IU/ ml						Verificare	Doză verificare (MICLD ₅₀)	Rezultate verificare 90 zile	Examinare post mortem		Notă
			0 - iniț.	7 zile	14 zile	21 zile	28 zile	35 zile				fluorescență directă	test biologic	
	14	N14	0	0,1	0,55	7,8	–	–	21 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	15	N15	0	0,1	0,50	7,5	–	–	21 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
4	16	N16	0	0,1	0,5	6,5	22,1	–	28 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	17	N17	0	0,15	0,65	8,5	11,9	–	28 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	18	N18	0	0	0,35	8,0	17,4	–	28 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	19	N19	0	0	0,30	7,7	19,9	–	28 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	20	N20	0	0,1	0,45	8,5	18,3	–	28 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
5	21	N21	0	0,15	0,7	11,4	21,8	25,9	35 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	22	N22	0	0	0,25	7,5	23,2	27,2	35 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	23	N23	0	0	0,35	9,4	19,5	23,1	35 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	24	N24	0	0,1	0,55	6,6	13,5	19,3	35 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	25	N25	0	0,1	0,50	7,2	16,7	24,8	35 zile după imunizare	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	



- ziua realizării infectării

4. Testarea imunității anuale la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) după imunizarea pe cale orală cu tulpina SAD Bern (LYSVULPEN por. ad us. vet.)

Rezumat

Pentru testare au fost utilizate douăzeci de vulpi roșii (*Vulpes vulpes*). Cincisprezece vulpi roșii au fost vaccinate cu vaccinul antirabic pentru imunizarea pe cale orală a vulpilor, cunoscut sub numele comercial de LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține virusul viu de vaccinare SAD Bern. Imunizarea a fost realizată pe vulpile roșii ținute separat, prin intermediul consumării naturale a unei momeli de vaccinare. Blisterile din aluminiu/material plastic mestecate sau sparte în totalitate, care conțineau virusul, au fost verificate pentru a dovedi consumul. Cinci vulpi roșii nu au fost imunizate și au fost utilizate ca animale martor, nevaccinate. Au fost recoltate probe de sânge de la toate animalele testate, la intervale regulate de câte o lună de zile, timp de 12 luni de zile după imunizare, pentru a verifica titrul anticorpilor antirabici, prin determinarea numărului de unități internaționale (IU) prezente în ser. La douăsprezece luni de la imunizare, toate vulpile testate (adică cincisprezece vulpi vaccinate și cinci vulpi nevaccinate) au fost supuse virusului de rabie de stradă prelevat de la o vulpe roșie (*Vulpes vulpes*) provenind de pe teritoriul Republicii Cehe, anume cu o cantitate totală de 10,000 MICLD₅₀ pentru fiecare animal. Doza de 0,5 ml a fost aplicată pe fiecare mușchi maseter al animalului. Vulpile au fost monitorizate timp de 90 de zile după infectare. Rezultatele serologice au confirmat faptul că imunitatea de protecție a fost generată în totalitate la o lună după imunizare și că s-a menținut un nivel suficient de protecție pe durata întregului interval de testare, adică timp de douăsprezece luni după imunizare. Numai vulpea nr. L115 nu a răspuns din punct de vedere imunologic prin formarea de anticorpi antirabici post-vaccinare.

Testul de verificare a demonstrat o imunitate de protecție bună a vaccinului, în condițiile în care paisprezece vulpi imunizate au supraviețuit infectării de verificare (adică 93,4 la sută) și doar o vulpe (adică 6,6 la sută) a decedat de rabie. Aceasta a fost vulpea nr. L115, care nu a dispus de titrul de protecție de anticorpi antirabici, așa cum a rezultat din examinarea serologică. Toate animalele testate, atât cele decedate, cât și animalele care au fost eutanasiate fără suferință imediat după încheierea perioadei de testare, au fost verificate cu privire la prezența în creier a virusului de rabie, în baza metodei de imunofluorescență directă și în baza unui test biologic. Prezența rabiei nu a fost demonstrată la animalele vaccinate, care au supraviețuit, dar a fost demonstrată la toate cele cinci vulpi martor, nevaccinate, care au decedat.

Rezultatele obținute au demonstrat faptul că vaccinul „LYSVULPEN por. ad us. vet.” induce o imunitate de protecție de minim un an la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*).

**Lista și caracteristicile animalelor incluse în testarea imunității anuale
(categorie – vulpe roșie – *Vulpes vulpes*)**

Nr. curent al animalului	Nr. de identificare a animalului	Caracteristicile animalului			Comentarii
		vârstă	sex	stare de sănătate	
1	L106	4 luni	♂	bună	
2	L107	4 luni	♀	bună	
3	L108	4 luni	♂	bună	
4	L109	4 luni	♀	bună	
5	L110	4,5 luni	♂	bună	
6	L111	4,5 luni	♀	bună	
7	L112	4,5 luni	♀	bună	
8	L113	4,5 luni	♀	bună	
9	L114	4,5 luni	♂	bună	
10	L115	4,5 luni	♂	bună	
11	L116	4,5 luni	♀	bună	
12	L117	5 luni	♂	bună	
13	L118	5 luni	♂	bună	
14	L119	5 luni	♀	bună	
15	L120	5 luni	♀	bună	
16	L121	4 luni	♀	bună	
17	L122	4 luni	♀	bună	
18	L123	4 luni	♂	bună	
19	L124	4 luni	♂	bună	
20	L125	4 luni	♀	bună	

Protocol de testare

a) Descrierea metodelor aplicate:

a1) Determinarea numărului de IU în serul animalelor vaccinate – metodă de Smith, J. S. și partenerii (1973).

a2) demonstrarea virusului – creierul tuturor vulpilor roșii care au fost incluse în testul de verificare (atât animalele vaccinate, cât și cele martor) a fost verificat după ce animalele au fost eutanasiate sau după ce au decedat, după expirarea perioadei de monitorizare, în vederea detectării prezenței antigenului de rabie, prin intermediul examinării imunofluorescente (Dean și Abelseth, 1973) și prin intermediul unui test biologic efectuat pe șoareci (Koprowski, 1973).

a3) Metode statistice și calcule aplicate în cadrul testării

Titrurile de anticorpi și de virus au fost calculate în baza metodei introduse de către Reed și Muench (1938).

b) Descrierea instrumentelor utilizate:

- pipete automate de 0,05 ml – Sharples
- microscop imunofluorescent – tip: Phasenkontrast mit Mikroval – Mikroskopen, Carl – Zeiss Jena
- seringi de 0,1 ml – tip: Hemilton
- incubator – 37 °C și 5 % CO₂ – de la compania Hereus
- microplăcuțe Dynatech din material plastic, pentru titrarea virusului și a serurilor

c) Descrierea materialelor utilizate:

- LYSVULPEN por. ad us. vet., lot 34 06, titru al virusului TCID₅₀ = 10^{7.1}/ml
- conjugat antirabic și negativ de la producătorul Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané
- ser antirabic de standard internațional
- virus infecțios de rabie prelevat de la glandele salivare ale unei vulpi roșii provenind de pe teritoriul Republicii Ceha, într-o doză de 10,000 MICLD₅₀ per 1 ml per un animal (perioadă de monitorizare de 90 de zile)

d) Animale utilizate în cadrul testului

d1) Specie – vulpe

d2) Gen sau familie – vulpe roșie (*Vulpes vulpes*)

d3) Categorie animal – animale tinere, cu vârsta între 4 și 5 luni

d4) Origine – animalele provin de pe teritoriul Republicii Ceha

d5) Identificare – un tatuaj pe auricul

d6) Număr de animale – 20

d7) Condiții în care au fost menținute animalele - vulpile au fost menținute în Țarcuri de câte 5 animale per Țarc. Vulpile de același sex au fost plasate întotdeauna în același Țarc. Țarcul a fost împărțit într-o incintă interioară, cu o zonă de odihnă pentru vulpi, și o zonă exterioară. Incinta interioară a fost betonată și zona exterioară a fost prevăzută cu pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața incintei interioare plus zona adiacentă) a fost de 10 metri pătrați, pentru cinci vulpi.

d8) Hrănirea animalelor – vulpile au fost hrănite cu un amestec granulat complex pentru câini, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă, precum și cu resturi de carne fierte și intestine selectate de la abatoare. Dozele de hrană din amestec comercial au fost determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea vulpilor. Vulpile au fost hrănite o dată pe zi, în speță la ora 2.00 p.m. Apa potabilă a fost la dispoziția vulpilor ad libitum.

d9) Numele proprietarului animalelor - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

d10) Numele institutului de testare - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

e) Doza de administrare, modalitatea de administrare, schema de administrare și orele de administrare, schema de recoltare a sângelui

Doza de administrare – 1 doză de administrare (1 momeală)

Modalitatea de administrare – per os (consum natural), blisterele sparte din aluminiu/material plastic au fost verificate pentru a dovedi consumul

Schema de administrare – doza de administrare recomandată a vaccinului a fost administrată într-o singură tranșă

Schema de recoltare a sângelui – sângele a fost recoltat înainte și la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 și 12 luni după imunizare

Test de verificare – a fost efectuat la 12 luni după imunizare

Animale martor – 5 vulpi roșii nevaccinate

Numele, adresa, poziția și calificarea persoanei care a realizat examinarea:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Născut la: 26 noiembrie, 1953

Educație: 1969 - 1973: Școala secundară de agricultură și inginerie – specializarea: veterinară, în Kroměříž

1973 - 1979: Universitatea veterinară din Brno

1 aprilie, 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea stagiului de practică

1979 - 1980: serviciu militar la serviciul veterinar al Gărzii de Frontieră

1980 - 1987: controlor independent în cadrul Departamentului pentru controlul calității și management

1985 - 1990: teză de doctorat a disciplinei epizootologie și zooigienă

1987 - 1995: Șef de departament pentru controlul calității și management

începând cu 1 februarie, 1995: director de producție la Bioveta, s.r.o.

începând cu 1 ianuarie, 1998 până în ziua de azi: director de producție și de dezvoltare pentru biopreparatele și medicamentele veterinare

Apartenență la organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie - începând cu 1980

Asociația științifică cehoslovacă pentru micologie - începând cu 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie - începând cu 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul sau coautorul a 101 publicații profesionale.

Certificate de autor:

Este autorul sau coautorul a 15 brevete și 5 design-uri utilitare.

Rapoarte finale de analiză:

Este autorul sau coautorul a 19 rapoarte finale pentru preparate introduse în practică.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.



BIOVETA, a. s. Komenského 212, 683 23 Ivanovice na Hané, Czech Republic,
tel.: 420/517/363321-4 e-mail: comm@bioveta.cz

Tabelul nr. 4 Testarea imunității anuale la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) după imunizarea pe cale orală cu tulpina SAD Bern (LYSVULPEN por. ad us. vet.)

Nr. crt.	Nr. vulpe	Lot	Zi aplicare	IU/ml												Verificare			Examinare post mortem		Notă	
				0 iniț.	1 luni	2 luni	3 luni	4 luni	5 luni	6 luni	7 luni	8 luni	9 luni	10 luni	11 luni	12 luni	zi	doză	rezultate – 90 zile	fluorescență directă		test biologic
1	L106	34 06	11.8.99	0	24,5	44,8	51,2	52,6	51,4	48,1	45,4	38,5	38,5	31,4	30,5	30,1	17.2.00	10 000 MICLD ₅₀	supraviețuire	negativ	negativ	
2	L107			0	21,2	33,4	38,7	38,5	36,2	30,1	28,5	28,0	27,5	27,5	27,1	26,9			supraviețuire	negativ	negativ	
3	L108			0	26,2	45,0	48,9	49,3	44,1	43,9	41,2	39,5	39,7	35,0	29,9	28,8			supraviețuire	negativ	negativ	
4	L109			0	19,1	29,3	31,3	35,8	33,2	30,0	29,1	28,7	25,2	25,0	22,6	21,9			supraviețuire	negativ	negativ	
5	L110			0	17,5	20,4	27,8	30,2	29,9	26,2	26,1	24,8	22,7	21,1	20,3	18,8			supraviețuire	negativ	negativ	
6	L111			0	21,5	26,3	38,2	38,8	37,4	35,1	30,3	29,7	29,0	28,5	25,3	24,4			supraviețuire	negativ	negativ	
7	L112			0	15,6	21,4	25,5	28,1	27,4	26,9	24,3	24,0	21,7	20,2	19,1	18,5			supraviețuire	negativ	negativ	
8	L113			0	25,4	41,5	52,6	52,9	51,4	46,7	44,3	37,5	36,4	30,7	29,3	27,9			supraviețuire	negativ	negativ	
9	L114			0	10,1	16,2	21,4	22,7	21,9	20,7	19,5	18,4	17,0	15,9	14,8	12,7			supraviețuire	negativ	negativ	
10	L115			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			deces	pozitiv	pozitiv	
11	L116			0	16,6	21,3	25,4	28,4	27,5	25,1	24,8	23,5	23,5	20,7	19,1	18,5			supraviețuire	negativ	negativ	
12	L117			0	25,0	40,3	40,8	41,5	40,4	40,0	38,8	35,6	35,0	35,0	29,6	28,5			supraviețuire	negativ	negativ	
13	L118			0	11,2	12,8	16,3	17,0	16,5	15,3	14,5	14,5	13,1	12,2	11,9	11,5			supraviețuire	negativ	negativ	
14	L119			0	15,3	21,4	28,6	29,9	28,4	28,0	28,0	25,7	23,2	21,1	19,9	17,6			supraviețuire	negativ	negativ	
15	L120			0	9,3	12,8	16,1	16,9	16,0	15,8	15,2	15,0	13,9	13,1	11,3	10,2			supraviețuire	negativ	negativ	
16	L121	martor	fără administrare	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17.2.00	10 000 MICLD ₅₀	deces	pozitiv	pozitiv	
17	L122			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			deces	pozitiv	pozitiv	
18	L123			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			deces	pozitiv	pozitiv	
19	L124			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			deces	pozitiv	pozitiv	
20	L125			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			deces	pozitiv	pozitiv	
Titru mediu anticorpi (IU/ml)				0	17,23	25,79	30,85	32,17	30,78	28,79	27,33	25,56	24,43	22,49	20,71	19,75						

Dizertație

Rezultatele testării de imunitate anuală efectuate pe un grup mai extins de animale prezentate în această secțiune a documentației de înregistrare a confirmat rezultatele conforme ale acestor probleme de specialitate, fiind obținute pe parcursul testării vaccinului LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține tulpina vie atenuată SAD Bern (VRZAL, V. și partenerii 1993; VRZAL, V., MATOUCH, O. 1996). S-a confirmat în mod repetat faptul că, după administrarea pe cale orală a vaccinului LYSVULPEN por. ad us. vet., se generează anticorpi antirabici specifici și se formează o imunitate de protecție pe termen lung la animalele imunizate, împotriva virusului de rabie. În baza rezultatelor obținute, este evident faptul că la sfârșitul perioadei de testare, adică la un an după imunizare, toate animalele imunizate, cu excepția vulpii nr. 115, au avut un titru suficient de anticorpi și că durata de imunitate este probabil mult mai mare de un an, așa cum s-a verificat pe cale experimentală în cadrul acestui proiect. În practică, în cazul în care campaniile de vaccinare se realizează periodic, de două ori pe an (campanii de vaccinare primăvara și toamna), se dovedește faptul că este suficientă verificarea unei imunități de cel puțin un an după administrarea preparatului LYSVULPEN por. ad us. vet.. Este foarte probabil faptul că majoritatea absolută a animalelor țintă consumă momeala de imunizare cel puțin o dată pe an și că sunt protejate împotriva rabiei în acest interval de timp. Astfel, un procentaj ridicat de animale țintă, care sunt imune la rabie, își fac apariția în zona tratată, ceea ce duce la extincția infecției în teritoriul respectiv.

Concluzie

S-a testat pe speciile țintă – vulpea roșie (*Vulpes vulpes*) – faptul că, după administrarea pe cale orală a unei momeli de vaccinare cu vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține tulpina vie atenuată de vaccinare cu rabie SAD Bern, se formează cel o imunitate de protecție împotriva rabiei de cel puțin un an.

5. Determinarea dozei de protecție de 50 la sută (PD₅₀) în timpul administrării pe cale orală a tulpinii SAD Bern la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*)

Rezumat

Pentru testare au fost utilizate douăzeci de vulpi roșii (*Vulpes vulpes*), cu vârsta între 3 și 4 luni. Puii de vulpe au fost împărțiți în cinci grupe de câte patru pui. Primei grupe i-a fost administrată pe cale naturală și individuală momeala de vaccinare, care conținea virusul SAD Bern, într-o cantitate de $1,8 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀, celei de-a doua grupe i-a fost administrată o cantitate de $1,8 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀, celei de-a treia grupe $1,8 \times 10^{6.0}$ TCID₅₀, celei de-a patra grupe $1,8 \times 10^{7.0}$ TCID₅₀ și grupa a cincea a fost utilizată drept grupă martor. Au fost recoltate probe de sânge de la toate vulpile testate, înainte de imunizare și la intervale regulate de câte o lună de zile, timp de 6 luni de zile după imunizare, pentru a verifica titrul anticorpilor antirabici, prin determinarea numărului de unități internaționale (IU) prezente în ser. La șase luni de la imunizare, toate vulpile testate (adică șaisprezece vulpi vaccinate cu mostre cu titru diferit de virus și patru vulpi martor, nevaccinate) au fost supuse virusului de rabie de stradă prelevat de la o vulpe roșie (*Vulpes vulpes*) provenind de pe teritoriul Republicii Cehe, cu o cantitate totală de 10,000 MICLD₅₀ pentru fiecare animal. Doza de 0,5 ml a fost aplicată pe fiecare mușchi maseter al animalului. Vulpile au fost monitorizate timp de 90 de zile după infectare.

Rezultatele serologice au confirmat faptul că imunitatea de protecție a fost generată în totalitate la o lună după imunizare și că s-a menținut un nivel suficient de protecție pe durata întregului interval de testare, adică timp de șase luni după imunizare. Doar vulpile nr. L12 și L14 din grupa care a fost imunizată cu o doză de $1,8 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀ nu au răspuns din punct de vedere imunologic prin formarea de anticorpi antirabici post-vaccinare.

Testul de verificare a demonstrat o imunitate bună de protecție la toate vulpile care au fost imunizate cu mostre de virus diferite, de titruri diferite. Doar vulpile nr. L12 și L14 din grupa care a fost imunizată cu doza de $1,8 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀ au decedat de rabie. Toate cele patru vulpi martor, nevaccinate, au decedat de asemenea de rabie.

Toate animalele testate, atât cele decedate, cât și animalele care au fost eutanasiate fără suferință imediat după încheierea perioadei de testare, au fost verificate cu privire la prezența în creier a virusului de rabie, în baza metodei de imunofluorescență directă și în baza testului biologic. Rabia nu a fost demonstrată la animalele vaccinate, care au supraviețuit, dar a fost demonstrată la toate animalele decedate.

În baza acestui test și a calculelor, s-a demonstrat faptul că PD₅₀ al virusului SAD Bern pentru vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) este de $1,8 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀.

Dizertație

Determinarea dozei de protecție de 50 la sută (PD₅₀) reprezintă o dată de bază și foarte importantă cu privire la administrarea practică a preparatului, adică în special la determinarea optimă a unei doze de imunizare pentru un animal.

Se stipulează faptul că (BAER, 1975) toate vulpile care ating un minim de $10^{4.5}$ TCID₅₀ din tulpina SAD după imunizarea pe cale orală, sunt în stare să formeze anticorpi de neutralizare. Dacă o doză de imunizare conține $10^{6.0}$ TCID₅₀ de virus din tulpina SAD, toate animalele încep să formeze anticorpi de neutralizare care protejează respectivul animal împotriva infectării. Autorii (STECK et al., 1982) menționează în lucrarea lor o protecție de 50 la sută la vulpile verificate, la administrarea unei doze de $10^{6.0}$ TCID₅₀ de virus SAD Bern și o protecție de 78 la sută la vulpile verificate, la administrarea unei doze de imunizare conținând $10^{7.0}$ TCID₅₀ de virus SAD Bern. Cu toate acestea, în cadrul acestei lucrări virusul de rabie SAD Bern a fost utilizat împreună cu un mediu de stabilizare diferit; blisterele

au fost introduse în capete de pui și tipul și doza virusului de verificare sunt necunoscute. În tulpina SAD P5/88, autorii (SCHUSTER et al., 2001) au obținut valoarea $PD_{50} 10^{4.2} TCID_{50}$.

Rezultatul pe care noi l-am obținut cu tulpina SAD Bern $PD_{50} = 10^{4.0} TCID_{50}$ este comparabil cu datele menționate în literatura disponibilă cu privire la imunogenitatea tulpinii de rabie SAD. Titrul determinat al virusului de vaccinare SAD Bern în vaccinul comercial LYSVULPEN por. ad us. vet., de $10^{7.0}$ până la $10^{8.0}$ într-o doză de imunizare – o momeală de vaccinare, depășește de 1.000 până la 10.000 de ori valoare PD_{50} determinată a acestui virus. Cu toate că valoarea titrului determinat pare a fi supraestimat inutil, preparatul astfel realizat are legătură cu forma specifică de administrare, adică distribuirea în teren deschis. Extinderea crescândă a distribuției din avion nu permite ferirea corespunzătoare a momelii împotriva incidenței directe a razelor solare și temperatura exterioară reprezintă unul din factorii principali care au un impact asupra titrului virusului în vaccin. Titrul virusului trebuie să dispună de o rezervă suficientă pentru a se putea menține câteva zile după distribuire, la o temperatură mai ridicată, și trebuie să asigure imunogenitatea după consumarea momelii de către animalele țintă. Această strategie de specialitate a fost adoptată de alte companii producătoare de preparate similare (de ex. Fuchsoral, SAD B-19, min. $1.5 \times 10^{6.0}$ PFU într-o doză; SANAFOX, SAD IVA1 B19, min. $10^{7.0}$ PFU în 1 ml /doză de vaccinare/) (cotație – informații oferite de AISLPV, versiunea 2002.4 – la data de 1 octombrie, 2002).

Concluzie

În baza unui experiment s-a demonstrat faptul că PD_{50} al virusului SAD Bern este de $1,8 \times 10^{4.0} TCID_{50}$ după administrarea pe cale orală la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*). Această valoare este de 1.000 până la 10.000 de ori mai mică de cât titrul mediu al acestui virus, prezent într-o doză de vaccinare cu vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet. Un titru suficient de virus SAD Bern prezent în vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet. asigură o eficacitate suficientă a momelilor de imunizare chiar și la temperaturi exterioare mai ridicate, atunci când distribuirea se face pe teren, și asigură de asemenea imunitatea animalelor țintă, chiar și atunci când momeala este consumată după ce a stat pe teren pentru o anumită perioadă.

**Lista și caracteristicile animalelor incluse în determinarea PD₅₀
(categorie – vulpe roșie – *Vulpes vulpes*)**

Nr. curent al animalului	Nr. de identificare a animalului	Caracteristicile animalului			Comentarii
		vârstă	sex	stare de sănătate	
1	LI1	3 luni	♀	bună	
2	LI2	3 luni	♂	bună	
3	LI3	3 luni	♂	bună	
4	LI4	3 luni	♀	bună	
5	LI5	3 luni	♀	bună	
6	LI6	3 luni	♂	bună	
7	LI7	3,5 luni	♀	bună	canin eliminat
8	LI8	3,5 luni	♂	bună	
9	LI9	3,5 luni	♂	bună	
10	LI10	3,5 luni	♀	bună	
11	LI11	3,5 luni	♂	bună	
12	LI12	4 luni	♀	bună	
13	LI13	4 luni	♂	bună	
14	LI14	4 luni	♀	bună	rană mică la cap
15	LI15	4 luni	♂	bună	
16	LI16	4 luni	♂	bună	
17	LI17	3,5 luni	♀	bună	conjunctivită
18	LI18	3,5 luni	♂	bună	
19	LI19	3,5 luni	♀	bună	
20	LI20	3,5 luni	♂	bună	

Protocol de testare

a) Descrierea metodelor aplicate:

a1) Determinarea numărului de IU în serul animalelor vaccinate – metodă de Smith, J. S. și partenerii (1973).

a2) demonstrarea virusului – creierul tuturor vulpilor roșii care au fost incluse în testul de verificare (atât animalele vaccinate, cât și cele martor) a fost verificat după ce animalele au fost eutanasiate sau după ce au decedat, după expirarea perioadei de monitorizare, în vederea detectării prezenței antigenului de rabie, prin intermediul examinării imunofluorescente (Dean și Abelseth, 1973) și prin intermediul unui test biologic efectuat pe șoareci (Koprowski, 1973).

a3) Metode statistice și calcule aplicate în cadrul testării

Titrurile de anticorpi și de virus au fost calculate în baza metodei introduse de către Reed și Muench (1938).

b) Descrierea instrumentelor utilizate:

- pipete automate de 0,05 ml – Sharples
- microscop imunofluorescent – tip: Phasenkontrast mit Mikroval – Mikroskopen, Carl – Zeiss Jena
- seringi de 0,1 ml – tip: Hemilton
- incubator – 37 °C și 5 % CO₂ – de la compania Hereus
- microplăcuțe Dynatech din material plastic, pentru titrarea virusului și a serurilor

c) Descrierea materialelor utilizate:

- mostre de testare de virus SAD Bern, cu titrul:

a)	$1,8 \times 10^{4,0}$ TCID ₅₀
b)	$1,8 \times 10^{5,0}$ TCID ₅₀
c)	$1,8 \times 10^{6,0}$ TCID ₅₀
d)	$1,8 \times 10^{7,0}$ TCID ₅₀
- conjugat antirabic și negativ de la producătorul Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané
- ser antirabic de standard internațional
- virus infecțios de rabie prelevat de la glandele salivare ale unei vulpi roșii provenind de pe teritoriul Republicii Ceha, într-o doză de 10,000 MICLD₅₀ per 1 ml per un animal (perioadă de monitorizare de 90 de zile)

d) Animale utilizate în cadrul testului

d1) Specie – vulpe

d2) Gen sau familie – vulpe roșie (*Vulpes vulpes*)

d3) Categorie animal – animale tinere, cu vârsta între 3 și 4 luni

d4) Origine – animalele provin de pe teritoriul Republicii Ceha

d5) Identificare – un tatuaj pe auricul

d6) Număr de animale – 20

d7) Condiții în care au fost menținute animalele - vulpile au fost menținute în țarcuri de câte 5 animale per țarc. Vulpile de același sex au fost plasate întotdeauna în același țarc. Țarcul a fost împărțit într-o incintă interioară, cu o zonă de odihnă pentru vulpi, și o zonă exterioară. Incinta interioară a fost betonată și zona exterioară a fost prevăzută cu pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața incintei interioare plus zona adiacentă) a fost de 10 metri pătrați, pentru cinci vulpi.

d8) Hrănirea animalelor – vulpile au fost hrănite cu un amestec granulat complex pentru câini, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă, precum și cu resturi de carne fierte și intestine selectate de la abatoare. Dozele de hrană din amestec comercial au fost determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea vulpilor. Vulpile au fost hrănite o dată pe zi, în speță la ora 2.00 p.m. Apa potabilă a fost la dispoziția vulpilor ad libitum.

d9) Numele proprietarului animalelor - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

d10) Numele institutului de testare - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

e) Doza de administrare, modalitatea de administrare, schema de administrare și orele de administrare, schema de recoltare a sângelui

Doza de administrare – 1 doză de administrare (adică mostre de preparat cu titru diferit): a) $1.8 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀

b) $1.8 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀

c) $1.8 \times 10^{6.0}$ TCID₅₀

d) $1.8 \times 10^{7.0}$ TCID₅₀)

Modalitatea de administrare – per os (consum natural), blisterele sparte din aluminiu/material plastic au fost verificate pentru a dovedi consumul

Schema de administrare – mostrele testate a, b, c, d au fost administrate la titrul determinat, într-o singură tranșă

Schema de recoltare a sângelui – sângele a fost recoltat înainte și la 1, 2, 3, 4, 5 și 6 luni după imunizare

Test de verificare – a fost efectuat la 6 luni după imunizare

Animale martor – 4 vulpi roșii, nevaccinate

Numele, adresa, poziția și calificarea persoanei care a realizat examinarea:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Născut la: 26 noiembrie, 1953

Educație: 1969 - 1973: Școala secundară de agricultură și inginerie – specializarea: veterinară, în Kroměříž

1973 - 1979: Universitatea veterinară din Brno

1 aprilie, 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea stagiului de practică

1979 - 1980: serviciu militar la serviciul veterinar al Gărzii de Frontieră

1980 - 1987: controlor independent în cadrul Departamentului pentru controlul calității și management

1985 - 1990: teză de doctorat a disciplinei epizootologie și zooigienă

1987 - 1995: Șef de departament pentru controlul calității și management

începând cu 1 februarie, 1995: director de producție la Bioveta, s.r.o.

începând cu 1 ianuarie, 1998 până în ziua de azi: director de producție și de dezvoltare pentru biopreparatele și medicamentele veterinare

Apartenență la organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie - începând cu 1980

Asociația științifică cehoslovacă pentru micologie - începând cu 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie - începând cu 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul sau coautorul a 101 publicații profesionale.

Certificate de autor:

Este autorul sau coautorul a 15 brevete și 5 design-uri utilitare.

Rapoarte finale de analiză:

Este autorul sau coautorul a 19 rapoarte finale pentru preparate introduse în practică.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Tabelul nr. 5 Determinarea PD₅₀ la vulpea roșie (*Vulpes vulpes*) în timpul administrării pe cale orală a tulpinii SAD Bern

Nr. crt.	Nr. vulpe	Doză imunizare (TCID ₅₀)	Zile administrare	IU/ml							Verificare			Examinare post mortem		Notă
				0 - iniț.	1 luni	2 luni	3 luni	4 luni	5 luni	6 luni	zi	doză (MICLD ₅₀)	rezultate – 90 zile	fluorescență directă	test biologic	
1	LI1	1,8 x 10 ^{4,0}	16.6.98	0	10,2	13,8	17,8	19,4	20,1	18,5	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
2	LI2	1,8 x 10 ^{4,0}	16.6.98	0	0	0	0	0	0	0	20.12.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
3	LI3	1,8 x 10 ^{4,0}	16.6.98	0	10,1	14,3	19,2	20,6	19,9	19,3	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
4	LI4	1,8 x 10 ^{4,0}	16.6.98	0	0	0	0	0	0	0	20.12.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
5	LI5	1,8 x 10 ^{5,0}	16.6.98	0	10,6	12,3	20,1	23,2	21,9	20,1	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
6	LI6	1,8 x 10 ^{5,0}	16.6.98	0	12,8	15,6	19,4	21,9	22,6	20,9	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
7	LI7	1,8 x 10 ^{5,0}	16.6.98	0	11,3	16,7	19,8	21,4	19,7	18,5	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
8	LI8	1,8 x 10 ^{5,0}	16.6.98	0	10,7	12,3	16,5	19,2	20,3	20,0	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
9	LI9	1,8 x 10 ^{6,0}	16.6.98	0	12,1	18,2	22,5	28,4	30,1	29,8	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
10	LI10	1,8 x 10 ^{6,0}	16.6.98	0	15,2	21,3	26,3	30,1	30,4	27,6	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
11	LI11	1,8 x 10 ^{6,0}	16.6.98	0	14,7	21,7	27,1	30,1	31,5	29,5	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
12	LI12	1,8 x 10 ^{6,0}	16.6.98	0	15,7	23,4	25,2	27,7	32,2	31,4	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
13	LI13	1,8 x 10 ^{7,0}	16.6.98	0	23,2	37,2	44,7	48,7	50,2	47,9	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
14	LI14	1,8 x 10 ^{7,0}	16.6.98	0	19,8	40,1	45,6	46,4	51,4	48,3	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
15	LI15	1,8 x 10 ^{7,0}	16.6.98	0	22,5	39,1	45,9	48,0	51,1	47,8	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
16	LI16	1,8 x 10 ^{7,0}	16.6.98	0	19,3	38,8	43,9	49,1	50,7	47,4	20.12.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
17	LI17	verificare în stare neimunizată	–	0	0	0	0	0	0	0	20.12.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
18	LI18		–	0	0	0	0	0	0	0	20.12.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
19	LI19		–	0	0	0	0	0	0	0	20.12.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
20	LI20		–	0	0	0	0	0	0	0	20.12.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	

6. Testarea începerii vaccinării împotriva rabiei la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) – testarea impactului anticorpilor colostrali asupra creării imunității împotriva rabiei

Rezumat

Pentru testare s-au utilizat douăzeci și cinci de pui de vulpe roșie (*Vulpes vulpes*) provenind de la mame de pe un teritoriu care a fost tratat în mod repetat împotriva rabiei, cu vaccin antirabic pentru imunizarea pe cale orală a vulpilor – LYSVULPEN por. ad us. vet.. Puii de vulpe au fost împărțiți în cinci grupe de testare de câte cinci animale. Puii de vulpe din prima grupă au fost imunizați cu vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet. la vârsta de 4 săptămâni, puii de vulpe din grupa a doua, la vârsta de 6 săptămâni, puii de vulpe din grupa a treia, la vârsta de 8 săptămâni, puii de vulpe din grupa a patra, la vârsta de 10 săptămâni și puii de vulpe din grupa a cincea, la vârsta de 12 săptămâni. Recoltarea de sânge pentru examinarea titrului de anticorpi colostrali împotriva rabiei, prin determinarea numărului de unități internaționale (IU) prezent în ser, și pentru examinarea titrurilor acestor anticorpi specifici de neutralizare a virusului, apărute după imunizarea tuturor puilor de vulpe, s-a realizat în fiecare grupă, la vârsta de 4 săptămâni, 6 săptămâni, 8 săptămâni, 10 săptămâni, 12 săptămâni și 16 săptămâni. La vârsta de 16 săptămâni toți puii de vulpe au fost verificați cu virusul de rabie de stradă, prelevat de la o vulpe roșie (*Vulpes vulpes*) provenind de pe teritoriul Republicii Cehe. Fiecare individ a fost verificat cu o doză de 10,000 MICLD₅₀ din care 0,5 ml au fost administrați în fiecare mușchi maseter al animalului. Vulpile au fost monitorizate timp de 90 de zile după infectare.

Rezultatele serologice au confirmat faptul că, după imunizarea puilor de vulpe la vârsta de 4 săptămâni, există un grad ridicat de anticorpi colostrali care inhibă formarea imunității active după administrarea vaccinului. Rezultate similare au fost obținute de asemenea și la puii de vulpe care au fost vaccinați la vârsta de 6 săptămâni, în condițiile în care doar unul din cei cinci pui vaccinați a generat un titru de protecție de anticorpi antirabici specifici. După imunizarea efectuată la vârsta de 8 săptămâni, trei pui de vulpe au generat un grad de protecție de anticorpi, în timp ce doi pui de vulpe nu au răspuns din punct de vedere imunologic, datorită unui reziduu de anticorpi colostrali. Imunizarea puilor de vulpe cu vârsta de 10 și 12 săptămâni a indus generarea de anticorpi antirabici specifici de neutralizare a virusului.

Testul de verificare a confirmat rezultatele obținute pe parcursul testării serologice anterioare. Încă o dată s-a demonstrat legătura dintre titrul anticorpilor antirabici și protecția împotriva rabiei. Toți puii de vulpe din grupa nr. 1 au decedat. Din grupa nr. 2 au decedat patru pui de vulpe, din grupa nr. 3 au decedat doi pui de vulpe. Din grupa nr. 4 și nr. 5 nu a decedat niciun pui de vulpe.

Testul serologic și testul de verificare au demonstrat faptul că anticorpii colostrali au un impact negativ asupra formării imunității active împotriva rabiei, după administrarea vaccinului LYSVULPEN por ad us. vet. Acești anticorpi colostrali persistă la puii de vulpe proveniți de la mame imunizate, până la vârsta de 8 săptămâni. La puii de vulpe cu vârsta de 10 săptămâni nivelul de anticorpi colostrali reziduali este foarte scăzut și nu are un impact negativ asupra formării imunității active la animalele imunizate.

Dizertație

Împreună cu realizarea practică a campaniilor de vaccinare împotriva rabiei, prin intermediul imunizării pe cale orală, s-a rezolvat de asemenea și problema imunizării puilor de vulpe împotriva acestei boli. Doar aceste animale nu au fost imunizate în timpul campaniei de primăvară desfășurată în aprilie - mai, în anul respectiv, în măsura în care acestea au fost prezente în vizuini sau în vecinătatea acestora. Astfel, un segment semnificativ neimunizat din populația de vulpi a apărut pe teren înainte de realizarea campaniei de vaccinare de toamnă, în septembrie și octombrie. În conformitate cu situația cu privire la infectare detectată în anumite regiuni sau țări, această situație a fost rezolvată fie prin revaccinare de primăvară sau toamnă, prin distribuirea momelilor de vaccinare în perioada de vară sau prin dispunerea momelii în dreptul vizuinilor ocupate, într-o cantitate predeterminată de zece momeli pentru fiecare vizuină. Mai mulți autori (MÜLLER T. et al., 2001; VOS A. et al., 2001;

MÜLLER T. F. et al., 2001b; VOS A. et al., 2001b) au abordat tema imunității, formată după vaccinarea vulpilor roșii tinere și a ratonilor. În cadrul tuturor lucrărilor s-a demonstrat în baza unui test faptul că anticorpii colostrali reziduali inhibă formarea imunității active după administrarea pe cale orală a unei tulpini atenuate de vaccinare împotriva rabiei. Durata impactului de inhibiție a anticorpilor colostrali la vulpile roșii (*Vulpes vulpes*) și la ratoni (*Nyctereutes procyonoides*) s-a determinat a fi vârsta de 8 săptămâni pentru animale tinere provenind de la mame imunizate. Rezultatele noastre corespund cu rezultatele obținute de autori străini. Anumite variații pot fi cauzate de necunoașterea exactă a zilei de naștere a tuturor puilor de vulpe testați.

Rezultatele obținute în cadrul testului de laborator au fost de asemenea verificate în condiții de teren, cu administrarea vaccinului LYSVULPEN por. ad us. vet., care conține tulpina atenuată vie de vaccinare SAD Bern (VRZAL V. et al., 1996; VRZAL V. et al., 1996, MATOUCH, O., SPRINGŠ, J., VRZAL, V., 1998; VRZAL, V., MATOUCH, O., 1999).

Rezultatele obținute în laborator și rezultatele obținute pe teren arată faptul că vaccinarea pe cale orală a puilor de vulpe în vizuini reprezintă o metodă adițională corespunzătoare în lupta împotriva rabiei, care este aplicabilă în special în cazul creșterii populației de vulpi.

Concluzie

S-a demonstrat în condiții de laborator și pe teren faptul că vaccinul LYSVULPEN por. ad us. vet. poate fi utilizat pentru vaccinarea vulpilor tinere, începând cu vârsta de opt săptămâni.

**Lista și caracteristicile animalelor incluse în verificarea impactului
anticorpilor colostrali asupra creării imunității împotriva rabiei
(categorie – vulpe roșie – *Vulpes vulpes*)**

Nr. curent al animalului	Nr. de identificare a animalului	Caracteristicile animalului			Comentarii
		vârstă	sex	stare de sănătate	
1	K1	1 lună	♀	bună	
2	K2	1 lună	♂	bună	
3	K3	1 lună	♀	bună	infestarea cu pureci s-a tratat cu ajutorul unui medicament antiparazitic
4	K4	1 lună	♀	bună	infestarea cu pureci s-a tratat cu ajutorul unui medicament antiparazitic
5	K5	1 lună	♀	bună	infestarea cu pureci s-a tratat cu ajutorul unui medicament antiparazitic
6	K6	1 lună	♂	bună	infestarea cu pureci s-a tratat cu ajutorul unui medicament antiparazitic
7	K7	1 lună	♂	bună	infestarea cu pureci s-a tratat cu ajutorul unui medicament antiparazitic
8	K8	1 lună	♂	bună	
9	K9	1 lună	♂	bună	
10	K10	1 lună	♂	bună	
11	K11	1 lună	♀	bună	
12	K12	1 lună	♀	bună	
13	K13	1 lună	♂	bună	
14	K14	1 lună	♀	bună	
15	K15	1 lună	♀	bună	
16	K16	1 lună	♂	bună	
17	K17	1 lună	♂	bună	diaree
18	K18	1 lună	♂	bună	
19	K19	1 lună	♀	bună	
20	K20	1 lună	♀	bună	
21	K21	1 lună	♀	bună	
22	K22	1 lună	♂	bună	
23	K23	1 lună	♂	bună	
24	K24	1 lună	♀	bună	
25	K25	1 lună	♂	bună	

Protocol de testare

a) Descrierea metodelor aplicate:

a1) Determinarea numărului de IU în serul animalelor vaccinate – metodă de Smith, J. S. și partenerii (1973).

a2) demonstrarea virusului – creierul tuturor vulpilor roșii care au fost incluse în testul de verificare (atât animalele vaccinate, cât și cele martor) a fost verificat după ce animalele au fost eutanasiate sau după ce au decedat, după expirarea perioadei de monitorizare, în vederea detectării prezenței antigenului de rabie, prin intermediul examinării imunofluorescente (Dean și Abelseth, 1973) și prin intermediul unui test biologic efectuat pe șoareci (Koprowski, 1973).

a3) Metode statistice și calcule aplicate în cadrul testării

Titrurile de anticorpi și de virus au fost calculate în baza metodei introduse de către Reed și Muench (1938).

b) Descrierea instrumentelor utilizate:

- pipete automate de 0,05 ml – Sharples
- microscop imunofluorescent – tip: Phasenkontrast mit Mikroval – Mikroskopen, Carl – Zeiss Jena
- seringi de 0,1 ml – tip: Hemilton
- incubator – 37 °C și 5 % CO₂ – de la compania Hereus
- microplăcuțe Dynatech din material plastic, pentru titrarea virusului și a serurilor

c) Descrierea materialelor utilizate:

- LYSVULPEN por. ad us. vet., lot 23 05, titru al virusului TCID₅₀ = 10^{7,3}/ml
- conjugat antirabic și negativ de la producătorul Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané
- ser antirabic de standard internațional
- virus infecțios de rabie prelevat de la glandele salivare ale unei vulpi roșii provenind de pe teritoriul Republicii Ceha, într-o doză de 10,000 MICLD₅₀ per 1 ml per un animal (perioadă de monitorizare de 90 de zile)

d) Animale utilizate în cadrul testului

d1) Specie – vulpe

d2) Gen sau familie – vulpe roșie (*Vulpes vulpes*)

d3) Categorie animal – animale tinere, cu vârsta începând cu 1 lună

d4) Origine – animalele provin de pe teritoriul Republicii Ceha

d5) Identificare – un tatuaj pe auricul

d6) Număr de animale – 25

d7) Condiții în care au fost menținute animalele - vulpile au fost menținute în Țarcuri de câte 5 animale per Țarc. Vulpile de același sex au fost plasate întotdeauna în același Țarc. Țarcul a fost împărțit într-o incintă interioară, cu o zonă de odihnă pentru vulpi, și o zonă exterioară. Incinta interioară a fost betonată și zona exterioară a fost prevăzută cu pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața incintei interioare plus zona adiacentă) a fost de 10 metri pătrați, pentru cinci vulpi.

d8) Hrănirea animalelor – vulpile au fost hrănite cu un amestec granulat complex pentru câini, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă, precum și cu resturi de carne fierte și intestine selectate de la abatoare. Dozele de hrană din amestec comercial au fost determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea vulpilor. Vulpile au fost hrănite o dată pe zi, în speță la ora 2.00 p.m. Apa potabilă a fost la dispoziția vulpilor ad libitum.

d9) Numele proprietarului animalelor - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

d10) Numele institutului de testare - Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané

e) Doza de administrare, modalitatea de administrare, schema de administrare și orele de administrare, schema de recoltare a sângelui

Doza de administrare – 1 doză de administrare (1 momeală)

Modalitatea de administrare – per os (consum natural), blisterele sparte din aluminiu/material plastic au fost verificate pentru a dovedi consumul

Schema de administrare – doza de administrare determinată a fost administrată într-o singură tranșă, la animalele cu vârsta de 4, 6, 8, 10 și 12 săptămâni, în conformitate cu grupele individuale de testare a animalelor

Schema de recoltare a sângelui – sângele a fost recoltat la vârsta de 4, 6, 8, 10, 12 și 16 săptămâni (înainte de verificare)

Test de verificare – a fost efectuat la puii de vulpe cu vârsta de 16 săptămâni

Animale martor – nu au fost utilizate animale martor, nevaccinate

Numele, adresa, poziția și calificarea persoanei care a realizat examinarea:

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Născut la: 26 noiembrie, 1953

Educație: 1969 - 1973: Școala secundară de agricultură și inginerie – specializarea: veterinară, în Kroměříž

1973 - 1979: Universitatea veterinară din Brno

1 aprilie, 1979: Bioveta Ivanovice na Hané, începerea stagiului de practică

1979 - 1980: serviciu militar la serviciul veterinar al Gărzii de Frontieră

1980 - 1987: controlor independent în cadrul Departamentului pentru controlul calității și management

1985 - 1990: teză de doctorat a disciplinei epizootologie și zooigienă

1987 - 1995: Șef de departament pentru controlul calității și management

începând cu 1 februarie, 1995: director de producție la Bioveta, s.r.o.

începând cu 1 ianuarie, 1998 până în ziua de azi: director de producție și de dezvoltare pentru biopreparatele și medicamentele veterinare

Apartenență la organizații profesionale:

Asociația cehoslovacă de microbiologie - începând cu 1980

Asociația științifică cehoslovacă pentru micologie - începând cu 1980

Asociația cehoslovacă de imunologie - începând cu 1981

Activitate profesională:

Publicații:

Este autorul sau coautorul a 101 publicații profesionale.

Certificate de autor:

Este autorul sau coautorul a 15 brevete și 5 design-uri utilitare.

Rapoarte finale de analiză:

Este autorul sau coautorul a 19 rapoarte finale pentru preparate introduse în practică.

Specializare profesională: imunologie, virusologie

MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

Tabelul nr. 6 Verificarea impactului anticorpilor colostrali asupra creării imunității împotriva rabiei după imunizarea cu vaccinul LYSVULPEN

Nr. grupă	Nr. curent vulpe	Nr. vulpe	Recoltare sânge, determinare IU/ m, imunizare						Verificare			Examinare post mortem		Notă
			4 săptămâni	6 săptămâni	8 săptămâni	10 săptămâni	12 săptămâni	16 săptămâni	la vârsta de 16 săptămâni	doză (MICLD ₅₀)	rezultate - 90 zile	fluorescență directă	test biologic	
1	1	K1	8,5	2,2	0,5	0,25	0,1	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	2	K2	7,1	1,8	0,35	0,15	0	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	3	K3	5,4	2,5	1,5	0,15	0	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	4	K4	6,6	2,4	0,85	0,35	0,15	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	5	K5	8,7	2,7	0,45	0,15	0	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
2	6	K6	8,9	2,7	0,65	0,45	0,25	0,1	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	7	K7	7,2	2,7	0,50	0,25	0,1	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	8	K8	4,8	1,4	0,35	5,1	8,2	6,5	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	9	K9	5,9	2,0	0,55	0,35	0,1	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	10	K10	7,7	2,2	0,55	0,45	0,25	0,1	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
3	11	K11	8,1	3,1	0,55	0,25	0	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	12	K12	8,7	3,5	0,65	0,20	0,1	0	16.7.98	10 000	deces	pozitiv	pozitiv	
	13	K13	3,2	1,2	0,15	5,8	11,6	17,4	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	14	K14	4,1	1,5	0,25	4,3	12,9	16,6	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	15	K15	5,4	1,95	0,50	1,8	1,2	1,2	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
4	16	K16	6,3	2,8	1,1	0,4	5,6	11,8	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	17	K17	5,5	2,0	0,5	0,25	8,1	23,5	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	18	K18	4,7	1,7	0,35	0,15	11,5	16,6	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	19	K19	6,6	1,65	0,25	0,15	7,7	18,1	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	20	K20	3,4	1,1	0,15	0,1	12,1	21,4	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
5	21	K21	7,2	2,2	0,5	0,25	0	23	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	22	K22	6,1	2,3	0,55	0,25	0,1	12,5	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	23	K23	5,8	1,75	0,35	0,15	0	19,5	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	24	K24	5,4	1,3	0,20	0,1	0	21,8	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	
	25	K25	3,2	1,1	0,15	0,1	0	25,4	16.7.98	10 000	supraviețuire	negativ	negativ	

B. TESTE PE TEREN

În cooperare cu un partener german, proiectul de vaccinare pe cale orală împotriva rabiei a vulpilor a început în Republica Cehă în 1989 și a cuprins regiunile Klatovy, Domažlice și Tachov. Vaccinul cu administrare pe cale orală a fost un vaccin de tip Tübingen, preparat din tulpina atenuată SAD B-19 și importat din Germania. Începând cu primăvara anului 1992 și până în prezent, vaccinul "LYSVULPEN por. ad us. vet.", având la bază tulpina SAD Bern, produs de către Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, se utilizează pe teritoriul Republicii Cehe.

Prezentarea generală a tuturor campaniilor de vaccinare în vederea imunizării pe cale orală împotriva rabiei a vulpilor, efectuate în Republica Cehă, este redată în tabelul nr. 6.

Examinările de verificare efectuate după fiecare campanie de vaccinare (primăvară – toamnă) vizează consumul momelilor, demonstrarea biomarker-ului (tetraciclină) în oasele vulpilor vânați, demonstrarea prezenței anticorpilor în fluidul din corp, amprentarea epizootiologică și identificarea virusilor de rabie prelevați, prin intermediul anticorpilor monoclonali. Rezultatele obținute pe parcursul campaniilor individuale de vaccinare sunt rezumate în tabelul nr. 7. Vaccinarea este considerată a împiedica în mod eficient răspândirea rabiei dacă cel puțin 70 la sută din animale sunt imune. După ce au fost efectuate campaniile teritoriale de vaccinare, numărul animalelor bolnave a scăzut considerabil. Cazurile de rabie înregistrate în Republica Cehă pe parcursul perioadei de monitorizare, din 1989 și până în prezent, sunt indicate în tabelul nr. 8 și sunt împărțite în conformitate cu speciile principale de animale bolnave. Numărul de ratoni examinați și de cazuri pozitive de rabie la ratoni sunt rezumate în tabelul nr. 9. Cazurile de rabie înregistrate în Republica Cehă pe parcursul perioadei de monitorizare, din 1989 și până în prezent, sunt ilustrate în diagrama nr.1.



BIOVETA, a. s. Komenského 212, 683 23 Ivanovice na Hané, Czech Republic,
tel.: 420/517/363321-4 e-mail: comm@bioveta.cz

Tabelul nr. 7 Prezentarea generală a campaniilor de vaccinare în vederea imunizării pe cale orală împotriva rabiei a vulpilor, în Republica Cehă

Campanie			Număr de regiuni	Număr de kilometri pătrați tratați			Număr de doze			Doze per kilometru pătrat			Tip vaccin
				total	manual	cu avionul	total	manual	cu avionul		manual	cu avionul	
1	primăvară	1989	3	2 133	2 133		32 000	32 000		15,0	15,0		Tübingen
2	toamnă	1989	3	3 307	3 307		49 600	49 600		15,0	15,0		Tübingen
3	primăvară	1990	13	14 520	14 520		217 800	217 800		15,0	15,0		Tübingen
4	toamnă	1990	13	14 520	14 520		217 800	217 800		15,0	15,0		Tübingen
5	primăvară	1991	13	14 520	14 520		217 800	217 800		15,0	15,0		Tübingen
6	toamnă	1991	25	23 300	23 300		350 000	350 000		15,0	15,0		Tübingen
7	Primăvară	1992	40	39 600	39 600		350 000	350 000		15,0	15,0		Tübingen
							245 000	245 000		15,0	15,0		LYSVULPEN
8	toamnă	1992	44	42 400	42 400		640 000	640 000		15,1	15,1		LYSVULPEN
9	primăvară	1993	44	38 500	38 500		615 600	615 600		16,0	16,0		LYSVULPEN
10	toamnă	1993	68	56 250	56 250		926 000	926 000		16,5	16,5		LYSVULPEN
11	primăvară	1994	48	45 450	45 450		727 200	727 200		16,0	16,0		LYSVULPEN
12	toamnă	1994	52	46 900	46 900		762 200	762 200		16,3	16,3		LYSVULPEN
13	primăvară	1995	51	46 200	46 200		749 600	749 600		16,2	16,2		LYSVULPEN
14	toamnă	1995	62	49 600	49 600		900 000	900 000		18,1	18,1		LYSVULPEN
15	primăvară	1996	52	46 900	46 900		767 400	767 400		16,4	16,4		LYSVULPEN
16	toamnă	1996	64	49 800	46 280	3 520	920 000	830 400	89 600	18,5	17,9	25,5	LYSVULPEN
17	primăvară	1997	57	47 500	43 980	3 520	852 000	732 000	120 000	17,9	16,6	34,1	LYSVULPEN
18	toamnă	1997	59	49 800	46 300	3 500	938 000	838 000	100 000	18,8	18,1	28,6	LYSVULPEN
19	primăvară	1998	51	31 000	27 400	3 600	650 000	550 000	100 000	21,0	20,1	27,8	LYSVULPEN
20	toamnă	1998	52	31 500	26 550	4 950	680 000	555 000	125 000	21,6	20,9	25,3	LYSVULPEN
21	primăvară	1999	48	28 350	23 350	5 000	613 000	488 000	125 000	21,6	20,9	25,0	LYSVULPEN
22	toamnă	1999	54	42 990	33 118	9 872	843 800	597 000	246 800	19,6	18,0	25,0	LYSVULPEN
23	primăvară	2000	45	38 490	23 500	14 990	798 600	423 800	374 800	20,7	18,0	25,0	LYSVULPEN
24	toamnă	2000	51	44 580	29 590	14 990	907 600	532 800	374 800	20,4	18,0	25,0	LYSVULPEN
25	primăvară	2001	53	45 703	30 295	15 408	930 000	545 400	384 600	20,3	18,0	25,0	LYSVULPEN
26	toamnă	2001	54	45 705	30 297	15 408	929 700	545 400	384 300	20,3	18,0	24,9	LYSVULPEN
27	primăvară	2002	61	53 922	27 206	26 716	1 158 900	489 000	669 900	21,5	18,0	25,1	LYSVULPEN
28	toamnă	2002	61	54 472	24 960	29 512	1 189 400	448 800	740 600	21,8	18,0	25,1	LYSVULPEN
Total			1 180	1 047 912	896 926	150 986	19 179 000	15 343 600	3 835 400	18,3	17,1	25,4	

Realizat de către: Laboratorul Național de Referință pentru rabie Liberec Republica Cehă

Tabelul nr. 8 Prezentarea generală a examinărilor de verificare în laborator cu privire la campaniile individuale de vaccinare în vederea imunizării pe cale orală împotriva rabiei a vulpilor, în Republica Cehă

Campanie	Consumare momeală % total	TTC%	Verificarea vulpilor cu privire la TTC	Seroconversie %	Examinarea serurilor de vulpe	Număr de animale pozitive	Identificarea virusilor de rabie prelevați
1 primăvară 1989	55,0	55,7	210	83,8	68	1 501	virus de stradă
2 toamnă 1989	69,0	53,0	198	49,1	157		
3 primăvară 1990	63,0	79,5	415	48,3	319	1 157	virus de stradă
4 toamnă 1990	73,0	66,3	184	54,9	82		
5 primăvară 1991	72,0	82,5	206	78,1	183	1 154	virus de stradă
6 toamnă 1991	75,0	73,0	724	53,3	368		
7 primăvară 1992	76,0	87,7	1 211	60,1	526	570	virus de stradă
8 toamnă 1992	82,0	83,6	1 992	51,0	1 024		
9 primăvară 1993	82,0	75,7	1 265	43,0	355	422	virus de stradă
10 toamnă 1993	84,0	77,0	2 114	52,0	1 305		
11 primăvară 1994	82,8	85,0	1 322	53,0	612	221	virus de stradă
12 toamnă 1994	86,0	82,0	1 998	58,0	1 802		
13 primăvară 1995	87,2	82,4	1 145	60,8	656	178	virus de stradă
14 toamnă 1995	85,9	74,1	3 661	54,0	2 122		
15 primăvară 1996	86,8	77,1	1 009	60,6	574	237	virus de stradă
16 toamnă 1996	86,7	71,5	3 339	54,9	1 662		
17 primăvară 1997	88,6	74,5	1 091	55,6	462	238	virus de stradă
18 toamnă 1997	88,7	70,8	1 745	50,4	920		
19 primăvară 1998	88,3	79,6	1 203	64,8	377	85	virus de stradă
20 toamnă 1998	87,4	70,0	2 218	51,0	945		
21 primăvară 1999	88,9	77,3	1 273	62,2	560	214	virus de stradă
22 toamnă 1999	88,3	73,4	2 512	66,6	1 135		
23 primăvară 2000	87,5	77,4	1 116	71,0	414	165	virus de stradă
24 toamnă 2000	87,6	78,8	2 273	69,4	946		
25 primăvară 2001	86,5	80,0	1 981	70,2	790	35	virus de stradă
26 toamnă 2001	88,8	75,9	1 136	60,8	412		
27 primăvară 2002	88,5	80,1	1 431	78,3	618	3	virus de stradă
Total	87,7	75,7	38 972	59,8	19 394	6 180	100 % virus de stradă

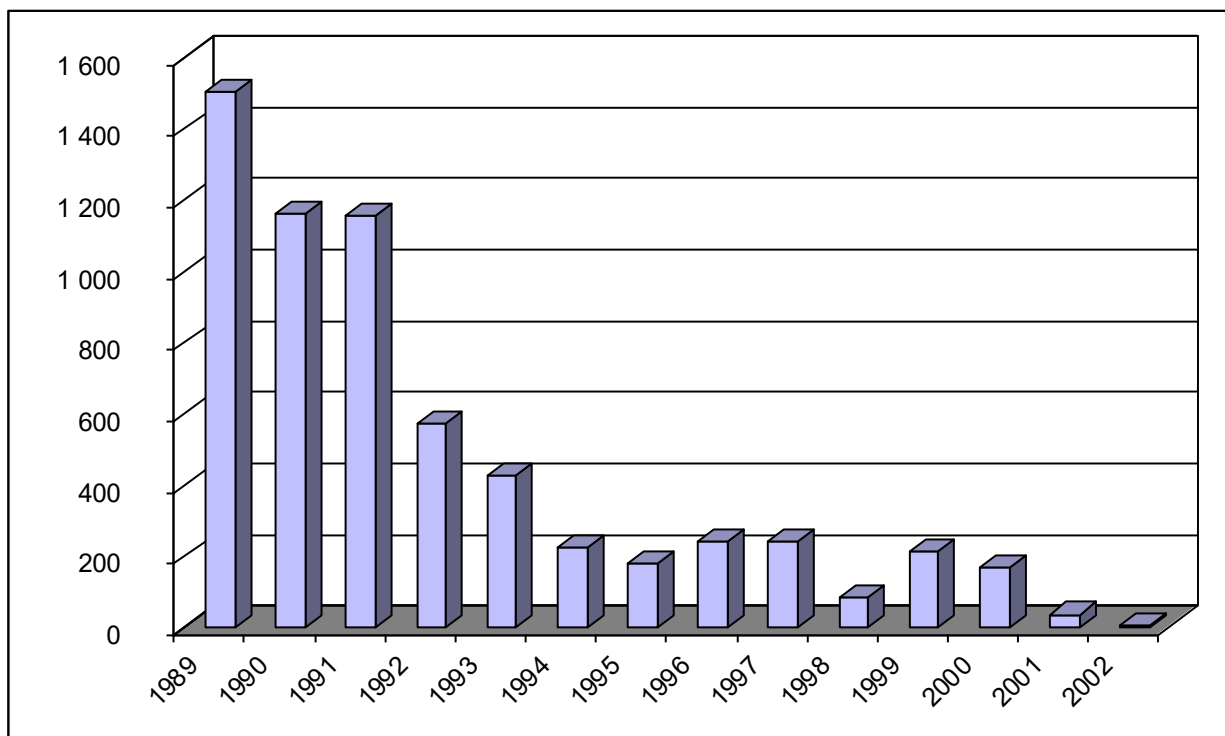
Realizat de către: Laboratorul Național de Referință pentru rabie Liberec Republica Cehă

Tabelul nr. 9 Prezentarea generală a cazurilor de rabie din Republica Cehă între

1989 și 2002

An	Câine	Pisică	Vulpe	Altele	Total
1989	10	45	1 369	77	1 501
1990	9	34	1 046	68	1 157
1991	8	30	1 044	72	1 154
1992	7	14	526	23	570
1993	2	19	359	42	422
1994	6	5	191	19	221
1995	2	5	157	14	178
1996	0	3	223	11	237
1997	0	6	224	8	238
1998	1	3	77	4	85
1999	1	3	192	18	214
2000	2	3	142	18	165
2001	0	2	29	4	35
2002	0	0	3	0	3
Total	48	172	5 582	378	6 180
%	0,8	2,8	90,3	6,1	100,0

Realizat de către: Laboratorul Național de Referință pentru rabie
Liberec
Republica Cehă Liberec

Diagrama nr. 1: prezentarea sub formă de diagramă a cazurilor de rabie din Republica Cehă între 1989 și 2002

Realizat de către: Laboratorul Național de Referință pentru rabie
Liberec
Republica Cehă Liberec

**Tabelul nr. 10 Prezentarea generală a examinărilor și a numărului de ratoni
(Nyctereutes procyonoides) depistați pozitiv cu rabie în Republica Cehă între 1991 și 2002**

An	Număr de animale examinate	Număr de animale pozitive
1991	2	1
1992	1	—
1993	2	1
1994	1	—
1995	1	—
1996	2	—
1997	3	—
1998	3	—
1999	0	—
2000	2	—
2001	2	—
2002	1	—
Total	20	2

Realizat de către: Laboratorul Național de Referință pentru rabie
Liberec
Republica Cehă Liberec



BIOVETA, a. s. Komenského 212, 683 23 Ivanovice na Hané, Czech Republic,
tel.: 420/517/363321-4 e-mail: comm@bioveta.cz

Anexa nr. 1. Proiect test

PROIECT TEST NR. 16/1997

În conformitate cu Secțiunea 12 din Adresa Publică Nr. 311/97 Coll., cu privire la creșterea și utilizarea animalelor de testare.

1. Identificare companie: Bioveta, a.s.

Komenského 212
683 23 Ivanovice na Hané
Cod identificare companie: 25304046
Telefon: 0507/363321-4
Fax: 0507/363294
0507/363281
e-mail: comm@bioveta.cz

Reprezentanți legali: Ing. Libor Bittner, CSc., cod numeric personal 620403/0811
MVDr. Vladimír Vrzal, CSc., cod numeric personal 531126/277

Persoane însărcinate cu negocierile cu Autoritățile de Stat: Ing. Libor Bittner, CSc.
MVDr. Vladimír Vrzal, CSc.

2. Numărul deciziei de acordare a acreditării:

3. Responsabilul proiectului test:

prenume, nume, titlu

MVDr. Josef Chumela

Posesor al certificatului în conformitate cu Secțiunea 17 din Adresa Publică Nr 311/1997 Coll.

3.1. Asistent responsabil al proiectului test:

prenume, nume, titlu

MVDr. Ján Zajac, CSc.

4. Persoana responsabilă pentru îngrijirea animalelor:

Ing. Lubomír Kryl

Cod numeric personal 450225/430

Posesor al certificatului în conformitate cu Secțiunea 17 din Adresa Publică Nr 311/1997 Coll.

Persoana responsabilă pentru verificarea și coordonarea testelor efectuate pe animale

Președintele Comitetului de Experți al Companiei:

MVDr. Dáš a Radoš ová

Cod numeric personal 595423/0447

Posesor al certificatului în conformitate cu Secțiunea 17 din Adresa Publică Nr. 311/1997

5. Numele și obiectivul experimentului:

Verificarea în laborator a siguranței și eficacității vaccinului administrat la animalele țintă.

LYSVULPEN por. ad us. vet.

Vaccin antirabic pentru imunizarea pe cale orală a vulpilor

Verificarea siguranței și a eficacității vaccinului, în conformitate cu cerințele stipulate de către Farmacopeea Cehă ČL 97 – Vaccinum rabiei perorale vivum ad vulpem (vaccinul antirabic viu pentru administrarea pe cale orală la vulpi) – pagina 3331.

6. Caracterizarea obiectivelor:

6.1. Testul este inevitabil datorită următoarelor motive: (Secțiunea 15, subsecțiunea 3 din Adresa Nr. 246/92 Coll.)

6.1.5. producția de seruri, vaccinuri, diagnostice și alte materiale biologice și farmaceutice.

6.2. Menționarea contribuției specifice estimate a testului:

Testarea în laborator a siguranței și a eficacității vaccinului trebuie efectuată datorită noului articol farmaceutic în vigoare, menționat în Farmacopeea Cehă 1997.

7. Descriere succintă a testului:

I. Testarea de siguranță

Teste de laborator: testarea siguranței vaccinului la toate speciile de animale țintă – vulpi și ratoni și alte specii de animale care ar putea intra în contact cu preparatul datorită metodei sale de aplicare, adică câini, pisici și rozătoare libere.

a) siguranța pentru administrarea într-o tranșă

b) siguranța pentru administrarea într-o tranșă, într-o doză ridicată

c) siguranța pentru administrarea repetată a unei doze

II. Testarea de eficacitate

Teste de laborator: testarea de eficacitate a vaccinului efectuată la toate speciile de animale țintă – vulpi și ratoni. Testarea de eficacitate se efectuează prin intermediul determinării reacției specifice cu anticorpi după administrarea vaccinului testat, la toate speciile de animale țintă. Testele de verificare se efectuează în vederea verificării imunității de protecție.

8. Proceduri metodologice de tratare a animalelor:

Animalele trebuie tratate în cel mai delicat mod posibil, în vederea minimizării stresului.

Preparatul testat se aplică pe cale oral la vulpi și la ratoni (consumare naturală a momelii). Câinilor, pisicilor și șoarecilor de câmp li se administrează vaccinul prin injectare cu un prelungitor din cauciuc în cavitatea orală.

Testare de siguranță: după administrarea preparatului, reacțiile generale care apar la animalele testate se înregistrează în fiecare zi, timp de 6 luni de zile. După parcurgerea perioadei de monitorizare, toate animalele testate se eutanasează fără suferință și se detectează prezența virusului de rabie în creier sau în organe, utilizând metode de laborator.

Eficiența se bazează pe formarea de reacție specifică cu anticorpi care poate fi detectată în mostrele de ser de la animalele imunizate testate. Dacă în serul animalelor vaccinate se obține un

nivel de 0,5 IU, atunci animalele respective sunt protejate împotriva rabiei. Testul de eficiență, cu un grad ridicat de obiectivitate, al vaccinului este testul de verificare, pe parcursul căruia atât animalele vaccinate, cât și animalele martor, nevaccinate, sunt supuse infectării cu virusul de rabie de stradă. Procentajul de animale vaccinate care supraviețuiesc se compară cu cel al animalelor martor, nevaccinate.

Perioada de efectuare a testului: iunie 1999 – septembrie 2000

9. Declarația ofertantului cu privire la demonstrarea necesității efectuării testului:

Este necesar a efectua testul pentru a demonstra siguranța și eficiența preparatului, în scopuri de înregistrare, așa cum se solicită de către articolul farmaceutic din Farmacopeea Cehă 1997.

10. Justificarea selectării animalelor:

Speciile de animale sunt indicate în testele farmaceutice din Farmacopeea Cehă 97 – pagina 3331.

11. Țara de origine a animalelor testate:

Țara de origine: Republica Cehă.

11.1. Identificarea furnizorilor:

Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, BioTest Konárovice

12. Justificarea numărului planificat de animale:

Testare de siguranță – teste de laborator

60 de vulpi (*Vulpes vulpes*)
30 de ratoni (*Nyctereutes procyonoides*)
10 câini
10 pisici
200 de șoareci de câmp (*Microtus arvalis*)

Testare de eficiență – teste de laborator

teste de verificare - 135 de vulpi
- 15 ratoni

13. Metoda de etichetare a animalelor testate:

13.1. Tatuaj pe auricul, crestare a urechilor, etichetare individuală în incintele de creștere.

14. Metoda de desensibilizare, măsuri pentru suprimarea suferinței:

Nu face parte din acest proiect test și nu este indicată.

15. Plasarea animalelor în timpul testului:

Animalele vor fi plasate în conformitate cu fiecare specie în parte – individual sau în grupuri.

Studiu de laborator

- vulpile vor fi plasate câte 5 într-un țarc. Vulpile de același sex vor fi plasate întotdeauna în același țarc. Țărcurile urmează a fi împărțite într-o construcție interioară, cu o zonă de odihnă pentru vulpi, și o zonă exterioară. Zona interioară va fi betonată și zona exterioară va dispune de un pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața construcției interioare plus zona exterioară adiacentă) va fi de 10 metri pătrați, pentru cinci vulpi.

- ratonii vor fi plasați câte 5 într-un țarc. Ratonii de același sex vor fi plasați întotdeauna în același țarc. Țărcurile urmează a fi împărțite într-o construcție interioară, cu o zonă de odihnă pentru animale, și o zonă exterioară. Zona interioară va fi betonată și zona exterioară va dispune de un pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața construcției interioare plus zona exterioară adiacentă) va fi de 10 metri pătrați, pentru cinci ratoni.

- câinii vor fi plasați câte 5 într-un țarc. Câinii de același sex vor fi plasați întotdeauna în același țarc, adică fie câini mascul, fie câini femelă. Țărcurile urmează a fi împărțite într-o construcție interioară, cu o zonă de odihnă pentru câini, și o zonă exterioară. Zona interioară va fi betonată și zona exterioară va dispune de un pat de nisip. Suprafața totală (adică suprafața construcției interioare plus zona exterioară adiacentă) va fi de 10 metri pătrați, pentru cinci câini.

- pisicile vor fi plasate câte 5 într-un țarc. Pisicile de același sex vor fi plasate întotdeauna în același țarc. Țărcurile urmează a fi împărțite într-o construcție interioară, cu puncte elevate servind drept zone de odihnă pentru câini, și o zonă exterioară. Zona interioară va fi betonată și pavată și zona exterioară va dispune de un pat de nisip. În zona exterioară vor exista bușteni pentru ca pisicile să-și poată ascuți ghearele. Crengile vor fi parte a zonei exterioare, cu scopul de a permite cățărarea animalelor. Suprafața totală (adică suprafața construcției interioare plus zona exterioară adiacentă) va fi de 4 metri pătrați, pentru cinci pisici. Animalele vor fi incluse în test după ce au fost deparazitate intestinal cu un preparat înregistrat în Republica Cehă, administrat în doza recomandată, și după parcurgerea unei perioade de carantină, pe parcursul căreia acestea nu prezintă nicio abatere de la starea standard de sănătate.

- șoarecii de câmp vor fi plasați în cuști clasice din material plastic, pentru creșterea șoarecilor de laborator. Capacul superior va fi confecționat din plasă din oțel inoxidabil. Cuștile vor fi amplasate într-o incintă cu aer condiționat, în condiții de temperatură stabilă, umiditate stabilă și circulație stabilă a aerului. Șoarecii de câmp vor fi plasați câte zece într-o cușcă.

Schema de îngrijire a animalelor:

Studiu de laborator

- vulpile vor fi hrănite cu un amestec granulat complex pentru câini, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă; în plus vor fi hrănite cu resturi de carne fierte și intestine selectate de la abatoare. Dozele de hrană din amestec comercial vor fi determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea vulpilor. Vulpile vor fi hrănite o dată pe zi, în speță la ora 2.00 p.m. Apa potabilă va fi la dispoziția vulpilor ad libitum.

- ratonii vor fi hrăniți cu un amestec granulat complex pentru câini, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă; în plus vor fi hrănite cu resturi de carne fierte și intestine selectate de la abatoare. Dozele de hrană din amestec comercial vor fi determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea animalelor. Ratonii vor fi hrăniți o dată pe zi, în speță la ora 2.00 p.m. Apa potabilă va fi la dispoziția animalelor ad libitum.

- câinii vor fi hrăniți cu un amestec granulat complex, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă. Dozele de hrană din amestec comercial vor fi determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea câinilor. Câinii vor fi hrăniți de două ori pe zi, în speță la ora 8.00 a.m. și la ora 2.00 p.m. Apa potabilă va fi la dispoziția câinilor ad libitum.

- pisicile vor fi hrănite cu un amestec granulat complex, produs de un producător comercial înregistrat în Republica Cehă. Dozele de hrană din amestec comercial vor fi determinate în baza recomandărilor producătorului, în funcție de greutatea pisicilor. Pisicile vor fi hrănite de două ori pe zi, în speță la ora 8.00 a.m. și la ora 2.00 p.m. Apa potabilă va fi la dispoziția pisicilor ad libitum. Atât hrana, cât și apa vor fi servite în boluri din oțel inoxidabil.

- șoarecii de câmp vor fi hrăniți cu un amestec granulat comercial pentru șoareci. Va fi adăugată hrănirea cu iarbă, bucăți de fructe (mere, pere) și rădăcini. Apa va fi servită ad libitum, de la recipiente de apă automate.

16. Orar:

Durata testelor:

Testele vor fi efectuate continuu, din iunie 1999 până în 2000.

17. Nivelul de dotare cu echipamente chirurgicale și metoda de asistență post-chirurgicală:

17.1. Nu se vor efectua intervenții chirurgicale.

18. Modalitatea de tratare a animalelor după terminarea testului:

18.3. După terminarea testului animalele vor fi eutanasiate fără suferință.

19. Controlul metodei de respectare a reglementărilor cu privire la protecția animalelor:

Asistența veterinară va fi asigurată de către specialiști veterinari – angajați ai companiei – în timpul orelor de lucru. În afara orelor de lucru, asistența veterinară va fi asigurată de către un specialist veterinar privat, MVDr. Jaroslav Kuja, M. Majerové, Vyškov, în baza unui contract. Controlul va fi efectuat de către o persoană responsabilă pentru creșterea și plasarea animalelor, în speță o dată pe săptămână. Animalele incluse în testele de verificare vor fi tratate și supravegheate de către un specialist veterinar desemnat, de la Bioveta, a.s.

20. Specificarea riscurilor de sănătate pentru alte animale și pentru angajați:

Virusul de rabie utilizat în scopuri de verificare și animalele infectate sunt periculoase atât pentru animale, cât și pentru oameni. Trebuie respectate toate măsurile de siguranță. Toate persoanele care intră în contact cu virusul viu de vaccinare sau cu animalele infectate trebuie să fie vaccinate și trebuie să fie imune la rabie (vaccinarea va fi efectuată la Spitalul din Bohunice, MUDr. Marta Šnelerová).

21. Condiții veterinare pentru test:

În timpul lucrului trebuie respectate regulile de laborator ale companiei Bioveta, a.s. și reglementările legale în vigoare.

21.1. Nu va fi administrat niciun generator viu de boală infecțioasă la oameni:

Vaccinul testat este un vaccin viu, care conține virusul viu atenuat de rabie din tulpina SAD Bern. În cadrul obiectului testelor de verificare se va utiliza un virus de rabie de stradă, care este periculos și pentru oameni.

21.2. Este necesară administrarea unui generator viu de infecție la animale – virusul de verificare – mostră de virus de rabie prelevată pe teren, de la glandele salivare ale vulpilor din Republica Cehă. Virusul de verificare va fi preparat de către Institutul de Stat de Cercetare din Liberec.

21.3. Nu va fi utilizată nicio substanță care are un impact asupra produselor animaliere.

22. Justificarea intervențiilor repetate asupra animalelor:

Vaccinările repetate constituie o parte planificată a testului și acestea demonstrează siguranța preparatului, în scopul înregistrării sale, așa cum se solicită de către articolul farmaceutic din Farmacopeea Cehă 1997.

23. Informații cu privire la nivelul de circumstanțe al practicii corecte de laborator:

în cazul în care se solicită de către reglementarea legală (Adresa Publică Nr. 117/87 Coll., Secțiunea 13 din Adresa Nr. 79/97 Coll.).

Ștampila instituției utilizatorului: Data și semnătura:

- responsabil test: 15 iunie, 1997

- asistent responsabil test: 15 iunie, 1997

- reprezentant legal: 15 iunie, 1997

Subsemnata **ALBU OCTAVIANA - VERONICA**, traducător autorizat de M. J. cu nr. **12506/2005**,
certific exactitatea traducerii cu textul înscrisului în copie electronică, în limba engleză.

TRADUCĂTOR ALBU OCTAVIANA - VERONICA, - AUTORIZAT cu nr. **12506/2005**

ALBU OCTAVIANA VERONICA
TRADUCĂTOR AUTORIZAT
ENGLEZĂ
Aut. M.J. 12506/2005

