

CERCETĂRI PRIVIND EFICIENȚA VACCINURILOR VII, PREPARATE DE COMPANIA ROMVAC ÎN IMUNOPROFILAXIA RABIEI LA CARNASIERE

RESEARCHES ON EFFICIENCY OF ROMVAC'S COMPANY LIVE VACCINES USED IN RABIES IMUNOPROPHYLAXY IN CANIDES

Gugiu I. *, I.N. *, Chiriaca Ionescu*, Știube P. *, Toacsen E. *, Mihai I. **, Zavoiu F. *, Moțiu Gh. *, Mirela Vasile*, Ana Sandu***, Daniela Moțiu***, Botea D.***

* Romvac Company S.A.

** Institutul de Diagnostic și Sănătate Animală

*** Institutul pentru Controlul Produselor Biologice și Medicamentelor de uz Veterinar.

Cuvinte cheie: rabie, vaccin antirabic, control

Key words: rabies, rabies vaccine, control

Abstract

The paper present the methods for preparation and control of the live rabies vaccines, RABIROM and RABIROM-V, produced by ROMVAC Co. S.A., to be used for prevention of the rabies in dogs, cats and foxes.

Rezumat

Lucrarea prezintă modalitățile de preparare și de control ale vaccinurilor antirabice vii, RABIROM și RABIROM-V, produse ale ROMVAC Co. S.A., destinate prevenirii turbării la câini, pisici și respectiv vulpi. Rabia (turbarea, hidrofobia) este o zoonoză virală neuroinvasivă (1, 7) care a focalizat asupra ei eforturile de a înțelege etiopatogenia bolii, de a putea stabili diagnosticul și de a găsi mijloacele de prevenire și de control ale acesteia.

Dramatismul cu care evoluează boala la carnasiere, ca de altfel la toate animalele cu sânge cald (inclusiv omul) a făcut ca nume ilustre ale medicinei umane și veterinare să cerceteze și să aducă contribuții la rezolvarea problematicii legate de turbare. Sunt de menționat Louis Pasteur, Claudio Fermi ca și românii Victor Babeș, Adelchi Negri ș.a. (5).

Rabia este produsă de un virus care aparține familiei Rhabdoviridae, genul Lyssavirus, specia de virus rabic din serotipul 1. Se cunosc acum toate datele legate de aspectul electromicroscopic al particulei virale (formă de glonț, este anvelopat, cu dimensiuni de 130-240 nm), de compoziția fizico-chimică (particulele virale conțin 67 % proteine, 26 % lipide, 4 % ARN monocatenar, care codifică pentru 5 proteine: G, M, N, L, S și 3 % carbohidrați, legați covalent de lipide și proteine) de rezistența la factorii de mediu și de substanțele care îl conservă (glicerol) sau dimpotrivă îl distrug (aldehida formică, solvenți ai lipidelor) (1, 3, 10).

Prin studii de virus neutralizare cu anticorpi monoclonali au fost identificate și izolate, de la om și animal, în afara serotipului clasic 1, alte cinci serotipuri (1,10). Virusul rabic pătrunde în organism

prin mușcături, leziuni ale pielii, inhalat, prin mucoasele ochilor și gurii.

Virusul se multiplică la locul inoculării și apoi se diseminează centripet de-a lungul axonilor nervilor periferici.

După pătrunderea în sistemul nervos central apar manifestările de boală, care, la câine, evoluează în formele furioasă și mută sau paralytică.

Diagnosticul de turbare, prezumtiv, se realizează pe baza simptomatologiei, prin urmărirea animalului bolnav, timp de 14 zile și de certitudine prin examene de laborator: examen histopatologic care evidențiază corpi Babeș-Negri în celule din *hipocampus major*, urmat de inocularea șoricilor sugari sau/și examenul pe amprente utilizând imunofluorescența. Alte teste folosite în diagnostic sunt reacția de fixare a complementului, testele de virus neutralizare și ELISA. Se mai utilizează tehnici imunoperoxidazice, eventual cu amplificare, în sistemul avidină-biotină pe țesuturi fixate cu aldehidă formică (3).

În figura 1 este prezentată o cultură de celule BHK₂₁C₁₃ infectată cu virus rabic, examinată la microscop.

Incluziile rabice sunt formațiuni rotunde / ovalare care prezintă halou de jur împrejur.

Virusul rabic se replică, în vertebrate și insecte, ca și în unele culturi de celule primare (ex: de pui de găină, iepure, șoarece, hamster, câine, porc etc.) sau linii stabilizate (BHK₂₁C₁₃, MR-5, WI-38 etc.).

Pentru controlul turbării au fost create vaccinuri vii sau inactivate în care virusul rabic a fost cultivat în organisme animale (șoareci, oi, ouă embrionate de găină etc.) sau în substrat celular-culturi de celule primare sau linii stabilizate de origine umană, animală ori provenind de la primate.

Există vaccinuri antirabice monovalente sau asociate pentru carnivore sau/și pentru alte specii de animale (2).

Deoarece carnivorele reprezintă principalul rezervor rabigen, ele au beneficiat de cea mai mare atenție în privința realizării de vaccinuri care să asigure imunoprevenția antirabică.

Începând cu anul 1990, în cadrul companiei ROMVAC au început cercetările pentru prepararea unor vaccinuri vii pentru câini și pisici, cu administrare parenterală și respectiv pentru vulpi, cu administrare orală (4). Din 1997 și până în prezent au fost preparate și livrate în teren 272 serii de vaccin antirabic pentru câini și pisici, RABIROM, echivalentul a mai mult de 12 milioane doze și respectiv 17 serii de vaccin antirabic pentru vulpi, RABIROM-V, adică mai mult de 200.000 momeli.

Scopul prezentei lucrări este de a informa cititorii și colegii, medici veterinari care utilizează produsele companiei ROMVAC asupra modalităților de preparare și de control, activitate realizată atât în cadrul Laboratorului de Control Produse Biologice, propriu, cât și în cel al Institutului pentru Controlul Produselor Biologice și Medicamentelor de uz Veterinar.

Vaccinurile antirabice RABIROM și RABIROM-V se realizează utilizând metode moderne de replicare a virusurilor rabice, tulpinile HEP-FLURY și SAD-BERNE, în culturi de celule, primare și respectiv dintr-o linie stabilizată de celule.

În figura 2, este prezentat aspectul incluziilor rabice în cultură de celule BHK₂₁C₁₃ inoculate cu tulpina SAD-BERNE.

Controlul titrului vaccinurilor antirabice RABIROM și RABIROM-V se realizează utilizând șoareci SPF din linia NMRI și

respectiv imunofluorescența directă cu seruri monospecifice.

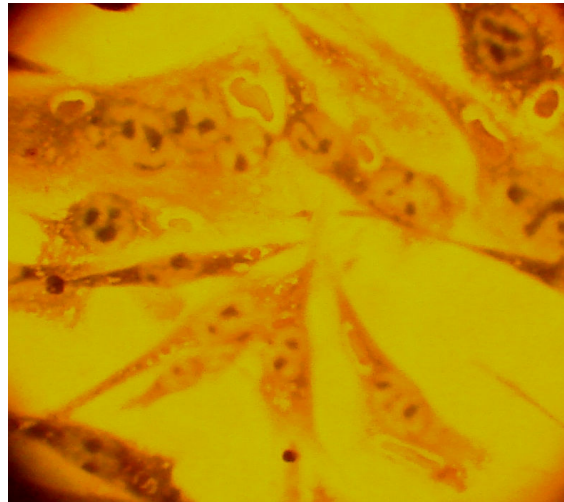


Figura 1. Cultură de celule BHK₂₁C₁₃ infectată cu virus rabic, examinată la microscop. (Colorația Sellers) Incluziunile rabice sunt formațiunile rotunde / ovalare care prezintă halou de jur împrejur.

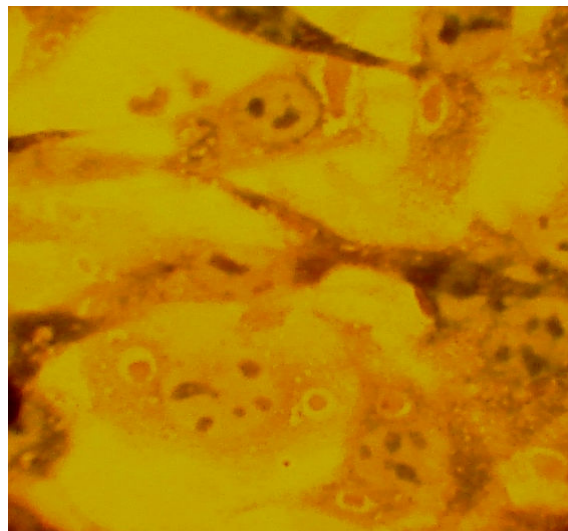


Figura 2. Cultură de celule BHK₂₁C₁₃ infectată cu virus rabic, inoculate cu tulpina SAD-BERNE, examinată la microscop. (Colorația Sellers) Incluziunile rabice sunt formațiunile rotunde/ovalare care prezintă halou de jur împrejur.

Produsele RABIROM și RABIROM-V sunt realizate în acord cu normele internaționale (9) și controlate în Laboratorul de Control Produse Biologice și în cadrul Institutului pentru Controlul Produselor Biologice și Medicamentelor de uz Veterinar.

MATERIALE ȘI METODE

1. Culturi celulare:

- Culturile celulare de fibroblaste embrionare de găină (FEG) SPF, substrat pentru producerea vaccinului RABIROM

Culturile celulare din linia celulară BHK₂₁C₁₃, substrat pentru producerea vaccinului RABIROM-V

2. Tulpini de virus:

- HEP-FLURY pentru producerea vaccinului RABIROM

- SAD-BERNE - pentru producerea vaccinului RABIROM-V

3. Medii de cultură și întreținere, alte ingrediente

- Mediu 199 pentru producerea vaccinului RABIROM;

- Minimum Essential Medium (MEM)/ Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) pentru producerea vaccinului RABIROM-V;

- Ser fetal bovin (Fetal Bovine Serum-BFS) sau ser de vițel nou-născut;

- L-glutamină;

- Antibiotice;

- Soluții de disociere a monostratelor celulare;

- Soluții stabilizatoare.

Materiile prime folosite la prepararea și condiționarea vaccinurilor antirabice sunt însoțite de Certificate de analiză și de conformitate ce atestă calitatea acestora.

Metode

1. Obținerea monostratelor celulare de FEG și BHK₂₁C₁₃

2. Inocularea culturilor celulare cu tulpina de virus rabic, HEP-FLURY respectiv SAD-BERNE

3. Recoltarea suspensiei virale și condiționarea seriei de vaccin

Vaccinul RABIROM se condiționează prin liofilizare în flacoane ce conțin 1, 5 sau 10 doze. Produsul este însoțit de diluant, în volum corespunzător numărului de doze. Diluantul este o soluție tampon fosfat salin, ce asigură rehidratarea cu conservarea proprietăților biologice ale vaccinului. Vaccinul se conservă pe toată perioada de valabilitate la temperatura de +2/+8°C iar diluantul la temperatura camerei.

Vaccinul RABIROM-V se condiționează în blistere din PVC (atoxic alimentar) iar acestea se montează în momeli vaccinale care se conservă pe toată perioada de valabilitate la temperatura de - 15/-20°C.

4. Controlul vaccinului

După prelevarea probelor (RABIROM și RABIROM-V) se efectuează controale

calitative și cantitative conform normelor specifice.

Controale calitative

Controlul sterilității bacteriologice și fungice se efectuează la fiecare serie de vaccin, conf. F.R.X, acceptându-se pentru livrare numai seriile corespunzătoare;

Controlul inocuității atestă lipsa de nocivitate a produsului. Se efectuează atât pentru specia țintă (inocuitate specifică) cât și pe animale de laborator – șoareci - (inocuitate nespecifică). Inocuitatea specifică se efectuează prin inocularea la specia țintă de 10 x doza vaccinală. În perioada lucrărilor pentru omologarea produsului animalele au fost inoculate cu doze repetate de vaccin.

La toate seriile de vaccin controlate în perioada de omologare, ca și la controlul seriilor de producție nu au fost înregistrate reacții locale sau generale care să poată fi atribuite vaccinului antirabic RABIROM și RABIROM-V. Controlul răspunsului imun pentru vaccinul antirabic RABIROM și RABIROM-V se realizează prin seroneutralizare pe șoarece cu determinarea indicelui de neutralizare care trebuie să fie de cel puțin 1 UI.

Controlul efectului protector specific al vaccinului RABIROM

Seria de vaccin este corespunzătoare, când șoarecii vaccinați supraviețuiesc la infecția de control cu 1.000 MICLD₅₀ (*mouse intracerebral letalis dosis*₅₀)/0,03 ml - virus rabic fix Babeș, după o perioadă de 10 zile de observație;

Demonstrarea prezenței virusului rabic la animalele moarte se face prin reacția de imunofluorescență pe amprente din creier.

Controale cantitative

Controlul umidității reziduale se execută la fiecare serie de vaccin condiționat prin liofilizare și trebuie să aibă valoarea ≤ 3 g%.

Controlul concentrației de virus se execută la fiecare serie de vaccin, prin stabilirea titrului infectant pe șoricei sugari, în vârstă de 1-2 zile, exprimat în MICLD₅₀/ml. Seriile de vaccin sunt corespunzătoare dacă titrul minim este de 10⁵MICLD₅₀/ml (doza vaccinală).

* Cuiburile cu șoricei, SPF linia NMRI, în vârstă de 1-2 zile, utilizați pentru controlul titrului viral sunt însoțite de Certificate de sănătate eliberate de către unitatea

producătoare. Pe întreaga perioadă de preparare a vaccinului antirabic viu, RABIROM în afara controalelor calitative și cantitative menționate au fost executate și teste de stabilitate care să ateste că pe timpul conservării, în dinamică, ca și la sfârșitul perioadei de valabilitate, umiditatea

reziduală și titrul produsului au rămas corespunzătoare. În tabelele 1 și 2 și sunt prezentate rezultatele ce atestă stabilitatea vaccinului RABIROM, evaluată prin controlul titrului și al umidității reziduale la momentul condiționării prin liofilizare și la sfârșitul perioadei de valabilitate.

Tabelul 1

Rezultatele controlului privind concentrația virală / doza vaccinală, după liofilizare și la sfârșitul perioadei de valabilitate pentru vaccinul RABIROM

Seria	Data preparării	Valabilitate	Cantitatea/fl.	Doza vaccinală	Titrul vaccinului exprimat în MICLD ₅₀ /doză	
					La data liofilizării	La sf. valabilității
88	15.01.2001	15.01.2002	5 ml	10 ^{5,0}	10 ^{6,30}	10 ^{5,50}
96	09.05.2001	09.05.2002	1 ml	10 ^{5,0}	10 ^{5,65}	10 ^{5,10}
155	14.06.2004	14.06.2005	1 ml	10 ^{5,0}	10 ^{5,60}	10 ^{5,16}
156	03.08.2004	03.08.2005	3 ml	10 ^{5,0}	10 ^{6,30}	10 ^{6,00}

Rezultatele testelor înscrise în tabelul 1 atestă conservarea titrului viral al seriilor de

vaccin RABIROM pe perioada de valabilitate (12 luni de la data condiționării)

Tabelul 2

Rezultatele controlului privind, umiditatea reziduală (U.R.- conținutul de apă exprimat în grame la %) după liofilizare și la sfârșitul perioadei de valabilitate pentru vaccinul RABIROM

Seria	Data preparării	Valabilitate	Cantitatea/fl.	Condiții de admisibilitate	Umiditatea reziduală g %	
					La data liofilizării	La sf. valabilității
88	15.01.2001	15.01.2002	5 ml	U.R. ≤ 3 g.%	2,29;2,36;2,40.	2,30;2,22;2,37.
96	09.05.2001	09.05.2002	1 ml	U.R. ≤ 3 g.%	2,05;2,09;1,19.	2,50;2,30;2,15.
155	14.06.2004	14.06.2005	1 ml	U.R. ≤ 3 g.%	1,58;2,08;2,19.	1,70;2,10;2,25.
156	03.08.2004	03.08.2005	3 ml	U.R. ≤ 3 g.%	2,58;2,01;2,19.	2,45;2,30;2,10.

Rezultatele înscrise în tabelul 2 atestă faptul că la sfârșitul perioadei de valabilitate (12 luni de la data liofilizării) umiditatea reziduală în flacoanele de vaccin RABIROM a fost ≤ 3 g %. Prin particularitățile de administrare ale produsului RABIROM-V s-a impus necesitatea testării stabilității vaccinului prin evaluarea titrului viral:

- la vaccinul conservat la temperatura de -15/-20°C, pe toată perioada de valabilitate (tabelul 3) ;

- la vaccinul menținut, timp de 3-5 zile în condițiile în care se aplică obișnuit : pe teren, primăvara și toamna, precum și în lunile februarie și decembrie, când temperaturile sunt peste 0°C, până la 20 - 25°C. Vaccinul decongelat se poate păstra maxim 5 zile la temperatura de 2 – 8°C, înainte de utilizare (tabelul 4).

Tabelul 3

Valorile titrului viral /doza vaccinală pentru vaccinul RABIROM-V, conservat la temperatura de -15/-20°C, testat la data condiționării și la sfârșitul perioadei de valabilitate

Seria	Data preparării	Valabilitate	Cantitatea repartizată /blister	Titrul 10 ^{6,0} MICLD ₅₀ /doză	
				La data condiționării	La sf. valabilității
3	12.09.2005	12.03.2006	1,5 ml	10 ^{7,20}	10 ^{6,40}
10	14.08.2006	14.02.2007	1,5 ml	10 ^{7,28}	10 ^{7,00}
11	12.09.2006	12.03.2007	1,5 ml	10 ^{7,50}	10 ^{6,50}
13	24.09.2006	24.04.2007	1,5 ml	10 ^{7,00}	10 ^{6,50}
15	13.02.2007	13.08.2007	1,5 ml	10 ^{7,30}	10 ^{6,80}

Rezultatele prezentate în tabelul 3 atestă faptul că titrul suspensiei vaccinale la sfârșitul perioadei de valabilitate (vaccin

conservat la temperatura de -15/-20°C) a avut o valoare mai mare de 10^{6,0} MICLD₅₀/doza vaccinală.

Tabelul 4

Valorile titrului viral /doza vaccinală pentru vaccinul RABIROM-V, menținut în condiții de teren

Seria	Data preparării	Valabilitate	Cantitatea repartizată /blister	Titrul vaccinului exprimat în MICLD ₅₀ /doză	Titrul vaccinului exprimat în MICLD ₅₀ /doză		
					La data preparării	Condiții de teren	
						3 zile	5 zile
10	14.08.2006	14.02.2007	1,5 ml	10 ^{6,0}	10 ^{7,28}	10 ^{6,90}	10 ^{6,50}
17	03.12.2007	03.06.2008	1,5 ml	10 ^{6,0}	10 ^{7,50}	10 ^{7,0}	10 ^{6,50}

Rezultatele prezentate tabelul 4 atestă faptul că titrul suspensiei vaccinale

din momelile menținute în condiții asemănătoare celor din teren s-a păstrat la o valoare mai mare de 10^{6,0} MICLD₅₀/doza vaccinală.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pe baza cercetărilor întreprinse în cadrul ROMVAC COMPANY S.A. au fost

realizate și oferite practicii veterinare, două vaccinuri antirabice vii, unul destinat administrării pe cale parenterală, vaccinul RABIROM, pentru imunizarea câinilor și pisicilor și altul pentru administrarea pe cale orală la vulpi, vaccinul RABIROM-V.

Din 1997 și până în prezent au fost preparate și livrate în teren 272 serii de

vaccin antirabic pentru câini și pisici, RABIROM, echivalentul a mai mult de 12 milioane de doze și respectiv 17 serii de vaccin antirabic pentru vulpi, RABIROM-V, adică mai mult de 200.000 momeli.

Vaccinurile antirabice RABIROM și RABIROM-V se realizează și utilizând metode moderne de replicare a virusurilor rabice, tulpinile HEP-FLURY și SAD-BERNE, în culturi de celule, primare și respectiv dintr-o linie stabilizată de celule.

Controlul titrului vaccinurilor antirabice RABIROM și RABIROM-V se realizează utilizând șoareci SPF din linia NMRI și respectiv imunofluorescența directă cu seruri monospecifice.

Produsele RABIROM și RABIROM-V sunt realizate în acord cu normele internaționale (9) și controlate în Laboratorul de Control Produse Biologice și în cadrul Institutului pentru Controlul Produselor Biologice și Medicamentelor de uz Veterinar.

Pe întreaga perioadă de preparare a vaccinului antirabic viu, RABIROM în

afara controalelor calitative și cantitative obișnuite, au fost executate teste de stabilitate care să probeze că pe timpul conservării, în dinamică, ca și la sfârșitul perioadei de valabilitate, umiditatea reziduală și titrul produsului au rămas corespunzătoare. Rezultatele acestor teste, prezentate în tabelele 1 și 2, probează calitatea vaccinului antirabic viu, RABIROM.

Ca politică de control, dar adecvat tipului de produs, vaccinul antirabic viu RABIROM-V pentru vulpi, a fost controlat pentru titru, în condițiile conservării la temperatura de -15/-20°C, ca și în condiții asemănătoare celor din teren. Rezultatele acestor teste, prezentate în tabelele 3 și 4, probează calitatea vaccinului antirabic viu, RABIROM.

BIBLIOGRAFIE

Francki, R.I.B. et al.(1991) Classification and Nomenclature de Virus. Springer-Verlag. Vth, page 244-245

Gugiu, I. et al. (1990)- Răspunsul imun al bovinelor vaccinate antiaftos-antirabic. *Archiva Vet.*, vol.XIX

Gugiu, I. (2003)- Etiopatogenia, diagnosticul, prevenirea și controlul bolilor virale la animale. Ed. CERES, București

Mihai, I. et al. (2007)- Vaccinarea antirabică a vulpilor în România. Rezumat în al X-lea Congres Național de medicină Veterinară, Poiana Brașov

Șerban, O.Toacsan, E. - Actualități în turbare. Ed. CERES, București

*** Rabies vaccine-live, oral, for foxes. European Pharmacopoeia 4, 01/2002:0746

*** Rabies-Wikipedia, the free encyclopedia. en.wikipedia.org/wiki/Rabies

*** Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium. European Pharmacopoeia 01/2002:0451

*** C. Requirements for vaccine and diagnostic biologicals, in Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals(updated 23.07.2004), page 24-32

*** Rhabdovirusues, Rabies Virus, Rabies Virus Infection. Virology-online.com/viruses/Rhabdoviruses.htm