

МОНИТОРИНГ ЗА ОТКРИВАНЕ НА ТЕТРАЦИКЛИН В ОБЛАСТИТЕ С ОРАЛНА ВАКСИНИЦИЯ СРЕЩУ БЯС ПРИ ЛИСИЦИ ПРЕЗ 2015 г.

Д. Илиева, М. Сталева и Р. Петрова

Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт – София

MONITORING OF TETRACYCLINE DETECTION IN DISTRICTS WITH ORAL VACCINATION OF FOXES AGAINST RABIES IN 2015

D. Ilieva, M. Staleva and R. Petrova

National Diagnostic Research Veterinary Medical Institute – Sofia

Резюме. В България през 2015 г. беше проведен мониторинг за детекция на тетрациклин и детерминиране на възрастта при лисиците в областите с орална ваксинация срещу бяс. Анализирани бяха данни, получени от изследване на 1662 проби от зъби на лисици (*Vulpes vulpes*) за наличие на биомаркер. Пробите от зъби бяха събрани от общо 480 населени места от 22 области в страната, от зоните с дистрибутирани ваксинални примамки. Данните от проведените изследвания показват, че наличието на тетрациклин в зъби от лисици достига 64,7%.

Ключови думи:

Summary. In 2015 in the Bulgarian districts with oral vaccination against rabies, monitoring of tetracycline and age determination of foxes was carried out. Data obtained from a study of 1662 samples of fox teeth (*Vulpes vulpes*) for the presence of biomarker are analyzed. The tooth samples were collected from a total of 480 settlements in 22 districts in the country, from the places of distribution of the vaccine baits. The data indicated that the rate of prevalence of positive for tetracycline teeth from foxes amounts to 64.7%.

Key words: biomarker tetracycline, oral vaccination, rabies, foxes

Мониторингът за детекция на биомаркер тетрациклин при ваксинирани срещу бяс лисици през 2015 г. беше проведен върху площ от 50 473 km², обхваната двукратно от орална ваксинация, (Програмата за контрол и ерадикация на беса в България през 2015 г.). Изследванията, свързани с проследяване нивото на орален маркер, доказват ефикасността на оралните кампании срещу бяс при лисиците. През първата ваксинационна кампания на 2014 г. нивото на тетрациклин при лисиците беше високо – 80,2%. В същото време средният процент на наличие на тетрациклин през 2014 г. достигна 60% (Илиева и сътр., 2014).

Целта на настоящата публикация е да се представят данните от мониторинга за откриване на тетрациклин в срези от зъби и кости на прицелни животни, произхождащи от зоните с орална ваксинация през 2015 г. в страната, с оглед оценка на ефективността на кампаниите срещу бяс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Оралната ваксинация срещу бяс през 2015 г. беше проведена в 16 области. В Северна България 5 области бяха изцяло обхванати от ваксинация - Видин, Монтана, Враца, Силистра, Добрич, както и части от областите Плевен, В.Търново, Русе и Разград. В Югозападна България бяха включени 7 области – София-град, София-област, Перник, Кюстендил, Благоевград, Смолян и Пазарджик (Програма за контрол и ерадикация на беса в България, 2015).

Пробите от мозъци на прицелните животни бяха предварително изследвани за откриване на вируса на беса чрез флуоресцентен антитялов тест (FAT) (Dean et al., 1996).

Детерминирането на възрастовата категория и детекцията на тетрациклин в референтната лаборатория по бяс е съгласно оперативни про-

цедури, хармонизирани с техниките, изпълнявани в Европейската референтна лаборатория по бяс (EURL, France), (Robardet and Cliquet, 2011; Robardet, et al., 2012; EC and ANSES, 2013, Илиева и сътр., 2014).

За получаване на трансверзални срези в проби от кучешки зъби с мандибуларна кост използвахме микротом-модел Leica SP-1600, Low Speed Saw. Хистологичните срези от зъби и кости бяха изготвяни с диамантен нож с размери $\approx 150 \mu\text{m}$ и съхранявани при $T - 20^\circ\text{C}$ до микроскопирането им. За наблюдение на оралния маркер тетрациклин използвахме флуоресцентен микроскоп Zeiss, модел Axio, увел. 10x/0,25 или увел. 40x/0,75 с филтри DAPI или FITC (Илиева и Петрова, 2011).

Определянето на възрастта се основава на поникване на зъбите, тяхното изтриване и морфологично наблюдение (Harris, 1978). Техниката се състои в преброяване на линиите в цимента в срези от кучешки зъби и наблюдение на дентина, който се увеличава с възрастта.

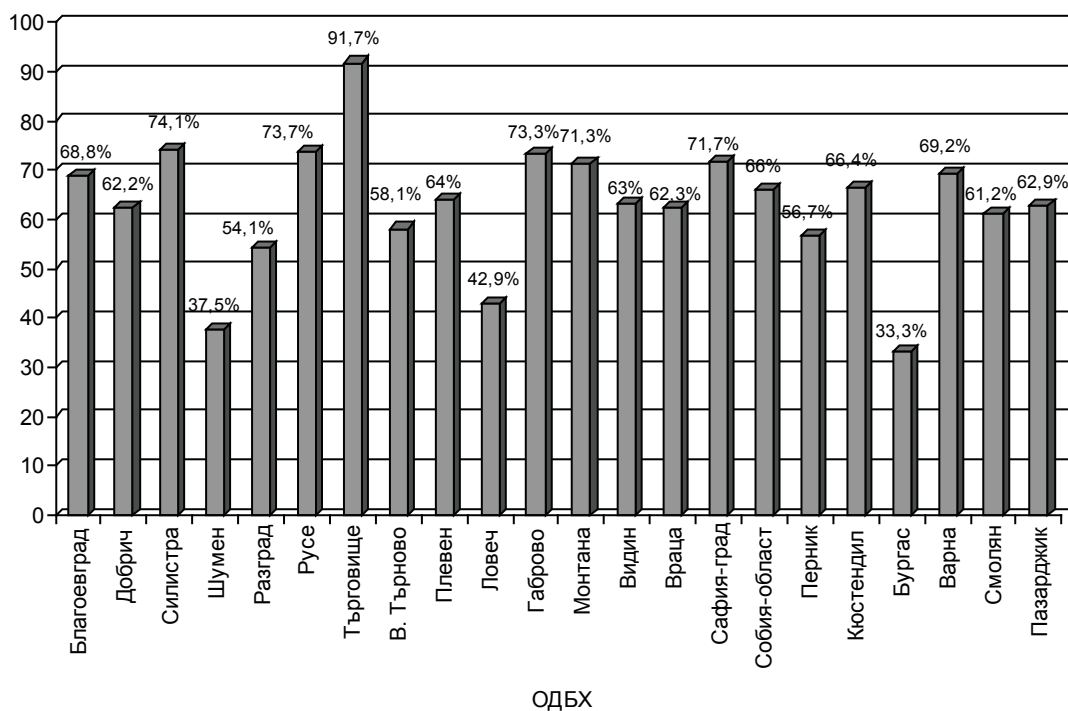
Възрастта се определя чрез категоризиране на дивите животни (лисици и чакали) на млади (J) < 1 г. и стари (A) ≥ 1 г. За наблюдение на хистиосрезите при определяне на възрастовата категория се използва класически светлинен микроскоп, съгласно

оперативна процедура, изпълнявана в лабораторията по бяс от 2012 г. (Илиева и сътр., 2014).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Оралната ваксинация срещу бяс през 2015 г. се проведе на територията на 16 области. Мониторинговите проучвания през първите шест месеца на 2015 г. обхващаха и области с проведена в края на 2014 г. орална ваксинация, така че пробите от отстреляни диви животни произхождаха от 22 ОДБХ (Областни дирекции по безопасност на храните). Отстреляните прицелни животни през 2015 г. бяха 1662 броя, получени от 480 населени места и изследвани за наличие на орален маркер тетрациклин (табл. 1).

От фиг. 1 се вижда, че процентът на тетрациклин за отделни области се движи в различни граници. Най-висок процент (%) на тетрациклин при лисиците беше отбелязан в област Търговище 91,7%. Висок процент на тетрациклин беше регистриран в 9 области – Силистра, Русе, Габрово, София-град, Монтана, Варна, Благоевград, Кюстендил и София-област между 74,1% и 66%. В други 9 области – Плевен, Видин, Пазарджик, Враца, Добрич, Смолян, В. Търново, Перник и



Фиг. 1. Детекция на тетрациклина при лисици от области с орална ваксинация срещу бяс в България – 2015 г.

Таблица 1. Откриване на тетрациклин при диви хищници, ваксинирани срещу бяс в България, 2015 г.

ОДБХ	Изсл.	ЛС/Трос		ЧК/Трос		Населени места/ЛРД, ЛД, ДЛС,ДГС и др.	Бр.
1. Благоевград	98	96	66	2	1	Благоевград, с. Буково, Г. Делчев, с. Гърмен, ЛРД: Голак, Петрич, Разлог, Сокол 1911, Сокол 1920, с. Мосомище, с. Г. Мелна, с. Огняново, с. Сатовча, с. Хаджидимово, с. Брезница, ЛД: Коларово, Самуилово, ДГС Кресна	18
2. Добрич	57	37	23	20	13	Добрич, ЛРД: Каварна, Дончево, Селце, Тервел, Телериг, Българево, ЛРС: Крушари, Хан Телериг 2010, СДЛР Ген. Тошево, ЛД: Бежаново, Василево, Житен, Изворово, Калина, Кардам, Красен, Люляково, Пастир, Преселенци, Росица, Сърнино, Храброво, Шабла	24
3. Силистра	149	81	60	68	45	гр. Дулово, с. Божурово, с. Главиница, с. Долец, с. Д. Ряхово, с. Орешене, с. Търновци, ЛРД: Цар Самуил, Зафирово, Белица, Сокол-1, 2, 3, 4, 5, Ст. Караджа, Туракан, Шуменци	18
4. Шумен	18	16	6	2	-	ЛРД: Белокопитово, Велино, Глиган 2001, Дибиш, Каспичан, Новосел, Шумен-2 В. Преслав, Смядово,	9
5. Разград	80	61	33	19	14	ДЛС Сеслав, ЛД: Дряновец, Желязковец, ЛРД Сокол-Исперих, Кубрат, Разград, Ясреб	7
6. Русе	24	19	14	5	2	гр. Русе, с. Тръстеник, ЛРД: Батиница, Ряхово, Бистренци, Босилковци, Диволово, Дряново, Екзарх Йосиф, Николово, Сливо поле, Ценово	12
7. Търговище	15	12	11	3	1	ДЛС Черни Лом, ЛРД: Буховци, Варадун, Иванча, Омуртаг, Опаня, Буйново, Попово	8
8. В. Търново	64	31	18	33	22	ЛРД: Килифарево, Павликени, Сокол 1910, Царевец, Стражица, Козаревец, Сушица, Сокол, Златарица, Янтра, Г. Дол. Тръмбеш, Хотница, Дрента, Драганово, Леденик, Емен, Балван, Владислав, Минда, Свищов, Ветринци, Габровци, Средни колиби; СЛРД: Златица, Елена	25
9. Плевен	109	50	32	59	32	Бреница, ЛРД: Плевен, Белене, Божурица, Бохот, Бръшляница, Вълбел, Вълчирън, Г. Дъбник, Върбица, Горталово, Гривица, Гулянци, Д. Митрополия, Д. Дъбник, Дебово, Деков, Д. Вит, Др. войвода, Дъбован, Згалево, Кнежа, Комарево, Криводол, Къртобежане, Къшин, Левски, Ленково, Лозница, Милковица, Николаево, Никопол, Новачене, Одръне, Опанец, Петърница, Писарево, Пордим, Беглеж, Глава, Пелишат, Садовец, Санадиново, Славяново, Тотлебен, Тученица, Ч. бряг, Ясен, Гиген, Николаево, Черквица, Левски	52
10. Ловеч	22	7	3	15	6	Ловеч, Троян, Луковит, с. Дерманци, Черни Вит, с. Средец, с. Ъглен, ЛРД: Александрово, Велчево, Катунец, Ломец, Малиново, Микре, Орешак, Белиш, Сопот, Тодоричене	17
11. Габрово	38	30	22	8	3	ЛРД: Агатово, Смирненски, Царева ливада, Гъбене, Поповци, Драгановци, Музга, Кметовци, Гачевци, Габрово, Гургини, с. Соколово	12
12. Монтана	140	136	97	4	3	Монтана, ЛРД: Кр. бара, Бели брег, Бели Мел, Г. Белотинци, Берковица, Бистрилица, Бойчиновци, Брусарци, Буковец, Владимирово, Войници, Вършец, Г. Лука, Гаганица, Г. Дамяново, Говежда, Д. Озирова, Дълги дел, Железна, Каменна Рикса, Лехчево, М. Кутловица, Меляне, Митровци, Свидня, Славотин, Сливовик, Сокол, Бързия	30
13. Видин	133	73	46	60	31	ЛРД: Вълчец, Гъмзово, Буковец, Въртоп, Видин, Брегово, Антимово, Н. село, Чупрене, Новоселци, Симеоново, Златен рог, Водянци, Шипот, Раяновци, Кула, Капитановци, М лъка, Дунавци, Тияновци, Миджур, Водна, Сокол-Белоградчик, Покрайна, Минот, Ружинци, Гайтанци, Гомотарци, Бело поле, Искрен, Грамада, Сл. Бара, Чичил, Динковица, Б. Рада, Цар Петрово, Синаговци	37

14. Враца	82	53	33	29	16	Бяла Слатина, Враца, ЛРД: Вировско, Веслец, Лесура, Оходен, Ракево, Леденика, Търнак, Чирен, Козлудуй, Криводол, Галактил, Бели извор, Боденец, Гложене, Ботуня, Нивянин, Г. Пещене, Веслец, Брусен, Градешница, Власатица, Трачене, Търнава, Баница, Три кладенци, Тишевица, ЛД Оряхово-11	29
15. Сф-гр.	46	46	33	–	–	гр. София, с. Бухово, с. Желява, кв. Челопечене, ЛС-№ 55, Балша, № 56 Нови Искър, Бистрица, Войнеговци, Панчарево, Кремиковци, София-запад, РВС Връбница	12
16. Сф- обл.	124	103	68	21	9	Своге, Сливница, ЛРД: Годеч, Грохотен, Арамлиеца, Е. Пелин, Арабаконак, Гинци, Ихтиман, Краево, Литакново, Пирдоп, Правец, Трудовец, Самоков, Сокол, Сф-запад; юг, Б. вода, Владиславци, Златица, Драгоман, ДУ Еледжик, ДЛС Витиня, ЛС: Искър, Орел, м-т Бивите, Очуша, Асеновлак, Говедарци, Драгоминоци, Дреатин, Клисурса, Челопеч	34
17. Перник	73	67	38	6	5	Перник, Трън, Радомир, кв. Бела вода, с. Бохова, ЛРД: Глоговица, Дивля, Д. Врабча, Ковачевци, Косачи, Кралев дол, Ноевци, Ряхово, Одраница, Садовик, Брезник Църква, Чуковец, Руй, м-т Тръстов дол, с. Г. Мелна, с. Торуковци, с. Неделково, ЛД: Зелениград, Врабча, Ел. дол, Красава, Ломница, Михльовци, ДЛС Вит. Студена	30
18. Кюстендил	173	125	83	48	35	Кюстендил, Баланово, Друмохар, Крайници, Лозно, Яхиново, М. Градище, С. Баня, ЛРД: Виноградец, Коркина, Маламово, Стоб, ЛРД-№№ 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 19, 25, 26, 29, 30, ДЛС Осогово, ДГС Невестино, ЛД Дупница	31
19. Бургас	42	24	8	18	9	ЛРД: Поморие, Ченица, Лебед, М. Търново, Гларус, Балкан, ЛД: Зетьово, Съдиево, Планиница, Средец	10
20. Варна	16	13	9	3	–	ЛРС Балкан, ЛД: Черковна, Дългопол, с. Караманите, Червенци, Метличина, Калоян, Блъсково	8
21. Смолян	67	67	41	–	–	ЛРД: Борино, Бръщен, Буйново, Даведково, Баните, Девен, Доспат, Загражден, Лясково, Могилица, Неделино, Райково, Сокол, Старцево, Турди, Чавдар, ЛРС: Рудозем, Мадан, ДГД Мадан, ДГС Славейно, ДЛС Извора, ОСРД Доспат, Смолян, Златоград	24
22. Пазарджик	92	89	56	3	2	Пазарджик, Белово, с. Ал. Константиново, ЛРС: Батак, Велинград, Пещера, Дебрашица, Виноградец, Г. Вършило, Панагюрище, Драганово, Драгинево, Кръстова, Лесичово, Славовица, Ракитово, Св. Петка, Сърница, Щърково, Малоконаре, ДГС Алабак, Динката, Крали Марко, с. Паталеница, с. Пищигово, с. Сенитово, с. Априлци, с. Бегово, с. Боримечково, с. Добровница, с. Нова махала, с. Огняново, с. Сарая	33
ОБЩО:	1662	1236	800	426	249	ОБЩО:	480

Разград, беше отчетено по-ниско ниво на тетрациклин от 64% до 54,1%. В областите Ловеч, Шумен и Бургас детекцията на тетрациклин беше най-ниска, между 42,9% и 33,3%. Варирането на процента на орален маркер при ваксинирани срещу бяс лисици вероятно се дължи на неравномерно представения брой проби, постъпили за изследване в референтната лаборатория по бяс от отделните области. Друга възможна причина беше, че някои от споменатите по-горе области бяха частично обхванати или напълно изключени

от програмата за ваксинация през 2015 г., като областите Ловеч, Шумен и Бургас.

Може да отбележим, че втората орална кампания през 2014 г. се проведе по-късно през декември. По тази причина някои области, изключени от оралната ваксинация през 2015 г., бяха задължени от Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) да изпращат проби за мониториране през първите 6 месеца на 2015 г., което даде отражение върху отчитането на по-ниско ниво на тетрациклин.

При детерминиране на възрастта в зъбни срези от 1236 лисици беше установено, че 542 (44%) бяха млади (J) ЛС и 694(56%) – стари (A) ЛС. За посочения по-горе период от време броят на обхванатите от ваксинация млади спрямо стари лисици е $\approx 1:1$, виж (табл. 2).

Таблица 2. Определяне на възрастта на лисици през 2015 г.

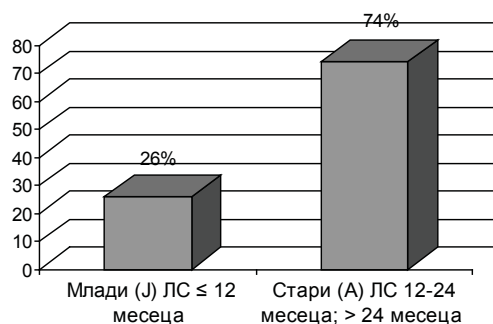
Изследвани лисици (ЛС) във възрастова категория	Възраст ≤ 12 месеца млади J/ЛС	Възраст – 12-24 месеца; > 24 месеца стари A/ЛС
Общо: 1236 бр.	542 J (44%)	694 A (56%)

Данните показаха, че от 1236 лисици, 800 (64,7%) бяха тетрациклин-позитивни. При диференциране по възраст тетрациклин-позитивните лисици бяха 208 (26%) млади (J) ЛС и 592 (74%) стари (A) ЛС (виж фиг. 2). Съотношението на младите тетрациклин-позитивни към старите тетрациклин-позитивни лисици е $\approx 1:3$. Тези данни индират, че ваксиналните примамки не се усвояват еднакво добре, в зависимост от възрастовата категория на лисиците. В повечето случаи при възрастните лисици примамките се приемат и усвояват по-добре, което се потвърждава и от предишни наши наблюдения (Илиева, Д. и сътр., 2014).

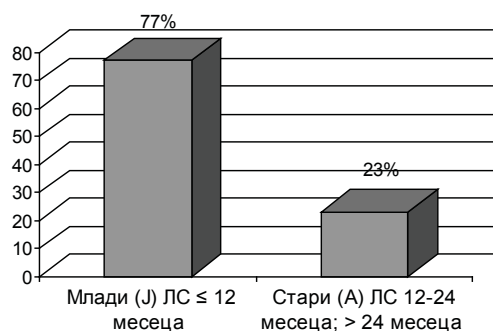
Тетрациклин-негативните лисици без наличие на орален маркер бяха 436 (35,3%), диференцирани като 334 (77%) млади (J) ЛС и 102 (23%) стари (A) ЛС (фиг. 3). Съотношението на младите към старите тетрациклин-негативни лисици е $\approx 3:1$.

През 2015 г. беше анализирана възрастта в срези от зъби на 426 чакала (ЧК), разграничени по възраст на 187 (43%) млади (J) и 242 (57%) стари (A) ЧК, от които 249 чакала бяха тетрациклин-позитивни, установени в 18 зони с проведена орална ваксинация (табл. 3, табл. 1). Процентът на тетрациклин, определен в зъбни срези от чакали, беше 58,4%.

Данните от по-ранни наши наблюдения, както и настоящите изследвания показват, че чакалите консумират ваксиналните примамки с атрактант, но за разлика от лисиците не изграждат имунитет. Много често при тях се срещат по няколко линии на тетрациклин, локализирани около пулпната кухина, дентина или цимента на зъба, в резултат на прием на повече от една ваксинална примамка (фиг. 4).



Фиг. 2. Диференцирани по възраст тетрациклин-позитивни лисици през 2015 г.

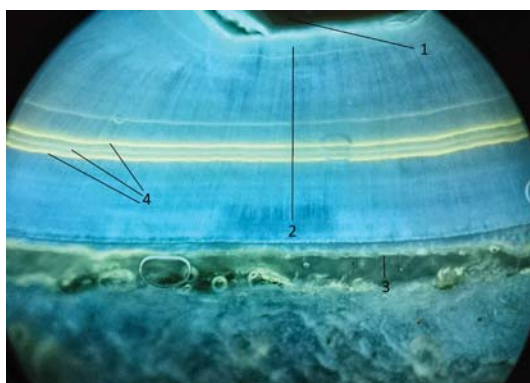


Фиг. 3. Диференцирани по възраст тетрациклин-негативни лисици през 2015 г.

Таблица 3. Определяне възрастта на чакалите през 2015 г.

Изследвани чакали (ЧК) във възрастова категория	Възраст ≤ 12 месеца млади J/ЧК	Възраст – 12-24 месеца; >24 месеца стари A/ЧК
Общо: 426 бр.	184 J (43%)	242 A (57%)

Оралната ваксинация през 2015 г. в България продължи да се изпълнява с първоначално прилаганата у нас ваксина Lysvulpen. В сравнение с предходната година средното ниво на тетрациклин при лисиците се повиши до 64,7%. В сравнителен аспект може да се отбележи, че през 2014 г. Македония провежда орална имунизация срещу бяс при лисици с ваксина Fuschsoral, а Гърция – с Rabigen, и тези страни докладват по-високи проценти на детекция на тетрациклин, между 70% и 90%, както и по-висок имунен статус сред популацията лисици (Robardet и Cliquet, 2014).



Фиг. 4 Биомаркер тетрациклин (Т), депозиран в три последователни линии, локализиран в дентина на зъба на възрастен чакал след прием на повече от една ваксинална примамка - орална ваксинация 2015 г. (сн. НРЛ "БКЕВ" – пулпа – 1; дентин – 2; цимент – 3; линии Т – 4)

Изводи

– В резултат на 7-годишно провеждане на орална ваксинация на лисиците срещу бяс детекцията на тетрациклин възлиза средно на 64,7% през 2015 г.

– Ваксиналните примамки се усвояват по-добре от старите лисици, при съотношение млади към стари тетрациклин-позитивни лисици $\approx 1:3$.

Библиография

1. Илиева, Д. и Р. Петрова. Откриване на биомаркер тетрациклин в зъби при ваксинирани лисици срещу бяс в България. – Екол. и бѣд., **10**, 2011, № 4, 49-54.
2. Илиева, Д. и сътр. Анализ на данните от мониторинга за детекция на биомаркер тетрациклин и детермини-

ране на възрастта при орално ваксинирани срещу бяс лисици в Р.България" 2012-м.06.2014. Доклад на 7-ма научна конференция на БФЦ на EFSA към Центъра за оценка на риска, БАБХ, София, 30 октомври, 2014 г.

3. Програма за ерадикация на бѣса в Р. България. 2014.
4. Dean, D., Abelseh, M., Atanasiu, P. The FAT. – In: Meslin, F. X., Kaplan, H., Koprowski, eds. Laboratory techniques in rabies, 4th ed. Geneva, Switzerland, WHO, 1996, 88-95.
5. EC and ANSES, Demerson, J. M. and Andrieu S. 2013. ILT on tetracycline and age determination on red fox tooth samples, Second session, 2012. EURL for Rabies - 6th
6. Harris, S. Age determination in the Red fox (*Vulpes vulpes*): an evaluation of techniques efficiency as applied to a sample of suburban foxes. – J. Zool. Lond., 184, 1978, 91-117.
7. Robardet, E. and Cliquet, F. Interlaboratory comparison tetracycline determination in tooth samples from field foxes, 2010. Report EU-RL for rabies. 2011.
8. Robardet, E. et al. First European comparison of tetracycline and age determination with red fox teeth following oral rabies vaccination programs. J. Wildlife Dis., **48**, 2012, 858.
9. Robardet, E. et F. Cliquet. Review of the analysis related to rabies diagnosis and follow-up of oral vaccination performed in NRLS in 2014. – EU-RL, 2014, 1-11.

✉ Адрес за кореспонденция:

Доц. д-р Даринка Илиева, д-р
Ръководител на НРЛ

„Бяс и контрол на ефективността от ваксинирането“
Национален диагностичен научноизследователски
ветеринарномедицински институт
бул. "Пенчо Славейков" № 15 А
1606 София

e-mail: emd@mail.orbitel.bg