КОНТРОЛ НА ОРАЛНАТА ВАКСИНАЦИЯ В БЪЛГАРИЯ ЧРЕЗ ДЕТЕКЦИЯ НА ТЕТРАЦИКЛИН И ДЕТЕРМИНИРАНЕ НА ВЪЗРАСТТА В ЗЪБИ ОТ ЛИСИЦИ, ВАКСИНИРАНИ СРЕЩУ БЯС

Д. Илиева и Р. Петрова

Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт – БАБХ, София

CONTROL OF THE ORAL VACCINATION IN BULGARIA BY TETRACYCLINE DETECTION AND AGE DETERMINATION IN TOOTH SAMPLES FROM FOXES VACCINATED AGAINST RABIES

D. Ilieva and R. Petrova

National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute – Bulgarian Food Safety Agency, Sofia

Резюме*. В България през 2012-2014 г. във връзка с контрола на ефективността на оралната ваксинация срещу бяс бяха проведени лабораторни изследвания за детерминиране на възрастта и откриване на биомаркер тетрациклин при лисици. За наличие на биомаркер са анализирани данни, получени от изследване на 1461 проби от зъби на лисици. Пробите от зъби бяха събрани от общо 533 населени места от 22 области в България, свързани с разпространението на ваксиналните примамки. Данните индикират, че степента на превалентност на позитивните за тетрациклин проби от зъби достига средно ниво ≈ 57%.*

Ключови думи*: биомаркер тетрациклин, орална ваксинация, бяс, лисици*

Адрес за кореспонденция*: Доц. д-р Даринка Илиева, двм, 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*

Summary. Laboratory studies were carried out to age determination and detect biomarker tetracycline to monitor the effectiveness of oral vaccination of foxes against rabies in Bulgaria during 2012-2014. Analyzed data obtained from a study of 1461 samples of tooth foxes (Vulpes vulpes) for the presence of biomarker. The tooth samples were collected from total 533 settlements in 22 districts in Bulgaria, related to places of distribution of the vaccine baits. The data indicate, that the rate of prevalence of positive tooth samples for tetracycline to strike an average ≈ 57%.

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

Address for correspondence: Assoc. Prof. Dr. Darinka Ilieva, PhD, Head of NRL "Rabies and Monitoring the Effectiveness of the Vaccination", National Diagnostic ResearchVeterinary Medical Institute, 15A Pencho Slaveykov Blvd., Bg – 1606 Sofia, e-mail: emd@mail.orbitel.bg

Мониторинговите изследвания за детекция на тетрациклин и детерминирането на възрастта при орално имунизирани срещу бяс лисици се провеждат след прием на ваксинални примамки, което е свързано с контрола на ефикасността на оралната ваксинация. Детекцията на тетрациклин в зъби и кости и определянето на възрастта е чрез съвременни техники, широко използвани в редица европейски страни, които прилагат оралната ваксинация като средство за ерадикация на зоонозата.

От 2009 г. в България се изпълнява програма за ограничаване и ликвидиране на беса при лисиците чрез орална имунизация с ваксиналния щам SAD Bern. В резултат на 3 ваксинационни кампании, осъществени

през 2009-2010 г., установеният процент на тетрациклина възлиза на ≈ 12% (Илиева и Петрова, 2011). През следващите няколко години 2012-2014 г. бяха отчетени по-високи нива на биомаркер тетрациклин.

Целта на настоящата публикация е да представим използваните от нас техники за детерминиране на възрастовата категория и откриване на тетрациклин при лисици, приели ваксинални примамки, и оценяване на ефекта от провежданата в страната орална ваксинация срещу бяс.

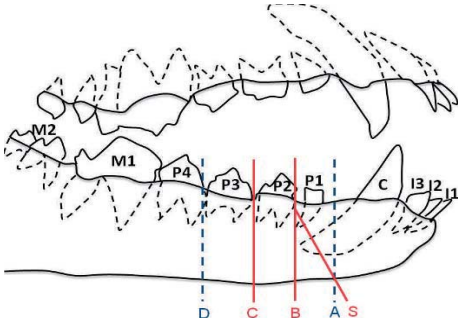
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проби от мозъци на отстреляни лисици бяха предварително изследвани за установяване на вируса на беса чрез флуоресцентен антитялов тест (Dean et al., 1996).

В НРЛ „Бяс и контрол на ефективността от ваксинирането" (БКЕВ) за детерминиране на възрастовата категория и за детекция на тетрациклин се използват адаптирани техники на Европейската референтна лаборатория по бяс (EURL) от 2012 г.

Техниката за откриване на тетрациклин е чрез доказване на антибиотика в растящи кости и зъби на лисици, приели ваксинални примамки, след провеждане на оралните кампании. Пробите от кучешки зъби заедно с мандибуларната кост от лисици бяха взети по време на аутопсия и основно почистени за отстраняване на остатъците от мускулна тъкан. За дезинфекция в процеса на обработка на хистиосрезите употребявахме 1% разтвор на Virkon ® S.

На фиг. 1 е представена схема за правилно получаване на трансверзални срезове. Коректното разделяне е в непрекъснатите линии B и C между премолари P1 и P2 или между премолари P2 и P3. Разделяне на мандибулата в прекъснатата линия D – между премолари P3 и P4, води до получаване на некоректни резултати. Разделянето в линия A между кучешкия зъб C и премолар P1 засяга апекса на зъба, получават се некоректни резултати. Трансверзалният срез трябва да бъде направен по линия S на 2-3 mm от края на кореновия канал.



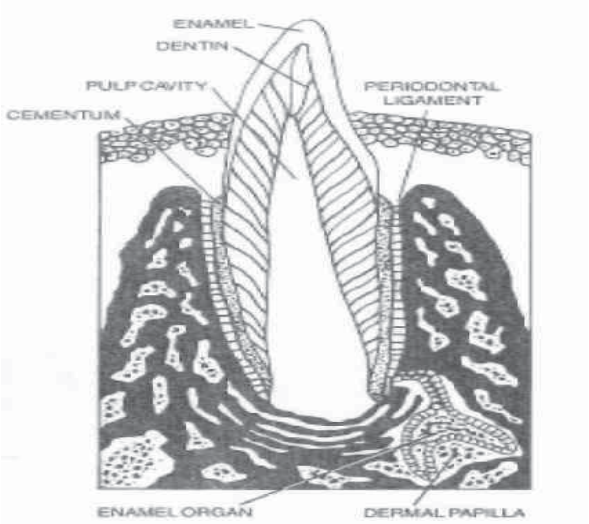
Фиг. 1. Схема за представяне на 1/2 част от мандибула на лисица – разделянето ѝ в линии A, B, C и D. Правилно разделяне на мандибулата (в линии – B и C); коректно оформяне на срезове за детекция на тетрациклин – в линия S

За приготвяне на трансверзални срезове пробата се захваща в микротом, снабден с диамантен нож – модел Leica SP-1600, Low Speed Saw (фиг. 2). Срезовете от зъби и кости се изготвяха с размери ≈ 150 μm и се съхраняваха при T-20° C до микроскопирането им.

Фиг. 2. Микротом Leica SP-1600, за получаване на срезове от зъби и кости и водна струя за охлаждане на диамантения нож

Детекцията на тетрациклин в биологични материали (зъбна тъкан – кучешки зъб; и костна тъкан от мандибула и др.) се визуализира чрез УВ светлина. Препоръчително е от всяка проба да се изготвят по два среза. За наблюдение на оралния маркер използвахме флуоресцентен микроскоп Zeiss, модел Axio, увел. 10x/0,25 или увел. 40x/0,75 с филтри DAPI или FITC (публ. от Илиева и Петрова, 2011).

Определянето на възрастта се основава на поникването на зъбите, тяхното изтриване и морфологичното наблюдение (Harris, 1978). Техниката се състои в преброяване на линиите в цимента и наблюдение на дентина, който се увеличава с възрастта.



Фиг. 3. Различаване на 3 твърди тъкани в зъба; емайл (глеч), дентин и цимент

С техниката за детерминиране на възрастта на прицелните животни се определя възрастовият клас – (0-1); (1-2); (2-3); ≥ 3 години, или възрастовата категория чрез конвенционалното им разделяне на млади (J) < 1 г. лисици и стари (A) ≥ 1 г. лисици в срезове от кучешки зъби. Елементите, които трябва да се охарактеризират при провеждане на изследването, са: размер (диаметър) на пулпната кухина; присъствие или отсъствие на цимент, който е разположен около корена на зъба и е в контакт с лигаментите на зъба, които поддържат зъба в костта. Изследването на емайла на зъба няма никакво отношение за определяне на възрастта на прицелните животни (фиг. 3). За анализиране на срезовете при определяне на възрастта се използва класически светлинен микроскоп.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За периода 2012-2014 г. беше определена възрастовата категория на 1463 отстреляни лисици (ЛС) (табл. 1). Анализът показа следното съотношение: 2012 г. изследвани 455 ЛС, диференцирани на 116 (25,5%) млади (J) ЛС и 339 (74,5%) стари (A) ЛС; 2013 г. – 253 ЛС – разграничени на 99 (39,1%) млади (J) ЛС и 154 (60,9%) стари (A) ЛС, и през 2014 г. – 755 ЛС, от които 290 (38,4%) млади (J) и 465 (61,6%) стари (A) ЛС.

Таблица 1. Определяне на възрастовата категория на лисиците (2012-2014 г.)

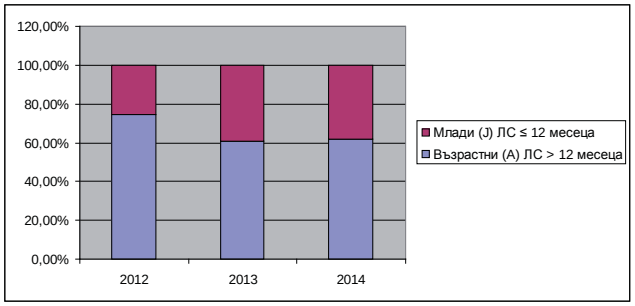
Общ брой изследвани лисици	**Възраст лисици млади J/стари** A – 2012 **г.**	**Възраст лисици млади J/стари** A – 2013 **г.**	**Възраст лисици млади J/стари** A – 2014 **г.**
Общо: 1463 бр.	455 = 116J/339A	253 = 99J + 154A	755 = 290J + 465A

За посочения по-горе период са събрани данни от изследване на възрастта при отстреляни чакали (представени на табл. 2), които обаче не представляват интерес за нас и няма да бъдат анализирани.

Таблица 2. Определяне на възрастовата категория при чакали (2012-2014 г.)

Общ брой изследвани чакали	**Възраст чакали млади J/стари** A – 2012 **г.**	**Възраст чакали млади J/стари** A – 2013 **г.**	**Възраст чакали млади J/стари** A – 2014 **г.**
Общо: 549 бр.	320 = 99J/221A	149 = 71J/78A	80 = 38J/42A

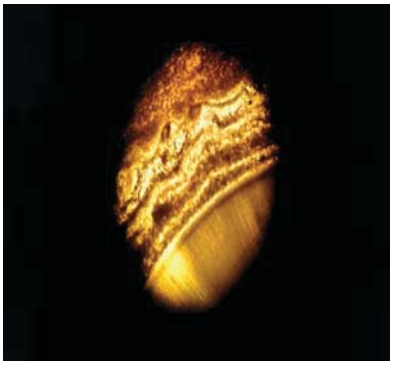
Детерминирането на възрастта на животните позволява да се определи обхванатата от ваксинация популация от възрастни и млади животни. Данните показват, че съотношението между млади (J) ЛС и стари (A) ЛС е приблизително от 1:2 до 1:3 (фиг. 4). Това на практика означава, че при създаване на поколение, всяка година от живота си възрастните животни участват в репродуктивния и еволюционния цикъл на лисичата популация. Подобни пропорции са установени и в изследванията на Englund, 1970.



Фиг. 4. Дерминиране на възрастта при лисици (2012-2014 г.)

В Западна Европа малките на лисиците се раждат през март-април. Двата пола при младите лисици придобиват първата линия в цимента през януари-март следващата година. В Южна Англия и Уелс, по това време младите лисици са напълно готови да създадат поколение (Lloyd, 1980).

За определяне възрастта на лисиците анализирахме диаметъра на пулпната кухина, присъствието на цимент и броя на линиите в него, които отразяват преминалите зими или минималната възраст на животното, както и наблюдение на ширината на дентина. Дентинът е разположен около пулпната кухина и нараства центрипетално. Голяма пулпна кухина се наблюдава само при млади животни. Циментът се депозира около корена на зъба, нараства през целия живот и има центрифугален растеж (Morris, 1972).



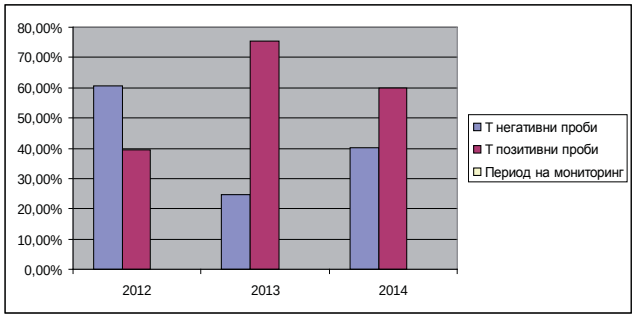
Фиг. 5. Детерминиране на възраст чрез наблюдение със светлинен микроскоп и ясно разграничаване на светли и тъмни кръгове в цимента на зъба при възрастна лисица – сн. НРЛ "БКЕВ"

При изготвяне на трансверзален срез се наблюдават и различават годишните кръгове в цимента, от тъмни линии, образувани през зимата (януари-март всяка година), и светли линии, формирани през лятото при възрастни животни (публикувано от Harris, 1978; Goddard и Reynolds,1993; Roulichova и Andera, 2007). На фиг. 5 е представе-

на наша светлинномикроскопска снимка, на която ясно се виждат светли и тъмни годишни кръгове в цимента на зъба при възрастна лисица.

Заедно с детерминиране на възрастовата категория на прицелните животни в същите срезове определяхме и локализацията на тетрациклина в различни хистологични структури (дентин, цимент и кост) за оценка на ефекта от провежданата в страната орална ваксинация срещу бяс при лисиците. Във връзка с това от 22 области, над чиято територия беше проведена орална ваксинация, бяха събрани и изследвани специфични материали (зъби и кости) от предполагаемо ваксинирани срещу бяс 1461 лисици; съответно 2012 г. – 455 бр. от 214 населени места; 2013 г. 253 бр. от 75 населени места и 2014 г. 753 бр. лисици от 244 населени места.

Данните за детекция на тетрациклин в зъби и кости на лисици, орално имунизирани срещу бяс в България през 2012 г. в 20 области, показват, че нивото на тетрациклин при лисиците се повишава трикратно до 39,4% (фиг. 6), в сравнение с постигнатите резултати през 2009-2011 г. (публ. от Илиева и Петрова, 2011). През 2013 г. процентът на орален маркер нараства близо два пъти в сравнение с 2012 г. и възлиза на 75,5% (фиг. 6). През 2014 г. оралната ваксинация се провежда на територията на 22 области. В 5 области – Бургас, Смолян, Варна, Перник и Благоевград, нивото на оралния маркер е по-ниско, варира от 20 до 42%. За същия период в 10 области – Габрово, Шумен, Разград, Монтана, Враца, Видин, Велико Търново, Плевен, Кюстендил и Силистра, се отчита по-висок процент на тетрациклин от 50 до 86%. В България до м. 06.2014 г. достигнатото ниво на тетрациклин при лисиците е високо – 80,2% (Илиева и сътр., 2014). Данните показват, че детекцията на тетрациклин в края на 2014 г. възлиза на 59,9% и в сравнение с 2013 г. оралният маркер се понижава с 15,6%, (фиг. 6).



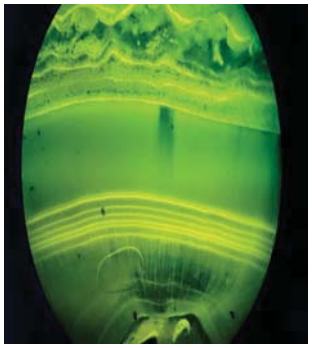
Фиг. 6. Детекция на тетрациклин (2012-2014 г.)

През 2014 г. оралната ваксинация срещу бяс при лисиците за първи път териториално обхваща цялата област Благоевград и две нови области – Смолян и Пазарджик. Това дава отражение върху установения процент на тетрациклин, който в сравнение с 2013 г. е по-нисък, както беше отбелязано по-горе.

За детерминиране на възрастта и за откриване на оралния маркер тетрациклин важно значение има изготвянето на качествени срезове с оптимални размери ≈ 150 μm за ясно разграничаване на отделните структури. При определяне локализацията на тетрациклина в дентин, кост и цимент се препоръчва използването на буфериран глицерин с (pH ≥ 8,5) за по-добър контраст при микроскопиране (Robardet et al., 2012).

През 2012-2014 г. бяха изследвани 1461 проби от лисици (ЛС), от които положителни за антибиотик бяха 821 броя, от тях позитивни за тетрациклин – 666 (A) стари ЛС и 155 (J) млади ЛС. Пробите от лисици, в които липсваше орален маркер, бяха 640 броя. Определен е процентът на тетрациклин-положителните проби, както и локализацията на биомаркера при стари и млади лисици. Данните от анализа за наличие на тетрациклин при старите (A) ЛС показаха следната локализация: в дентин (13,7%), цимент (8,1%), дентин + цимент – (3,8%); кост (10,6%), дентин + кост (14,9%), цимент + кост (13,2%) и дентин + цимент + кост (35,7%). При младите (J) ЛС локализацията е следната: дентин (32%); дентин + кост (57%) и кост (11%). Обобщените данни за 2012-2014 г. индикират „кумулативния процент" на оралния маркер тетрациклин, при който средната стойност възлиза на ≈ 57%.

От анализа на данните, проведен от EU-RL по бяс за 2014 г., е констатирано, че за страните, разположени в Югоизточна Европа, детекцията на тетрациклин се движи между 30 и 60%, което в значителна степен съвпада с постигнатите от нас резултати. В същото време в някои други европейски страни, в които оралната ваксинация е стартирала по-рано, нивото на тетрациклин е по-високо над 60% до 80-90% (Robardet и Cliquet, 2014).



Фиг. 7. Биомаркер тетрациклин, локализиран около пулпната кухина и в дентин, цимент и кост – визуализация с FITC – сн. НРЛ "БКЕВ"

В страната есенната орална кампания закъсня и се проведе през м. 12.2014 г. През първите 3 месеца от началото на 2015 г. след ваксинацията срещу бяс процентът на тетрациклин при лисиците се увеличи и достигна 67%.

При животни, поели ваксинална примамка, депозирането на тетрациклин е в дентина и/или в цимента на зъба и/или в костта, под формата на жълти линии с различен интензитет, наблюдавани с флуоресцентен микроскоп (фиг. 7). При локализация на биомаркера в костта особено при млади животни се касае за последен прием на ваксиналната примамка. Перманентното депозиране на тетрациклин в костите е в зависимост от възрастта на животното и неговия метаболизъм. При млади животни растежът на костите е по-интензивен, пренареждането на тъканите в костта е много по-бързо, а това причинява разсейване и загуба на маркера (Jorch и Anderson, 1980). Откриването на тетрациклин в дентина на зъба е много по-чувствително за лисици под 1,5 години и разрешава фиксиране на периода на прием на примамките. Интерпретацията в този случай е, че при откриване на линия около пулпната кухина депозирането е от последната кампания, при линия далече от пулпната кухина – че биомаркерът е от стара кампания. Откриване на линия далече в дентина означава, че биомаркерът е от последната орална кампания. При линия, ограничена в дентина, се касае за стара кампания (Robardet и Cliquet, 2011; Robardet et al., 2012; EC и ANSES, 2013).

С определянето на някои елементи, като брой и локализация на линиите на тетрациклина, датата на смъртта на животното и възрастта, е възможно да се определи периодът на прием на ваксиналните примамки, дали са от последната или от предишната орална кампания. За интерпретиране на периода задължително трябва да се знаят датата на смъртта на животното и датата на оралната ваксинация.

Изводи:

● Проведени са съвременни мониторингови проучвания в България за периода 2012-2014 г. във връзка с контрола на оралната ваксинация при лисиците.

● За първи път в страната са адаптирани и приложени в лабораторната практика 2 нови теста – за детерминиране на възрастта и за детекция на биомаркер тетрациклин, изключително важни техники за оценка на ефективността на оралните кампании срещу бяс при лисиците.

● Отчита се много добро приемане на ваксиналните примамки при всички възрастови групи лисици и високо ниво на тетрациклин над 60%.

Библиография

1. Илиева, Д. Р. Петрова. Откриване на биомаркер тетрациклин в зъби при ваксинирани лисици срещу бяс в България. – Екол. и бъд., **10**, 2011, №4, 49-54.
2. Илиева, Д. и сътр. Анализ на данните от мониторинга за детекция на биомаркер тетрациклин и детерминиране на възрастта при орално ваксинирани срещу бяс лисици в Р. България" 2012 – м. 06.2014. Доклад на 7-а научна конференция на БФЦ на EFSA към Центъра за оценка на риска, БАБХ, София, 30 октомври, 2014 г.
3. Програма за ерадикация на беса в Р. България (2012, 2013, 2014).
4. Dean, D., Abelseth, 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. Englund, J. Some aspects of reproduction and mortality rates in Swedish foxes (V. Vulpes) 1961-63 and 1966-69. – Viltrevy, 8: 1970,1-82.
6. EC and ANSES, Demerson, J.M. and Andrieu S. ILT on tetracycline and age determination on red fox tooth samples, Second session, 2012. EURL for Rabies – 6th Workshop for Rabies NRLs, 13-14 nov., 2013, Athens,Greece.
7. Goddard, H.N. and Reynolds, J.C. Age determination in the red fox (V.vulpes) from tooth cementum lines. – Gibier Faune Sauvage, **10**, 1993,173-187.
8. Harris, S. Age determination in the Red fox (Vulpes vulpes): an evaluation of technqiues efficiency as applied to a sample of suburban foxes. – J. Zool. Lond.,**184**, 1978,91-117.
9. Llooyd, H.G. The red fox. Batsford, London, 1980,320.
10. Morris, P. A review of mammalian age determination methods. – Mammal rev. **2**, 1972,69-104.
11. Jorch, U.M., Anderson, C. Haverstan bone-remodeling measurements in young beagles. – Am. J. Vet. Res., **41**, 1980,1512-1515.
12. Robardet, E. and Cliquet, F. Interlaboratory comparison tetracycline determination in tooth samples from field foxes, 2010. – Report EU-RL for rabies, 2011.
13. Robardet, E., Demerson, J.M., Andrieu, S., Cliquet, F. First European Ilcomparison of tetracycline and age determination with red fox teeth following oral rabies vaccination programs. – J.of Wildlife Dis, **48**, 2012,858.
14. Robardet, E. and Cliquet, F. Review of the analysis related to rabies diagnosis and follow-up of oral vaccination performed in NRLS in 2013, EU-RL, 2014, 1-11.
15. Roulichova, J., Andera, M. Simple method of age determination in red fox, V. vulpes. – Folia Zoologica, **56**, 2007,440-444.