НАДЗОР НА ЗАБОЛЯВАНЕТО БЯС В БЪЛГАРИЯ

Д. Илиева

Национална референтна лаборатория

„Бяс и контрол на ефективността от ваксинирането"

НДНИВМИ – София

Резюме: През 2011 г. в НРЛ „Бяс и контрол на ефективността от ваксинирането", НДНИВМИ – София, във връзка с надзора на заболяването бяс са изследвани общо 852 диагностични проби, от тях 36 – от съмнителни животни, и 816 проби – от диви животни. Ефективността на оралната ваксинация срещу бяс беше оценена чрез приема на примамки с тест за откриване на биомаркер тетрациклин в зъби на отстреляни животни и серологично с тест ELISA. При изследване на общо 444 кръвни серума от лисици и чакали за установяване титъра на антителата срещу бяс беше доказана серопреваленция при лисиците от порядъка на 18,67% и съответно при чакалите – 1,97%. Оралният маркер тетрациклин при лисици и чакали варира средно в границите на 35%. Данните от двата теста показват, че стойностите на серопреваленция и на тетрациклин са сравнително ниски, което изисква задължително провеждане на две орални кампании ежегодно. Генотипизирането на теренен щам, изолиран от лисица в България през 2011 г., показва, че се касае за класически вирус на беса (RABV, genotype 1). Установена е генетична връзка с перфектна нуклеотидна идентичност (100%) между вирусни изолати от Македония и 1 изолат от България, което изяснява епизоотичната обстановка у нас и подсказва, че има трансгранично преминаване на заразени с бяс животни.

Ключови думи: бяс, орална ваксинация, надзор, генотипизиране, RABV, домашни и диви животни

D. Ilieva. SURVEILLANCE OF RABIES DISEASE IN BULGARIA

Summary: In 2011, in the NRL "Rabies and Monitoring the Effectiveness of the Vaccination", NDRVMI, Sofia, a total of 852 diagnostic samples were investigated in relation to rabies monitoring, as 36 of them were obtained from suspected animals and 816 were obtained from the wildlife. The effectiveness of oral vaccination against rabies was evaluated by the bait uptake tested for detecting the biomarker tetracycline in the teeth of the shot animals and serologically, by the ELISA. The results of the examinations of 444 blood serum samples of foxes and jackals for the anti-rabies antibody levels have revealed seroprevalence of 18.67% and 1.97%, in the foxes and jackals, respectively. The values of the oral tetracycline marker varied on average within 35% for the foxes and jackals. The data from the two tests have shown that the values of the seroprevalence and tetracycline are comparatively low, which mandatorily requires two oral campaigns annually. Genotyping of a field strain isolated from foxes in Bulgaria in 2011 has shown that it refers to the classical rabies virus (RABV, genotype 1). A genetic relationship with a perfect nucleotide identity (100%) between viral isolates from the Republic of Macedonia and 1 isolate from Bulgaria has been found, which clarifies the epizootic situation in the country and suggests that there is a cross-border passage of animals infected with rabies.

Key words: rabies, oral vaccination, monitoring, genotyping, RABV, pet and wild life

Стратегията за надзор на беса в България включва изследване на всички съмнителни животни (домашни и диви), в т.ч. намерени в природата умрели диви животни и отстреляни от ловците лисици и чакали. В България през 2009-2011 г. се изпълнява програма за орален контрол и ерадикация на беса, одобрена и съфинансирана от Европейската комисия (ЕК), която се предвижда да продължи и през следващите години до обявяване на страната ни за свободна от бяс.

Имунизацията на дивите животни срещу бяс и оценяването на ефикасността от нея изискват продължителен мониторинг в зоните с орална ваксинация. В Националната референтна лаборатория (НРЛ) "Бяс и контрол на ефективността от ваксинирането" се извършват диагностични изследвания за бяс и оценка на приема на ваксиналните

примамки чрез серологични тестове и тестове за детекция на орален маркер тетрациклин в зъби на отстреляни диви животни. Данните се докладват ежегодно на Европейската комисия (ЕК).

За нашата страна изключително важно значение има епизоотичната ситуация в страните, с които имаме обща сухоземна граница. В Сърбия през 2010 г. са диагностицирани 104 случая на бяс, в Румъния – 400 (RAB, 2010). От 11 години насам се оказва променена епизоотичната ситуация и в съседна Македония. През м. юли – август 2011 г. в централната част на страната са установени 2 случая на бяс при лисици. През през м. септември 2011 г. вирусът на беса беше доказан при два вълка (Mrenoski et al., 2011). Засега Гърция остава свободна от бяс от 1987 г. (Tasioudi et al., 2010). В европейската и азиатската част на Турция случаите на бяс през 2010 г. са общо 134. От януари до юни 2011 г. в страната има регистрирани 112 случая на бяс при животни (http://web.oie.int.). Ясно е, че опасността от заболяването може да се очаква вече на юг от Стара планина и на югозапад – в пограничните райони.

Целта на настоящата разработка е да се анализира епизоотичната ситуация през 2011 г. и да се оцени ефективността на оралната ваксинация срещу бяс при лисиците.

Материал и методи

През 2011 г. в НРЛ „Бяс и контрол на ефективността от ваксинирането" за диагностициране на вируса на беса бяха изследвани общо 852 броя домашни и диви животни чрез 2 стандартни метода, описани в OIE Terrestrial Manual, 2008: Fluorescent antibody test (FAT) за идентификация на вируса на беса, проведен с антирабичен конюгат на фирма BIO-RAD, France, и Mouse inoculation test (MIT) за потвърждаване на негативния резултат от диагностичните изследвания за бяс.

Във връзка с пасивния надзор на заболяването с метод FAT бяха изследвани общо 36 съмнителни случая от област Бургас – 3 кучета и 1 котка; област Добрич – 1 куче и 1 котка; област Силистра – 1 котка; област Шумен – 1 лисица; област Търговище – 2 кучета; област Плевен – 1 котка и 1 куче; област В. Търново – 2 кучета, област Габрово – 1 лисица; София-област – 1 вълк и 1 овца; София – град – 2 лисици, 2 котки, 1 сърна, 2 кучета и 2 хамстера; област Видин – 1 котка, област Кюстендил – 1 лисица, 1 куче, 1 овца и 1 диво прасе, област Ловеч – 1 лисица, Сливен – 2 кучета и 1 котка, и област Смолян – 1 диво прасе. По-големият брой изследвания през 2011 г. бяха свързани с активния надзор на беса – 816 броя проби от мозъци на отстреляни диви животни (лисици и чакали) от 19 области на страната с проведена орална ваксинация срещу бяс.

За мониторинг на оралната ваксинация използвахме 3 метода: серологичен тест; тест за откриване на биомаркер тетрациклин в зъби на диви животни (лисици и чакали, приели ваксинални примамки) и генотипизиране на вируса на беса.

За установяване на антитела срещу вируса на беса в кръвни серуми от лисици и чакали използвахме метода ELISA (OIE Terrestrial Manual, 2008) и диагностичния кит PLATELIA RABIES II на (BIO-RAD, France).

За откриване на тетрациклина в срези от зъби беше разработена оперативна процедура в НРЛ „Бяс и контрол на ефективността от ваксинирането". Микроскопирането на зъбните срези беше проведено с флуоресцентен микроскоп Axio, Zeiss, с източник на УВ светлина и емисия 517 nm.

През 2011 г. с метод FAT идентифицирахме 1 положителната проба от мозък на лисица, отстреляна в област Кюстендил. Генотипизирането на вирусния изолат беше проведено в Европейската референтна лаборатория по бяс, Франция.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Данните от изследване, проведено с метод FAT, на 36 съмнителни домашни и диви животни – 14 кучета, 8 котки, 6 лисици, 1 вълк, 2 диви прасета, 1 сърна, 2 хамстера и 2 овце, постъпили през 2011 г. в лабораторията по бяс от 15 области на страната, показаха, че те не са заразени с вируса на беса (таблица 1). В епидемиологично отношение през 2011 г., 10 от тези съмнителни животни са ухапали и одраскали 18 лица, без да е регистрирана инфекция от бяс при тях.

Отстреляните диви животни във връзка с мониторинга на оралната ваксинация срещу бяс бяха общо 816 броя – 457 лисици и 359 чакала. При активния надзор на заболяването на 06.04.2011 г. беше открит един положителен случай на бяс при лисица от област Кюстендил (таблица 1).

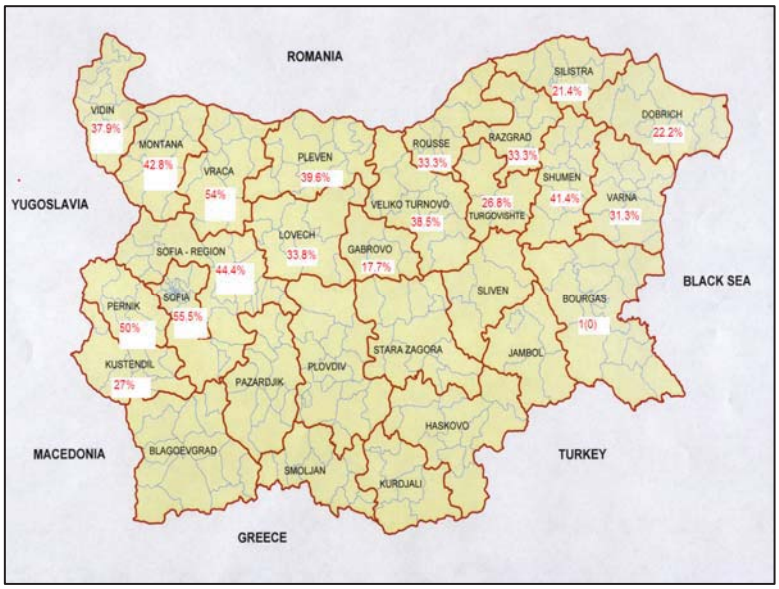
Таблица 1. Изследвани мозъчни проби по надзора с FAT за установяване на вируса на беса през 2011 г.

ОДБХ	Активен надзор		ОДБХ	Пасивен надзор	
	Негативни	Позитивни		Негативни	Позитивни
Варна	64	–	Варна	-	–
Бургас	4	–	Бургас	1	–
Добрич	45	–	Добрич	2	–
Силистра	14	–	Силистра	1	–
Русе	29	–	Русе	–	–
Шумен	99	–	Шумен	1	–
Разград	78	–	Разград	–	–
Търговище	67	–	Търговище	2	–
Плевен	101	–	Плевен	2	–
В.Търново	12	–	В. Търново	2	–
Габрово	45	–	Габрово	1	–
Сф-област	21	–	Сф.-област	2	–
Сф-град	7	–	Сф.-град	9	–
Монтана	7	–	Монтана	–	–
Видин	59	–	Видин	1	–
Перник	21	–	Перник	–	–
Кюстендил	39	1	Кюстендил	4	–
Враца	38	–	Враца	–	–
Ловеч	68	–	Ловеч	1	–
			Сливен	3	–
			Смолян	1	–
Общо:	815	1	Общо:	36	

Имунологичният ефект от оралната ваксинация на дивите животни беше проследен с метода ELISA. Изследвани бяха общо 444 кръвни проби от 241 лисици и 203 чакала. Общият брой на негативните кръвни серуми без антитела беше 395. Кръвните серуми с антитела срещу вируса на беса бяха общо 49 броя, установени при 45 лисици и 4 чакала. Всички серумни проби със стойности ≥ 0,5 UI/ml бяха считани за поло-

жителни. Процентът на серопреваленция при лисиците беше 18,67% и съответно при чакалите – 1,97%. Изследваните серумни проби от лисици и чакали са приблизително еднакви. Въпреки установяването на нисък процент на серопреваленция се забелязва тенденцията, че ваксиналният щам SAD Bern, използван за орална ваксинация срещу бяс при дивите животни, е по-имуногенен за лисици, отколкото за чакали, тъй като процентът на откритите серопозитивни чакали с антитела срещу вируса на беса е изключително нисък. Процентът на серопреваленция при лисиците не е висок, което се дължи на факта, че през 2009 г. има проведени две орални кампании – 1 през пролетта и 1 през есента. През 2010-2011 г. бяха осъществени по 1 орална кампания срещу бяс – през пролетта. С общо 4 ваксинални кампании за периода 2009-2011 г. не е възможно популацията от лисици да стане имунна и да се регистрира по-голям брой на животни с постваксинални антитела срещу вируса на беса. Като цяло процентът на серопреваленция за периода от време 2009-2011 г. при лисици не се повишава повече от 18-19%. За да се ограничи потенциалната циркулация на вируса при дивите животни, отчетената сероконверсия трябва да се повиши 3-4 пъти от установената досега.

Резултатите от изследване на 815 броя зъбни срези – 456 от лисици и 359 от чакали, показват, че зъбите без биомаркер са 532 броя. Положителните зъбни срези с тетрациклин бяха 283 броя. Оралният маркер беше доказан при 141 броя зъби от лисици и при 142 броя зъби от чакали. Процентът на тетрациклин при лисиците беше от порядъка на 30,92, а при чакалите – 39,55%. Средният процент на откриване на тетрациклин при дивите животни варира около 35. Данните през 2009-2010 г. показват, че откритият орален маркер е 12% (Илиева и Петрова, 2011). През 2011 г. нивото на тетрациклина двукратно е повишено, но все още е значително ниско, за да се каже, че оралната ваксинация е силно ефективна у нас. При анализиране на резултатите се вижда, че в София-град, и област Враца откритият трациклин е 50-60%; в 4 области – Монтана, София-област, Шумен и Перник – 40-50%; в 7 области – Видин, Плевен, Русе, Разград, Ловеч, Варна и В. Търново – 30-40%; в 4 области – Кюстендил, Търговище, Силистра и Добрич – 20-30%; в област Габрово детекцията на терациклин е < 20%. Област Бургас е изпратила 1 проба, която е с негативен резултат за биомаркер (фиг. 1). От резултатите се вижда, че само в някои области процентът на тетрациклин достига до 50-60. За високо ниво на прием на ваксинални примамки може да се говори в случай че тетрациклинът достигне 70-80% при всички изследвани животни (Task force rabies subgroup meeting, Plovdiv, 2011). За повишаване силата на оралната ваксинация Световната здравна организация (WHO) препоръчва прилагането на рекомбинантна ваксина–VRG, или високопасажна ваксина SAG-2 с две успешни мутации в 333 кодон на аргинина и загуба на вирусната патогенност (Laffay et al., 1994).



Фиг. 1. Резултати от откриване на биомаркер тетрациклин в 19 области на ОДБХ

Най-идеалният случай след ваксинация е в прицелните животни да се установят постваксинални антитела срещу бяс, а в зъбите им да се открие тетрациклин. Съвпадение на положителните резултати по двата метода – ELISA и откриване на биомаркер тетрациклин, беше доказано при 22 лисици и при 2 чакала (таблица 2). Използваният кит PLATELIA RABIES II осигурява нисък процент на откриваемост на антитела срещу бяс в кръвните проби. Това е една от причините за несъответствие между положителните резултати от тетрациклиновия биомаркер и резултатите от антителния отговор при ваксинирани животни (Report CRL for rabies serology, 2009). Трябва да се има предвид, че тестът ELISA представлява алтернативен серологичен тест за изследване напрежението на имунитета при отстреляни лисици. В повечето случаи доставените серуми са с ниско качество поради факта, че се получават post-mortem и в това отношение кит PLATELIATM RABIES II се явява подходящ за масов скрининг на теренни серумни проби от такива животни. След имунизация на прицелните животни с орална ваксина срещу бяс в някои случаи хранителната примамка с атрактант и тетрациклин се консумира от хищника, а алуминиевият блистер с ваксината изпада на земята, без да е приет. В тези случаи при изследване на зъбите ще се открива тетрациклин, а в кръвните серуми ще липсват антитела. Не е за пренебрегване фактът, че значителна част от дивите животни са силно инвазирани с различни екто- и ендопаразити. Начинът на живот и съставът на храната при лисиците предполага смесени или единични инвазии – Alaria alata и др. (Радев и сътр., 2010). Голяма част от хищниците са със съпътстващи инфекциозни заболявания – пастьорелоза, стрептокова инфекция, туларемия и др. (Иванова и Илиева, 2010), които могат да доведат до състояние на имуносупресия. Такива животни със сигурност няма да изградят качествен имунитет срещу вируса на беса и при тях ще се открива тетрациклин, но ще липсват постваксинални антитела.

Таблица 2. Установени положителни резултати от мониторинга на оралната ваксинация срещу бяс при диви животни през 2011 г. в България с 2 теста ELISA и тетрациклин

Област	**Нас. място**	**Проба/и при лисици**	**ELISA**	**Тетрациклин**
Кюстендил	с. Осогово	3	+	+
	с. Друмохар	1	+	+
	гр. Кюстендил	1	+	+
Габрово	с. Донино	1	+	+
Разград	с. Липник	1	+	+
Монтана	с. Безденица	1	+	+
Ловеч	с. Гумощник	2	+	+
	с. Смочан	1	+	+
В. Търново	с. Габровци	1	+	+
Шумен	с. Велино	1	+	+
	с. Овчарово	1	+	+
	с. Писарево	1	+	+
	с. Могила	1	+	+
Търговище	с. Г. Хубавка	1	+	+
	с. З. Морава	1	+	+
	с. Великденче	1	+	+
Видин	с. Извор махала	1	+	+
	с. Лагошевци	1	+	+
Перник	с. Байкалско	1	+	+
Общо:		22	+	+
Област	Нас. място	Проба/и при чакали	ELISA	Тетрациклин
Търговище	гр. Кардам	1	+	+
Видин	с. Капитановци	1	+	+
Общо:		2		

Генетичният анализ на нуклеотидните секвенции на вирусния изолат през 2011 г. от област Кюстендил, с. Црешново, показа, че се касае за класически вирус на беса (RABV, genotype 1). Перфектна нуклеотидна идентичност (100%) беше доказана при същата положителна проба от лисица, спомената по-горе, и 3 положителни проби (1 лисица и 2 вълка), идентифицирани по-рано през 2011 г. в Р. Македония, всички локализирани в граничната 14-километрова зона на македоно-българската граница (Kirandjiski, T. et al., 2011; Picard-Meyer, et al. 2012). Съпътстващите генетични изследвания и филогенетичната връзка между вирусните изолати от Македония и изолата от България значително изясняват епизоотичната обстановка у нас и подсказват, че има трансгранично преминаване на заразени с бяс животни от страните, с които граничим, в случая от съседна Македония към страната ни. В Сърбия оралната ваксинация срещу бяс по дивите животни стартира от 2010 г., а в Македония – от 2011 г. Във връзка с новосъздалата се епизоотична ситуация беше проведена тристранна среща в София през м. декември 2011 г. с участието на Македония, Гърция и България, на която беше взето решение през 2012 г. граничните зони на тези страни да бъдат включени в орална ваксинация срещу бяс.

В България бесът е силватичен, с основен разпространител червената лисица (Vulpes vulpes). За създаване на имунна популация от диви животни оралната ваксинация срещу бяс трябва да продължи да се изпълнява и през следващите години до ограничаване и изкореняване на заболяването на територията на цялата страна.

Изводи:

• През 2011 г. е констатиран един положителен случай на бяс при лисица в Югозападна България, област Кюстендил, в резултат на трансгранично преминаване от Р. Македония.

• За подобряване на епизоотичната ситуация по отношение на заболяването бяс в югозападната част на страната ни е необходимо сътрудничество със съседните държави – Македония, Сърбия и Гърция, и извършване на орална ваксинация в пограничните райони с изграждане на буферни зони за ликвидиране на беса в страната.

• Имунизацията срещу бяс на лисиците в България трябва да продължи през следващите години с 2 кампании през пролетта и есента, за да се повиши ефектът от оралната ваксинация.

Библиография

1. Иванова, С. и Д. Илиева. Серологичен скрининг за туларемия сред популацията от лисици. – Екология и бъдеще, 2010, № 3, 27-29.
2. Илиева, Д. и Р. Петрова. Откриване на биомаркер тетрациклин в зъби при ваксинирани лисици срещу бяс в България. – Екология и бъдеще, 2011, № 4, 49-54.
3. Радев, В. и др. Нови случаи на инвазирани с Alaria Alata лисици в България. Сборник от доклади от научна конференция, ЛТУ, София, 2010, 309-315.
4. Kirandjiski, T. et al. First reported cases ot rabies in the Republic of Macedonia. – Vet. Rec. publ. online, March 12, 2012.
5. Laffay et al. Vaccination against rabies: construction and characterization of SAG-2, a double avirulent derivative of SAD Bern. – Vaccine, **12**, 1994, 317-320.
6. Mrenoski, S. et al. Update of Rabies situation in Republic of Macedonia 2010-2011.
7. Picard-Meyer, E. et al. Molecular characterisation of rabies virus strains in the Republic of Macedonia. – Arch. Virol. published online 23 Sep. 2012.
8. Rabies. OIE Terrestrial Manual, 2008, 306-307.
9. Rabies Bull. Eur., 2010.
10. Report CRL for rabies serology: Triennial meeting 18 november 2009.
11. Tasioudi, K. et al. Rabies activities in Greece, 2010.
12. Task force rabies subgroup meeting Plovdiv, Bulgaria, 15-16 March 2011.

Постъпила – 29.10.2012 г.

✉ *Адрес за кореспонденция:*
Гл. ас. Д-р Даринка Илиева, двм
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