

OCENA USPEŠNOSTI CEPLJENJA LISIC PROTI STEKLINI

Peter Hostnik*, Toplak Ivan, Danijela Rihtarič, Gorazd Vengušt

National veterinary institute, Veterinary faculty, Ljubljana, Slovenia

peter.hostnik@vf.uni-lj.si

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano izvaja sistematično izkoreninjanje stekline na odročju Slovenije z metodo peroralnega cepljenja lisic že od leta 1995. Uspešnost izvajanja cepljenja lisic lahko ocenimo na podlagi laboratorijskih preiskav lisic, uplenjenih na cepnem področju. Rezultati določanje prisotnosti virusa stekline, določanje biomarkerja in starosti lisic v kostnini in določanje specifičnih protiteles proti virusu stekline so jasen pokazatelj dolgoletne uspešnosti programa peroralnega cepljenja. Z letali odvzete vabe je odvzelo od 72,1% lisic starejših od 6 mesecev v letu 2011 do 85,5% lisic v letu 2015. Predstavljeni rezultati potrjujejo, da program peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji teče uspešno. Zanj je značilno, da se odstotek cepljenih lisic znotraj populacije iz leta v leto povečuje.

Ključne besede: steklina; eradikacija; biomarker

Uvod

Vse do uvedbe obveznega cepljenja psov proti steklini v letu 1947, pa do uspešnega izkoreninjenja urbane stekline v letu 1953, je bila steklina v Sloveniji več stoletij resen zdravstveni problem. V letu 1973 se je ta bolezen ponovno pojavila in se razširila med populacijo lisic. Razvoj atenuiranih cepiv, primernih za peroralno uporabo je prinesel nove možnosti izkoreninjanja stekline, razširjene v populaciji divjih živali (1). Peroralno cepljenje divjih mesojedih živali, v našem prostoru prvenstveno lisic, je edini in že v mnogih državah preverjen in učinkovit način izkoreninjanja stekline. V Sloveniji smo prvo cepljenje lisic izvedli v letu 1988, s sistematičnim polaganjem vab dvakrat letno pa smo pričeli v letu 1995. V letu 1995 smo ugotovili 1.082 primerov steklih živali, število pa je v naslednjih letih drastično upadlo in se več let zaradi mejnega področja z Republiko Hrvaško, kjer se ni izvajalo cepljenje lisic, ohranjalo na letni ravni od 5 do 80 primerov. Zadnji primer stekle živali smo v Sloveniji potrdili v letu 2014. Vabe z ustreznim cepivom polagajo z letali, načrt pa predvideva da se na 1 km² položi od 20 do 25 vab (2). Poznamo različne načine nadzora uspešnosti cepljenja lisic. Računalniško podprt nadzor ob izmetu vabe iz letala evidentira točno lokacijo izmeta vabe, kar omogoča administrativno spremljanje opravljenega dela in izračun gostote položenih vab na posameznem področju. Ker je gostota populacije tarčnih živali in živalskih vrst, ki jim vabe niso namenjene, jih pa ravno tako odvezemajo (npr. divji prašiči), različna na posameznih področjih, lahko njihovo gostoto zgolj ocenimo, zato je potrebna še biološka kontrola uspešnosti cepljenja. Ovoj cepiva vsebuje tudi antibiotik tetraciklin, ki je v tem primeru v funkciji biomarkerja. Pri uplenjeni lisici, ki je odvzela vabo s cepivom lahko v kostnini dokažemo prisotnost tetraciklina, kar nam služi kot indikator odvzema vabe. Lisica, ki odvzame vabo, se z virusom v cepivu imunizira. Prisotnost specifičnih protiteles v krvi uplenjene lisice nam pove, da je žival zaščitena pred morebitno okužbo z virusom stekline. Za ovrednotenje končnih rezultatov, in s tem postavitev točne

ocene zaščite populacije lisic na določenem področju, je potrebno uplenjenim živalim tudi določiti starost na osnovi nalaganja cementa na zobno korenino. V skladu s priporočili OIE je potrebno na cepnem področju letno testirati vsaj 4 lisice /100km².

Material in metode

Od leta 1998 dalje uporabljamo za cepljenje lisic proti steklini cepivo Fuchsoral®, ki vsebuje virusni sev SAD B19. V obdobju od 2011 do 2015 smo na višino titra virusa v cepivu Fuchsoral testirali 14 različnih serij cepiva, ki so bile uporabljene v Sloveniji. Titer virusa smo določali v 10 vzorcih cepiva posamezne serije. Pripravili smo 10-kratne razredčine cepiva v osmih ponovitvah. Razredčine smo prenesli v mikroploščo in dodali suspenzijo celične linije BHK21. Rezultate smo čitali po 48 urni inkubaciji na podlagi predhodno opravljenega testa direktnega imunofluorescenčnega testa. Titer smo izračunali po Spearman-Kärberjevi metodi (3).

V obdobju 2011 - 2015 smo na prisotnost biomarkerja testirali 3.556 (povprečno 711 vzorcev/leto) vzorcev lisic, uplenjenih v obdobju od januarja do konca oktobra. V ta namen smo lisicam iz spodnje čeljusti previdno odstranili spodnji podočnik (caninus) z delom kostnine in s prečnim rezom oddaljenim 0,3 cm od apeksa korenine pripravili cca 200 µm debelo zobno rezino s počasno žago IsoMet (Buehler, Nemčija). Rezino smo na prisotnost tetraciklina preiskali pod fluorescenčnim mikroskopom. Mesta, kamor se naloži tetraciklin, smo iskali v obzobni kostnini in na meji med cementom in dentinom. Biomarker fluorescira intenzivno rumeno barvo.

Pri določanju starosti lisice uporabljamo rezino, ki je bila pripravljena za določanje biomarkerja. Metoda določanja starosti sloni na opazovanju sekundarnega cementa, ki se nalaga ob korenino zoba skozi celo življenje v obliki svetlih in temnih prstanov. V zimskem obdobju se cement obarva temno, v poletnem pa je linija svetlejša. Preko leta se ustvari ena temna linija, ki nam omogoča intervalno določanje starosti živali preko celega njenega življenja. Starost določamo s pomočjo stereo mikroskopa.

V 2011 - 2015 smo tudi testirali 3.415 vzorcev lisic na prisotnost protiteles proti virusu stekline. Protitelesa smo določali v vzorcih krvi ali vzorcih torakalne tekočine, ki smo jih odvzeli ob sekciji. Prisotnost protiteles smo določali s komercialnim testom ELISA (BioPro, Češka). Rezultate smo vrednotili na podlagi primerjave optične gostote substrata dobljenega pri testiranju vzorca in pozitivne in negativne kontrole testa.

V istem obdobju smo tudi skupno testirali 1.0703 vzorcev divjih in domačih živali. Vzorce možganskega tkiva živali smo na prisotnost antigena virusa stekline testirali s testom direktne imunofluorescence. Uporabili smo komercialni konjugat firme BioRad. Vse pozitivne primere smo dodatno testirali z molekularno metodo RT-PCR, njihovim produktom pa smo določili nukleotidna zaporedja na osnovi katerih smo določali morebitno prisotnost cepnega virusa pri steklih živalih.

Rezultati

V vseh serijah cepiva Fuchsoral® smo potrdili prisotnost virusa stekline. Vse serije so vsebovale titer višji od 10^{6,0} FFU/ml. Povprečni titer virusa v cepivu je znašal 10^{6,6} FFU/ml.

Prisotnost tetraciklinov smo v obravnavanem obdobju dokazali pri 2.780 (78,2%) lisicah. Najnižji odstotek (76,6%) pozitivnih lisic na tetraciklin smo ugotovili v letu 2011, najvišji (85,5%) pa pri lisicah uplenjenih v letu 2015. Na prisotnost protiteles proti virusu stekline smo testirali 3.415 vzorcev krvi ali torakalne tekočine. V 2.143 (62,8%) vzorcih smo dokazali

prisotnost specifičnih protiteles. V obravnavanem obdobju smo prisotnost virusa stekline dokazali pri 4 živalih, od tega pri treh lisicah in kuni. Z metodo določitve nukleotidnega zaporedja na genu za protein N smo določili, da izolata virusa stekline pri dveh lisicah, uplenjeni v letu 2012, in izolatu kune, uplenjene v letu 2014, pripadajo cepnemu virusu, klonu SAD B19. Z določanjem starosti smo pri lisicah ugotovili povezavo med starostjo lisic in prisotnostjo tetraciklina. Običajno so bile brez prisotnosti tetraciklina mlajše lisice, ki jih spomladansko cepljenje ni doseglo, uplenjene pa so bile pred jesenskim cepljenjem.

Razprava

Organizacija in izvedba peroralnega cepljenja lisic v Sloveniji poteka v skladu s priporočili Evropske komisije. Uspešnost ORV je določena na podlagi rezultatov aktivnega in pasivnega monitoringa prisotnosti virusa stekline v populaciji divjih živali, določanju stopnje odvzema vab in odstotka lisic, zaščitene pred infekcijo z virusom stekline. Pojavljanje stekline je takoj po začetku uvedbe cepljenja med divjimi živalmi drastično upadlo in se vse do leta 2011, ko je tudi sosednja Hrvaška pričela z vsesplošnim cepljenjem divjadi, ohranjalo v manjšem številu le na obmejnem področju. Stopnja odvzema vab presega 80% populacije, kar zagotavlja zaustavitev kroženja virusa znotraj populacije. Diskrepanco med odstotkom odvzema vab in odstotkom živali, pri katerih smo potrdili prisotnost specifičnih protiteles pripisujemo slabi kakovosti vzorcev, ki so lahko odvzeti tudi več dni po uplenitvi lisice. Naši rezultati so primerljivi z rezultati iz drugih držav. V našem prostoru se lisice rojevajo spomladi, v marcu in aprilu. Pomladansko polaganje vab se izvaja v mesecu maju, kar pomeni da v tistem letu rojene lisice ne pridejo v stik s cepivom, zaščitene pa so 3 do 5 mesecev preko maternalnih protiteles. Na osnovi tega lahko sklepamo, da je v obdobju od avgusta pa do jesenskega polaganja vab vsaj 2/3 lisičje populacije nezaščitene. Naši podatki o zaščiti zajemajo populacijo izven tega obdobja, ker uspešnost cepljenja spremljamo od oktobra pa do aprila naslednje leto. V obravnavanem obdobju smo v treh primerih ugotovili pri stekli živali cepni virus. Zadnje raziskave celotnega virusnega genoma v cepivih kažejo, da nekatera cepiva vsebujejo mešanico različnih virusnih sevov (4) Šele čas bo pokazal, kakšen vpliv na čas izkoreninjenja bolezni na nekem območju ima cepni virus, ki je sicer v redkih primerih patogen tudi za ciljne živali. Veliko držav je programe cepljenja uspešno zaključilo z varnejšim cepnim virusom SAG2. Bi morali tudi mi razmišljati v tej smeri?

Reference

1. Baer GM, Abelseth MK, Debbie JG. Oral vaccination of foxes against rabies. *Am J Epidemiol.* 1971; 93 (6):487-90. PMID:4935086.
2. Anonyme. The oral vaccination of foxes against rabies: SCAHAW Report, European commission. pp 2-55.
3. Aubert MFA: Methods for the calculation of titres. In *Laboratory techniques in rabies*. Edt by Meslin F. WHO, Genova (1996), pp 291-300.
4. Cliquet F, Picard-Meyer E, Mojzis M, et al. In-Depth Characterization of Live Vaccines Used in Europe for Oral Rabies Vaccination of Wildlife. *PLoS One.* 2015; 10(10).

Evaluation on the efficiency of vaccination of foxes against rabies

The eradication program of rabies in foxes using oral vaccination (ORV) method on whole territory of Slovenia has been carried out by Ministry for agriculture, forestry and food since 1995. The efficiency of ORV is validated on the basis of laboratory testing of foxes from vaccinated area. Results of virus detection, detection of biomarker and ages of foxes' yaws and specific antibodies against rabies virus are needed for good evaluation of ORV programme. Baits dropped by aircrafts were eaten by 72,1 % of foxes in 2011 and by 85,5 % foxes in 2015, respectively. Presented results confirmed that ORV of foxes in Slovenia against rabies was successful and characterized by steady increase of vaccine baits uptake and immunization of animals.

Key words: rabies; eradication; biomarker