EFSA КОНТАКТЕН ЦЕНТЪР
БЪЛГАРИЯ

РАЗПРОСТРАНЕНИЕ, БИОЛОГИЧНИ И ЕПИЗООТОЛОГИЧНИ ОСОБЕНОСТИ НА ВИСОКОПАТОГЕННАТА ИНФЛУЕНЦА ПО ПТИЦИТЕ ОТ СУБТИП H5N8 В ЕВРОПА И БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2016/2017г.

ас. д-р Георги Стоименов[1], доц. д-р Габриела Гужгулова[2], проф. Георги Георгиев[3], проф. Бойко Ликов[3] и доц. Янко Иванов[3]

[1]Факултет по ветеринарна медицина, Лесотехнически университет, София, България

[2]НРЛ по „Инфлуенца А и Нюкасълска болест по птиците“ – НДИВМИ/БАБХ

[3] Център за оценка на риска по хранителната верига – Министерство на земеделието, храните и горите

1. Въведение

Инфлуенца А вирусните инфекции са изключително опасни и значими заболявания по много видове животни и хора. Техният зоонозен потенциал винаги е представлявал сериозен интерес за учените и не веднъж е всявал страх сред населението. **Смята се, че дивите птици и особено водоплаващите са естествен резервоар на вирусите на Инфлуенца А и основен фактор за тяхното разпространение.** Те са и основният източник на всички субтипове птичи инфлуенца вируси (AIV), но комплексът от взаимодействия между тези различни гостоприемникови популации и вируси все още не е получил адекватно внимание. Наличието на щамове на високо патогенна инфлуенца А (HPAI) при дивите птици, която не вякога води до фатална, смъртоносна инфекция при тях дава възможност за пренасянето на тези вируси на далечни разтояния чрез миграцията. Това засилва необходимостта от много по-подробно проучване на естествената еволюционна история на инфлуенца А вирусите навсякъде по света.

Три групи фактори оказват влияние за възникването и развитието на инфекциозния процес: свойствата на инфекциозния причинител, свойствата и състоянието на макроорганизма и условията на средата, в която се осъществява взаимодействието. Тази проста концепция има важно значение не само за изучаването на епизоотологията на заболяването при дивите птици, но също така и за установяването на потенциалните въздействия, асоциирани с въвеждането на HPAI вируси в популации от диви птици.

Близостта на дивите птици до тези от промишленото птицевъдство, крие потенциална заплаха за тях и развитие на заболяване с непредвидими икономически последици и загуби.

България заема особено географско положение в Европа и на Балканите. Известно е, че над територията ѝ се пресичат два основни пътя за миграция на диви птици, които са част от Черноморско - Средиземноморския миграционен път. Това са *Via Pontica* **и** *Via Aristoteles*. По-важният (Via Pontica) е един от главните маршрути за миграция на птиците от Западен Сибир (Азия) и Северна и Източна Европа към Африка. Той минава през територията на България — над Странджа и по бреговата ивица на Черно море и влажните зони свързани с него. Основните пунктове, където мигриращите птици спират да почиват, а някои остават и да гнездят **са: Поморийското**

езеро, Атанасовското езеро, Мандренското езеро и Бургаското езеро (Вая). Друга голяма спирка за мигриращите птици е местността Болата- на север от нос Калиакра. Освен Via Pontica, през България минава и още една въздушна магистрала на прелетните птици-Via Aristoteles (Задбалканският път) през долината на река Струма, Софийското поле и Искърското дефиле. Птиците мигрират през есента на юг и се връщат на следващата пролет. Пътищата на миграцията и начина на съществуване на популациите са закрепени еволюционно.

Птицевъдството е един от традиционните животновъдни отрасли за България. В почти всички области на страната има изградени индустриални птицевъдни обекти. В същото време се наблюдават и множество ферми тип "заден двор", в които нивото на биосигурност е ниско. Освен това делът на България от пазара на угоен патешки дроб в Европа е над 20%, а е известно, че сред патиците мюлари циркулират голям брой ниско патогенни инфлуенца А вируси, което съпоставимо с начина на отглеждане на тези птици и мерките за биосигурност във фермите в които се отглеждат крие сериозна опасност от интродуцирането на вируси от диви птици и развитието на епизоотия. Съвкупността от всичко това и преминаването през България на големи популации от диви птици, чрез двата основни миграционни пътя, създава потенциялни условия за появата на огнища на инфлуенца А по птиците. Стриктното спазване на мерките за биосигурност в промишлените птицевъдни стопанства и повишаването на бдителността на ветеринарните служби и стопаните във фермите от типа "заден двор" са необходими изисквания за ефективен контрол на болестта.

2. Класификация и типизиране на изолатите

2.1. *Класификация*

Заболяването се причинява от вируси принадлежащи към семейство: *Orthomyxoviridae*, род *Influenzavirus A*. В семейството са включени още 4 рода: *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Isavirus*, *Thogotovirus. Вирусите от род Influenzavirus A* се свързват с епидемии при голяма част от птиците и бозайниците. *Influenza B вирусите,* инфектират само човека и причиняват по-леко заболяване от тип А. Тип С нямат клинично значение, рядко предизвикват клинични симптоми при хора и свине. *Семейството получава името си от гръцкото „orthos"- правилен и „туха"*, което преведено на български означа*ва „слуз"*.

Номенклатурата на изолатите на AIV *е утвърдена от* WHO *през 1980* г. Названието на щама трябва да съдържа: 1) серотипа; 2) вида или типа на съответния гостоприемник; 3) географският регион или държавата; 4) номер на щама; 5) година на изолиране.

2.2. *Типизиране на изолатите*

В род Influenzavirus A са класифицирани много серологично различни варианти. До сега са известни 18 субтипа HA и 11 субтипа NA. Субтиповете могат да се отдиференцират по разликите в техните HA и NA (De Jong, 2000). Последните два субтипа H17N10 и H18N11 са изолирани от прилепи, съответно в Гватемала и Перу (Tong et al., 2012; Tong et al., 2013).

Инфлуенца субтиповете се разделят на високопатогенни (HPAI), и нископатогенни (LPAI). На първият международен симпозиум за птича инфлуенца през 1981 г., е решено да се изостави наименованието „чума по птиците» и да се дефинират високопатогенните щамове на базата на тяхната способност да предизвикват не по-малко от 75% смъртност, за не повече от 10 дни, при най-малко 8 чувствителни 4-8-седмични пилета, заразени венозно, или при инокулацията на десет възприемчиви 6 седмични пилета интра венозния патогенен индекс е >1.2 (OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.3.4, 2015).

Тези определения са формулирани преди повече от десет години, във време когато разбирането на молекулярната биология за патогенността на AI е в начален стадий. Определенията са насочени към вируси, които са открито вирулентни при *in vivo* тестовете, а не към тези, които имат потенциал да се превърнат във вирулентни. Натрупващите се доказателства, че HPAI вируси възникват от LPAI H5 или H7 вируси, налагат подмяна на определението. В Австралия през 1976 г. е имало доказателства за ограничено разпространение на заболяването, преди мутацията да се състои (Westbury, 1998; Perdue et al., 1998). В Пенсилвания през 1983 г., (Webster & Kawaoka, 1988), Мексико през 1993/94 (Campos-Lopes et al.,1996; Villarreal & Flores, 1998) и Италия 1999/2000 (Capua et al., 2000) има обширни огнища на LPAI в продължение на значителен период от време, преди появата на HPAI. В този случай, колкото по-дълго е присъствието и по-голямо е разпространението на LPAI вируси сред домашните птици толкова по-голяма е вероятността да се появят високопатогенни такива. Следователно би било разумно да се ограничи разпространението и на-

личието на LPAI вируси от субтип H5 и H7 при домашни птици, за да се намали вероятността от настъпване на мутация и разпространение на заболяването.

Именно поради тази причина се налага подмяна на дефиницията за HPAI, която в днешно време **според определението**, включ**ено в директива 92/40/EEC** е:

„Високопатогенна птича инфлуенца е инфекция при птиците, причинена от Инфлуенца А вирус, който има интравенозен патогенен индекс при 6-седмични пилета >1.2 или всяка инфекция с инфлуенца А вируси от субтипове H5 или H7, които имат нуклеотидна последователност, показваща наличието на кратни основни аминокиселини (аргинин-R и лизин-K) на мястото на разцепването на хемаглутинина.„

Ако аминокиселинният мотив на мястото на разцепването на хемаглутинина е представен от множество основни аминокиселини, то изследваният изолат се счита за HPAI независимо, че за инокулираните пилета е бил с по-ниска патогенност. В природата обаче повечето птичи грипни вируси са LPAI и обикновено се асоциират със слабо клинично проявено заболяване при птици от кокошевия тип. Те обаче са напълно авирулентни за патици. Веднага следва да се отбележи, че LPAI вируси имат потенциала да еволюират до HPAI и това е добре документирано в литературата (Webster & Kawaoka, 1988). Някои от птичите инфлуенца А вируси, принадлежащи към субтипове H5 и H7, като H5N1, H7N7 и H7N3 не винаги следва да се асоциират с HPAI за птици. Вирулентността е щамов, фенотипов белег – за това има N5N1 вируси, които са HPAI за кокошевия вид и в същото време и N5N1, които са слабо патогенни (LPAI) за тях (Георгиев и съавт., 2012).

2.3. *Морфологични параметри и структура на генома*

Грипните вируси са със сферична форма, въпреки че може да има и плеоморфни, вариращи от 80 до 120 nm в диаметър (Lamb & Krug 2001; Hay, 1998). Важна тяхна особеност е сегментираният геном. Той се състои от линейна, едноверижна РНК с (-) полярност (Cheung & Poon, 2007; Neumann et al., 2004). Броят на сегментите при родовете *Influenzavirus A* и *Influenzavirus B* е осем. Размерът, както и нуклеотидната последователност на всеки са различни, но при всички присъства общ консервативен участък от 11-13 нуклеотида в 3¢ края и такъв от 14-15 в 5¢ края, комплементарни на тези в 3¢ края. Тези

участъци играят роля на промотори за разпознаване от вирусната транскриптаза. Всяка молекула нуклеинова киселина е свързана с NP и с по едно копие на компонентите на транскриптазо-полимеразния комплекс-PB1, PB2 и PA, образувайки с тях отделен нуклеокапсид. Нуклеокапсидите контактуват с M-1 протеиновия слой посредством нековалентни взаимодействия.

Осемте сегменти на едноверижната РНК кодират 15 протеина (Sonnberg et al., 2013). Например, сегмент 4 кодира HA; сегмент 5-NP и сегмент 6-NA протеин. Сегмент 7-кодира два протеина, M1 и M2, с припокриващи се рамки за транслация. По същия начин, сегмент 8 кодира не структурните протеини NS1 и NS2, отново с насложени четящи рамки. Протеини PB1-F2 (Krumbholz et al., 2011), PB1-N40 (Wise et al., 2009), PA-X (Jagger et al., 2012) PA-N155 и PA-N182 (Muramoto et al., 2013), са наскоро открити и са с не изяснена функция. Общата дължина на генома е 10 000–14 000 нуклеотида. РНК сегментите са опаковани във вирусната сърцевина. Тя е заобиколена от липидна мембрана, или «envelope», придобита от плазмената мембрана на заразената гостоприемникова клетка, по време на процеса пъпкуване.

3. Антигенна вариабилност на Инфлуенца А вирусите

Инфлуенчните вируси имат големи популации и кратки срокове на възпроизводство. Пълният цикъл на тяхната репликация в клетката-гостоприемник често отнема само няколко часа, а като резултат се получават хиляди нови вируси. В действителност, процентът на грешки на вирусната РНК-полимераза е 1000 пъти по-голям от вероятността за грешка на човешката ДНК полимераза. Трите характеристики допринасящи за бързото развитие на тези вируси са: големите популации, кратките срокове за производство и високият процент на мутация. Всяка мутация, която позволява на вируса да избегне имунната система на гостоприемника, се запазва в следващото поколение. Повърхностните протеини на вирусите са тези, върху които е съсредоточена имунната система на гостоприемника. Хемаглутининът е специфичен протеин на вируса, който се разпознава, атакува и запаметява като нежелан нашественик от имунната система. Това е изгодно за вируса, тъй като той може да намери множество гостоприемници, които никога не са били изложени на неговия вид хемаглутинин, или да промени своя хемаглутинин, така че имунната система да не може да го идентифицира. Вариабилността е от жизнено значение за вируса и тя се гарантира по различни начини. Двата най-

важни механизма в това отношение са мутациите, особено антигенен дрифт и антигенен шифт.

3.1. *Антигенен дрифт*

Вирусната РНК се реплицира в клетката гостоприемник. РНК-полимеразата има относително висок процент на грешки в сравнение с ДНК-полимеразата, която не разполага с коректорска дейност, като други полимерази. Така се променя средно един нуклеотид на вирусно поколение. Многобройните точкови мутации водят до минимални промени в генома, което може да доведе до промяна на последователността на аминокиселините. Този процес на малки, почти ежегодно настъпващи кумулативни антигенни промени във вируса, се нарича антигенен дрифт. Колкото дълго време се задържи субтипът в човешката или животинската популация, толкова време продължават и процесите на дрифт (Voeten, 2000). Структурата на повърхностните протеини и по специално на НА може да се промени минимално, в следствие на което имунната система не може да идентифицира новите вируси и взаимодействието антиген-антитяло става нефункционално.

3.2. *Антигенен шифт*

Внезапното появяване на антигенно различен щам на инфлуенчният вирус се нарича антигенен шифт. Освен чрез него различни щамове на инфлуенца А вирусите могат да се появят и чрез други механизми:

1. Директен трансфер на вируса към друг вид. Пример за това е 1918 г. когато щамът H1N1 „испанския грип“ е навлязъл сред човешката популация, в резултат на което е настъпила най-опустошителна пандемия известна досега.

2. Генетична реасортация. Освен чрез мутации вирусите със сегментиран геном се променят генетично и чрез реасортация. Последният термин означава замяна на един или повече геномни сегменти между два свързани вируса, които инфектират клетка гостоприемник в едно и също време. През фазата на събиране на вирусите може да се получи грешка в комбинацията от сегменти, тъй като системата не може да направи разграничение, кой РНК-сегмент от кой субтип вирус произтича. От време на време, чрез реасортацията се разменят геномни сегменти, кодиращи вирусните повърхностни протеини, хемаглутинин и невраминидаза. По този начин вирусът постига нов антигенен модел. Това е често срещано явление и е катализатор за пандемии сред хората. Прасетата играят много важна роля във формирането на новите грипни вируси. Те служат като

«генетичен съд», тъй като са предразположени към инфекции и с вируса на инфлуенцата по птиците, и с човешките грипни вируси. По този начин новите вирусни варианти могат да се предадат от прасета на хора. Освен тези забележителни промени се случват и по-малко очевидни реасортации и мутации на сегменти, които са отговорни за образуването на различни генотипове в рамките на един субтип. Така за сега са известни девет различни генотипове на вируса на птичия грип H5N1 (Li et al., 2004), които се различават по своята степен на патогенност.

От 1996г. в продължение на 18 години до 2014г., HPAI H5N1 претърпява значителна еволюция и генерира много различни подтипове, дължащи се на антигенен дрейф в H5 гена на HA (Sonnberg et al., 2013). За формирането на класификацията на H5, се използва като база A/Goose/Guangdong/96(H5N1). При създаването на тази класификация през 2008г., H5 вирусите са групирани в 20 генетични подтипа, наречени клейдове -"claids". До 2014г. са описани 24 такива подтипа, означени с 0, 1, 2, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.3.1, 2.1.3.2, 2.2, 2.2.1, 2.2.1.1, 2.3.1, 2.3.2.1, 2.3.3, 2.3.4, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, 2012). От тях основно циркулират вируси от подтипове 1, 2.1.3, 2.2, 2.2.1, 2.3.2, 2.3.4 и 7. Появилите се нови вируси през 2015г. HPAI H5N8 в Източна Азия и Европа, HPAI H5N8 и HPAI H5N2 в Северна Америка, и HPAI H5N6 в Източна и Югоизточна Азия, налагат промяна в класификацията и появата на този нов подтип - 2.3.4.4.

4. Епизоотологични и екологични особености на инфлуенца А вирусите, циркулиращи по диви птици

4.1. *Гостоприемници*

Широк кръг гостоприемници могат да бъдат инфектирани с AIVs: свине, хора, различни видове птици, коне, китове, риби, тигри, кучета, котки и др. Клиничната картина варира в зависимост от вирулентността на съответния вирус и от гостоприемника. За епидемиите сред човешкото население са отговорни вирусите от род Инфлуенца А и в по-малка степен-Инфлуенца В. Сезонният грип при човека се причинява от вируси, които съдържат HA от типове H1, H2 и H3, но от хора са изолирани също така и птичи инфлуенчни вируси. Те включват субтип H5 (H5N1), субтипове H7 (H7N2, H7N3, H7N7, H7N9), H9 (H9N2) и H10 (H10N7). Водоплаващите и сухоземните птици са установени като резервоар на почти всички грипни вируси.

При различните видове животни има определени субтипове, които могат да предизвикат заболяване. При свинете това са H1 и H3, при конете това са H3 и H7, при кучета – H3, при котки – H5, при порове – H10, при китове H13 и H1, при камилите – H1 (Crawford, 2005; Yamnikova, 1993).

4.2. *Предаване и разпространение*

Патиците и другите водоплаващи птици са естествения резервоар на вирусите на Инфлуенца А (Hinshaw et al., 1980; Suss et al., 1994). При водоплаващите птици вирусът атакува предимно респираторния и гастроинтестиналния тракт (Slemons & Easterday, 1975), понякога без клинични признаци, протичайки субклинично. Така някои патици могат да съхранят и предадат вируса повече от 30 дни след заразяването. Преживяемостта на инфлуенца вирусите във вода зависи от вирусния щам, солеността, киселинността и температурата на водата. Вирусите от азиатски произход HPAI H5N1 са по-слабо адаптирани към водните условия, отколкото LPAI вируси, изолирани от водоплаващи птици (Brown et al., 2007). Има данни, че инфлуенца вирусите се запазват в замръзналите езерни води през зимата, когато патиците не са там и когато те се завърнат от юг през пролетта се заразяват (Hinshaw et al., 1980; Ito et al., 1995; Okazaki et al., 2000). От резервоарните гостоприемници при определени обстоятелства, вирусът преминава в другите видове животни и човека, като се характеризира с висока вирулентност и разпространяемост, а понякога и с висока смъртност. Естествено срещащи се инфекции с AIV са отчетени при свободно живеещи птици представители на 105 вида от 26 семейства (Olsen et al., 2006; Stallknecht & Shane, 1988). Изолации са съобщени на всички континенти с изключение на Антарктида, от където има само серологични доказателства (Austin & Webster, 1993; Morgan & Westbury, 1981). Повечето видове са свързани с водните местообитания, главно това са представители на разредите *Anseriformes* (патици, гъски и лебеди) и *Charadriiformes* (чайки, рибарки и дъждосвирцоподобни). Във видовете в рамките на семейство *Anatidae* от разред *Anseriformes* са отчетени повечето изолации на AIVs. Докладвани са 47 (Olsen et al., 2006) от 158 вида патици и гъски по целия свят. Най-много са изолациите на AIV от зеленоглави патици (*Anas platyrhynchos*). Най-често изолираните вируси от тях са от субтипове H3, H4 и H6 (Krauss et al., 2004), въпреки че H11 също е често срещан сред популациите от патици (Ottis &

Bachman, 1983; Slemons et al., 1991). Субтиповете H5, H7 и H9 са с ниска превалентност при патици (Stallknecht & Shane, 1988; Krauss et al., 2004), но тези вирусни субтипове могат да бъдат по-често изолирани при специфични местоположения и периоди от време (Hanson et al., 2003; Munster at al., 2005). Субтипът H8 е изключително рядко срещан при патици, с по-малко от 10 изолации през последните 20 години в Северна Америка (Stallknecht et al., 1990; Krauss et al., 2004; Hanson et al., 2005). В рамките на разред *Chardriiformes* са изолирани AIVs от видове в три семейства *(Scolopacidae, Laridae и Alcidae)*. В най-голяма степен от разред *Scolopacidae* е засегнат един вид-Камъкообръщач *(Arenaria interprets)* (Stallknecht, 1998). Изолации също са съобщени от седем допълнителни птичи разреди, които включват видове, често свързвани с водните местообитания *(Ciconiiformes, Gaviiformes, Gruiformes, Pelecaniformes, Podicipediformes, and Procellariiformes)*. Въпреки, че са осъществени изолации на вируси от птици включени в разредите *Columbiformes*, *Piciformes* и *Passseriformes*, повечето опити за такива са неуспешни (Hinshaw & Webster, 1982; Deibel et al., 1985; Nettles et al., 1985). Тези групи понастоящем не се считат за важни резервоари на AIVs. Сред мигриращите птици разпространението на вирусите може да варира значително в зависимост от сезона и мястото, защото отделните видове и популациите на вида показват различни миграционни поведения, местообитания, предпочитания и географски обхвати (Kawaoka et al., 1988; Sharp et al., 1993; Deibel et al., 1985). Като общ модел, разпространението на AIVs при патици е с пик в края на лятото и началото на есента. Това е свързано с премиграционния етап (Hinshaw et al., 1985) и ясно е отчетено при зеленоглавите патици в Северна Америка. Моделът се дължи на повишената концентрация от възприемчиви видове и люпенето им, което води до повишаване риска от заразяване с 30 % при новоизлюпените в този момент. Миграциите са широко разпространена стратегия при водолюбивите птици, заемащи сезонни местообитания. В зависимост от продължителността и разстоянието, което изминават птиците, миграциите могат условно да бъдат разделени на интерконтинентални и кратки локални придвижвания. При прекръстосването на миграционните пътища множество птици се оказват на едно и също място по едно и също време, споделяйки области за чифтосване, хранене и почивка. В резултат на близкия контакт по между си инфектираните могат да предадат вируса на не заразени птици, а те пък от своя страна да го разпространят на нови територии. Разбирането на екологията на гостоприемниците би

спомогнало за разплитане на начините на предаването на вирусите и географското им разпространение. Ясно е че при миграцията птиците не могат да прелетят цялото разстояние между местата за гнездене и за обитание без да спират и да почиват, дори обратното те прекарват повече време в хранене и подготовка за самото летене. Всичко това е предпоставка за събирането на едно място на много видове птици. Това им осигурява тесен контакт по между си. Такива места са от ключово значение за предаване на нископатогенните вируси на инфлуенца А (Орешкова и съавт., 2006). Нископатогенните щамове на инфлуенца А засягат респираторния и чревния тракт на заразените птици, но се изхвърлят в най-голяма концентрация с фекалиите (Webster et al., 1978; Hinshaw et al., 1980). Фекално-оралният път на заразяване е основен начин за разпространение на вируса сред дивите птици.

От фактите посочени по горе ясно се очертава, че мигриращите водоплаващи са основните виновници за разпространението на инфлуенца А вирусите на дълги разстояния. Свързаните с водните местообитания птици и по-точно патиците, доказано могат да бъдат гостоприемници на два и повече инфлуенца А вируса едновременно (Sharp et al., 1997), което е сериозна предпоставка за реасортация (Hinshaw et al., 1980). По този начин те участват в създаването на особено опасни за домашните кокошеви птици вируси. Те обаче проявяват слаба патогенност към самите водоплаващи и свързани с водните местообитания птици.

Контактът, предаването и разпространението на вируса между дивите и домашните птици може да се осъществи на общи места, които се използват от дивите водолюбиви птици за хранене или почивка. Това са водни басейни (патици, гмурци, газещи) или пък ниви (гъски). При храненето и движението на птиците, предаването на инфекцията се осъществява по фекално-орален път. Човекът също може да изиграе важна роля в разпространението на заболяването по косвен път. Залепналите по дрехите или обувките заразени изпражнения могат лесно да бъдат внесени в домашния двор при птиците, дори ако те са затворени и се спазват мерките за безопасност. Убиването на птици, при лов и даването на части от тях на домашните птици или свине, също крие съществен риск за заразяване. Нелегалното внасяне от чужбина на живи птици е друг рисков фактор (Орешкова и съавт., 2006).

4.3. *Устойчивост на химически и физически фактори. Дезинфекция*

Инфлуенца вирусите са вируси с обвивка и са устойчиви при ниска температура, соленост в околната среда и подходящо pH. При проведените с тях експерименти е установено, че нископатогенните вируси оцеляват в пептонна вода при 4^0C, 30^0C или 37^0C за 35 дни. В дестилирана вода при 28^0C издържат повече от 100 дни и 200 дни при 17^0C. Някои щамове живеят 4 седмици при 18^0C. Много изследователи успяват да изолират вируси от повърхностни езерни води (Khalenkov et al., 2008). Нископатогенният H7N2 се установява във фекалиите на болни птици в продължение на 32 дни на 15-20^0C и 20 дни при 28-30^0C (Brown, 2007). Zarkov (2006) установява, че инфлуенца А вирусите изгубват инфекциозността си след по-малко от 24h при pH 9.34, колкото е алкалността на водата в язовир Овчарица в България. Дезинфектантите натриев хипохлорид, 70% етанол, окислителни агенти (Виркон С), формалин, киселини, четвъртични амониеви съединения (Лизол) инактивират Инфлуенца А вирусите и могат да се използват за дезинфекция. Вирусите могат да бъдат инактивирани и чрез загряване на 56^0C за 60 min, а така също и след йонизиращо лъчение или ниско pH.

5. Клинични симптоми и патологоанатомични промени

Когато говорим за инфлуенца А по птиците трудно може да се каже колко е инкубационният ѝ период. Той зависи от патогенността на вируса и физиологичното състояние на гостоприемника. Обикновенно се приема, че е около 4-5 дни, но при отделните птици варира от няколко часа до 7 дни.

Инфекцията причинява широк спектър от симптоми - от леко неразположение до тежка епидемия и бърза смърт. По-късно тази форма е наречена високопатогенна инфлуенца (HPAI). Тя се характеризира с внезапна атака, тежко заболяване, бърза смърт и смъртност около 100% (Хаджиев, 2000). Общите признаци на HPAI са: слаб до значителен спад в яйценосенето, повишена смъртност, затруднено дишане, усилена лакримация, синуит, едем на главата, цианоза по кожата и диария.

Нископатогенните вируси (LPAI) предизвикват по-леко протичащо заболяване, изразяващо се предимно с леки респираторни симптоми, депресия и проблеми с яйценосенето. Видът на

гостоприемника, възрастта на птицата, имунният статус и условията на околната среда също допринасят за тежестта на заболяването (Capua et al., 2000a).

При диви патици заболяването протича обикновено безсимптомно, но при някои щамове се наблюдава клиника и смърт. Експериментално заразени с HPAI *Aix sponsa* проявяват следните клинични признаци: отпадналост, некоординирани движения, разрошена перушина, ритмично разширяване и стесняване на зеницата, тремор, припадъци и смърт. Други видове патици като зеленоглавата –*Anas platyrhynchos*, шилоопашата патица –*Anas acuta,* зимно бърне –*Anas crecca* не проявяват симптоми (Chen, 2006).

При експериментално заразени (интравенозно, трахеално и орално) с LPAI H6N2 28 дневни патета Zarkov & Dinev, 2012, наблюдават забавяне на разтежа и дефекти при оформянето на перушината. Те установили и следните патохистологични промени: конгестия и хеморагии асоциирани с некротични зони в сърце, тимус, черен дроб, панкреас, бъбреци, бял дроб, като най-тежки били лезиите при интравенозно заразени патета между 7-я и 14-я ден след инокулацията.

Гълъби (*Columbia livia).* Те са по-устойчиви на инфекции с AIV в сравнение с много други птичи видове (Boon et al., 2007). Само с висока експериментална доза се развиват неврологични признаци в около 20% от заразените птици с високопатогенни щамове (H5N1). Вирусът преференциално се реплицира в мозъчната тъкан на гълъбите (Klopfleisch et al., 2006), като екскрецията му е в много ниска концентрация и продължава кратко (Werner et al., 2007). Чувствителността на гълъбите към H5N1 вируси зависи от начина на експозицията, щама на вируса и характеристиките на гостоприемника, така че може да се очаква промяна в чувствителността при различни експериментални или природни условия (Brown et al., 2009).

Пъдпъдъците (*Coturnix Spp.).* Те привличат вниманието на учените, тъй като вътрешните генни сегменти на HPAI H5N1 вируси, изолирани в Хонг Конг през 1997 г. са сходни с тези намерени при пъдпъдък (A/Quail/HK/G1/97(H9N2)) (Guan et al., 1999). Пъдпъдъците също са сред първите птичи видове, при които е доказано, че по-големи количества от вируса се отделят чрез дихателните пътища, отколкото чрез изпражненията (Liu et al., 2003). Огнища на HPAI H5N1 при този вид птици са докладвани в няколко страни, включително Индонезия и Виетнам. Експериментално пъдпъдъците са силно податливи на

заразяване с H5N1 HPAI вируси (Perkins & Swayne, 2001).

Чайки *(Larus spp.)*. При тях се наблюдава нервна симптоматика, мътни очи, слабост, разрошена перушина, некоординирани движения и тортиколис. В повечето случаи заболяването завършва със смърт. Патохистологични изменения. Петехиални кръвоизливи по вентрикулите, върха на сърцето, главния мозък и панкреаса (Brown, 2006).

Врабчета (*Passer spp.)*. При експериментално заразяване с H5N1 се наблюдава лека депресия, без смъртност (Perkins, 2003).

Скорци (*Sturnus spp.)*. Последните експериментални проучвания с азиатски H5N1 вируси показват, че скорците *(Sturnus vulgaris)* могат да бъдат заразени за кратък период от време с тези вируси, но не всички заразени птици умират (Boon et al., 2007). Не е известно дали те могат да пренасят или отделят достатъчно количество от вируса, за да заразяват други птици.

Лебеди *(Cygnus spp.)*. Най-често се наблюдават нервни симптоми и диария, като изходът от заболяването в повечето случаи е летален (Teifke, 2007).

Патологоанатомични изменения. Пулмонална конгестия и оток, хеморагични некрози по панкреаса, субепикардиални хеморагии, оток на трахеалната лигавица, дуоденума и панкреса, дегенерация на миокарда с фокални некрози, акутен ентерит, конгестия на далака, лимфоцитен менингоенцефалит (Nagy, 2007).

Канарчета *(Serinus canarius Linnaeus)*. При този вид птици заболяването протича с конюнктивит, апатия, анорексия и висок процент смъртност (Kaleta, 2005).

Токачки **(***Numida Meleagris)* експериментално заразени с HPAI H5N1 вируси умират в рамките на пет дни (Perkins & Swayne, 2001). Също при експериментална инфекция, но със LPAI H6N2 Ivanov et al., (2015), не установяват клинични признаци на заболяване. Патохистологичните промени разкриват атрофия на тимуса, слезката и клоакалната бурза. Централните и периферните лимфоидни тъкани показват лимфопролиферативни или дегенеративни изменение, които се увеличават по интензивност от 14 до 21 ден след заразяването (Dimitrov et al., 2016).

От началото на месец ноември 2014 г. в четири европейски страни (Германия, Великобритания, Холандия и Италия) бяха установени девет епизоотични огнища на високопатогенна инфлуенца (HPAIV) A

(H5N8) при домашни и диви птици. Появата на този вирус и неговото разпространение показва известна прилика с предходната епидемия с HPAIV A (H5N1) през 2005- 2010 г. Сравненията между тези две появи могат да помогнат за по-доброто разбиране на потенциалните рискове за общественото здраве.

През есента на 2005 г., Румъния и Хърватия бяха първите европейски страни, докладвали наличието на високопатогенната птича инфлуенца, предивикана от щама H5N1 при диви и домашни птици, след което инфекцията се разпространи и засегна цяла Централна и Източна Европа (включително и България- 5 случая при лебеди през януари и февруари 2006 г). Когато HPAIV A (H5N1) «изчезна» от Европа през 2010 г., вече бяха докладвани случаи при диви и домашни птици в 21 европейски страни. Преди появата му в Европа през 2014 г, HPAIV A (H5N1) е циркулира само сред домашните птици и диви птици в Азия. Високопатогенната инфлуенца (H5N8) е сложен реасортант, носител на гени и от прародителя си HPAI (H5N1). Като един от родителските щамове се посочва щам циркулирал в Китай през 2010 г. Високо патогенният вирус на птичата Инфлуенца А (HPAI) от щам H5N8 е установен в началото на 2014 г. в Азия в птицеферми от Южна Корея, Япония и Китай. От началото на месец януари 2014г. в Южна Корея са установени 29 епизоотични огнища на болестта, засягащи ферми с гъски, птици и патици. До септември 2014 г. са ликвидирани около 600 000 птици, като в началото на този месец отново са заболели 1 200 патици.

6. Разпространение на HPAI субтип H5N8 през 2014/2015 г.

През април 2014 г., Япония съобщи за едно огнище от високопатогенна Инфлуенца А HPAI H5N8 с 1 100 заболели птици, а 112 000 птици са били унищожени. Четири месеца по-късно, през ноември 2014 г. две нови огнища бяха установени, като вирусът е доказан във фекални проби от два сибирски лебеда (*Cygnus columbianus*).

И Китай съобщава за установяването на този вирус при изследване на патици, съгласно националната си програма за надзор на инфлуенцата по птиците. Преди години вирусът на Инфлуенца А H5N8 е бил установен в САЩ, в щата Айдахо, през 2008 г. като слабо патогенен вирус и през 2014 г. в Калифорния със същата антигенна характеристика, но отново в слабо патогенна форма (LPAI). До този момент няма данни за заболели хора.

На 5 ноември 2014 г. германските власти, потвърдиха високопатогенна Инфлуенца А HPAI (H5N8) във ферма с 31 000 пуйки за угояване при технология на отглеждане в полу-затворени помещения в региона на Мекленбург-Горна Померания (в близост до границата с Полша). Заболяват около 5 000 птици, а 1 880 умират през първите два дни. Всички птици във фермата са унищожени. Вирусът е подобен на този от Южна Корея-клайд 2.3.4.4. Първоначално изследванията на диви птици са отрицателни, но на 22.11.2014 г са установени първите положителни резултати. Десет дни по-късно (на 15 ноември 2014 г.) ветеринарните власти на Холандия установиха високо патогенна (HPAI) Инфлуенца А, предизвиквана от щам H5N8 във ферма със 150 000 кокошки носачки, отглеждани при технология на закрито. Смъртността достига 25%. Всичките 150 000 птици са унищожени. На 16-и ноември 2014 г. компетентните ветеринарни власти на Обединеното кралство също установиха високопатогенната птича Инфлуенца А (HPAI), субтип H5N8 в стадо патици, започнали да боледуват по същото време с тези в Холандия. В засегнатото стадо в Северен Йоркшир всички 6000 патици са унищожени. До момента остават неизяснени два въпроса, кога този вирус е навлязъл в Европа и как е станало почти едновременното му проникване в три отделни държави на ЕС на големи разстояния и липса на преки връзки между тях? (Фиг.1). Разстоянието от първото епизоотично огнище в Германия до това в Холандия е 800 км, от Холандия до Обединеното кралство около 400 км и от Германия до Обединеното кралство около 1000 км. Естествено е причината за това да са дивите прелетни птици, които са в началото на новия прелетен сезон. В провинция Мекленбург Померания съобщават за установяването на щама H5N8 при диви птици на 22.11.2014 г, но не се отбелязва от какъв вид птици е изолиран този вирус. Възможността на високо патогенните вируси на птичата инфлуенца да инфектират суб-клинично дивите птици увеличава риска от възможността за последващо появяване на нови огнища, както това е наблюдавано в Ю. Корея. За това компетентните здравни и ветеринарни власти препоръчват засилен мониторинг и надзор по линия на програмите за контрол на Инфлуенца А инфекциите по домашни и диви птици и бдителност към хората, имащи тесен контакт с такива птици. В щата Вашингтон /САЩ/ в началото на декември 2014 г. бяха установен последователно два различни щама на HPAI при отстреляни здрави диви птици – щам H5N2 при шилоопашата патица и щам H5N8 при исландски сокол. **Това бе първият случаи, когато**

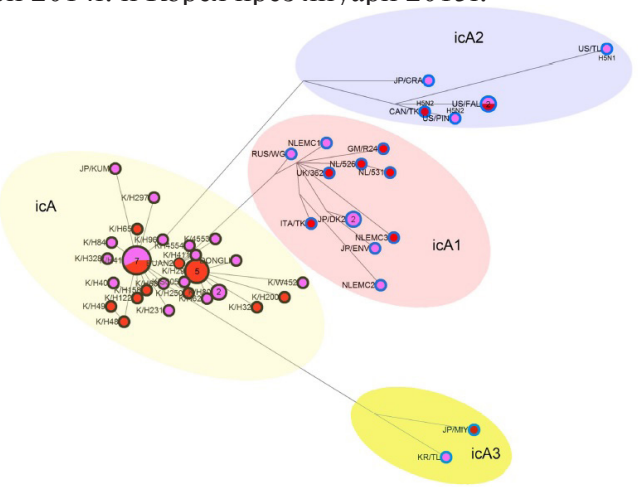
евроазиатският HPAI **вирус от субтип** H5N8 навлиза в Северна Америка. Секвентният геномен анализ (CFIA 2014) на HA на вируса е бил подобен (от 99.0% до 99.3%) с вируси Influenza A/Broiler Duck/Korea/Buan2/2014 (H5N8 HPAI). Секвентният геномен анализ на невраминидазния (NA) ген е бил (от 99.6% и 99.7%) подобен на този от вирус Influenza A/waterfowl/Korea/S005/2014 (H5N8). Ветеринарните власти на щата Вашингтон и инспекторатът по здравеопазване на животните и растенията (APHIS) продължават наблюденията над популациите от домашни и диви птици и дават съвети за биосигурност на собствениците на птици. На 16 декември 2014 г. в окръг Дъглас на щата Орегон САЩ се появи ново епизоотично огнище на високопатогенна птича Инфлуенца А от субтип H5N8 в смесено стадо от 100 птици - пилета, гъски, патици и токачки от стопанство от типа „заден двор“. Умират само пилета и токачки.

Най-много данни има за изолатите от Корея, т.к. те датират от най-дълго време. Корейският HPAI H5N8 принадлежи към генетичен подтип 2.3.4.4. и е представен от два различни генотипа. Предполага се, че вирусите принадлежащи към основните генотипове Buan2 и Donglim3 са реасортанти. Те съдържат вирусна РНК полимераза, като основен протеин 2 (PB2), хемаглутинин (HA), нуклеопротеин (NP) и невраминидаза (NA), гени от вирусите H4N2, H5N8 и H11N9**,** предизвикали заболяване в Китай през 2010 г. (Фиг.1) Вирусите HPAI H5N8 са изолирани от диви и домашни птици. Установени са при уловени, видимо здрави мигриращи диви птици и в мъртви птици, включително и зеленоглави патици, както и в домашни кокошки, гъски и патици.

Основният генотип на H5 в Китай е Подтип 2.3.4, и той се разделя на няколко гентични субклайда, съответно 2.3.4.1, 2.3.4.2, 2.3.4.3, 2.3.4.4, 2.3.4.5. и 2.3.4.6. В подтип 2.3.4. се появяват вируси с различни субтипове на неураминидазата като H5N5, H5N8, H5N2. Патогеността на HPAI с хемаглутинин H5, но с различна неураминидаза варира. Например, H5N5 вирусите изолирани от патици от пазарите за живи птици в Китай през 2008 г. показват смъртност от около 50%. Патогенността на H5N5 и H5N8 вируси, изолирани от домашни птици в Китай през 2009-2010 г. варира от лека до умерена.

Огнището на HPAI H5N8 през януари 2014г. в Южна Корея беше първото съобщено за H5N8 clade 2.3.4.4 извън Китай. По време на това огнище бяха идентифицирани две отделни вирусни групи H5N8- група А (Buan 2 like) и група-В (Gochang 1-подобни). Вирусите

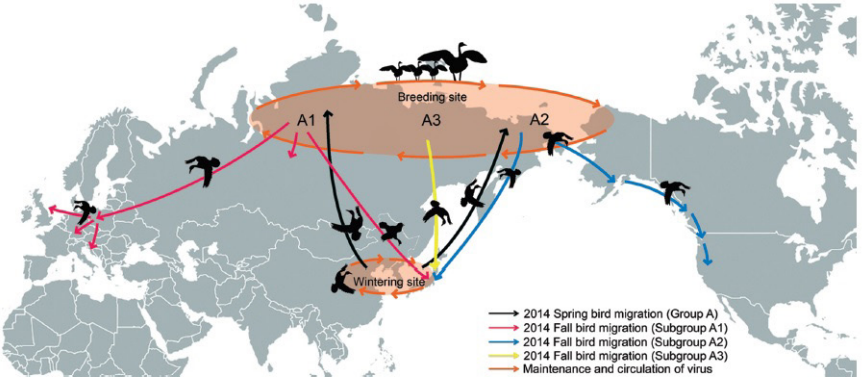
от група А преобладават и са идентифицирани в огнища на домашни птици и впоследствие по пътя на миграцията на птиците. Тази група сега включва китайски, руски, южнокорейски, японски, европейски и северноамерикански вируси, представляващи интерконтинентална група А (ИК-А). В Интерконтиненталната група А допълнително се оформиха три отделни подгрупи, ИК-А1, ИК-А2 и ИК-А3, до края на 2014 г. Подгрупата А1 се състои от вируси H5N8 от Европа и Русия от края на 2014г. и три вируса открити В Япония през декември 2014г. Подгрупата А2 се състои от H5N8, както и H5 clade 2.3.4.4 Северноамериканските реасортанти на HPAIV (H5N2 и H5N1), започвайки от края на 2014г. Японският вирус А / crane / Kagoshima / KU1 / 2014 (H5N8), открит през ноември 2014г. също е в подгрупата А2. Подгрупата А3 се състои от вируси H5N8, изолирани в Япония през декември 2014г. и Корея през януари 2015г.



Разпространение на HPAI H5N8 през 2014г. и формиране на интерконтинентална филогенетична група А

Как вирусът се е разпространил? Много важен миграционен маршрут е Източноазиатския минаващ от Китай до Япония (Китай-Южна Корея-Руски Далечен Изток-Япония). Освен това, сателитното проследяване на движението на дивите птици в Източна Европа и Азия показва, че те следват именно него по крайбрежието до местата за размножаване в източна Русия (14). Филогенетичните анализи на ранните и късните изолати от 2014 г. междуконтинентална група А H5N8 вируси и миграционните модели на водоплаващите птици

предполагат, че през пролетта на 2014 г. вирусите вероятно са достигнали в части от Сибир чрез мигриращите птици, където през размножителния период са еволюирали в подгрупи и впоследствие са се разпространили по различни миграционни пътища чрез есенните миграции в Европа, Северна Америка и Източна Азия. Например, най-ранният вирус А1 беше изолиран през септември 2014 г. в Русия [A / wigeon / Sakha / 1/2014 (H5N8)] преди появата на огнищата през ноември в Европа. В Европа през 2014г. вирусът беше открит в Германия, Холандия, Италия, Обединеното кралство, Русия.



Основни миграционни потоци към летните местообитания за развъждане на дивите прелетни птици в Западен Сибир и резервоара на HPAI H5N8 в Китай, Ю. Корея и Япония

Интересни са проучванията направени с изолатите от 2014г. в Южна Корея. Смъртността при H5N8 вируси от 2014г. варира от 0% - 20%, а при H5N1 вируси от 2008 г. и 2010 г. е съответно 50% -100%. Въпреки това, при H5N8 вирусо излъчителството от домашни патици е много по-голямо ($10^{4.5}$ $TCID_{50}$ / 0,1 мл), докато при H5N1 вируси, открити в Южна Корея през 2008 г. и 2010 г. е доста по-слабо (съответно $10^{3.8}$ $TCID_{50}$ / 0,1 мл и $10^{2.8}$ $TCID_{50}$ / 0.1 мл). Способността на тези нови реасортантни H5N8 вируси, да се реплицират успешно в дихателния и чревния тракт, без да убиват заразените патици им позволява да циркулират по ускорено в рамките на популацията и увеличава възможността им за предаване между птицефермите. По време на епидемията през 2014г. H5N8 в Южна Корея клиничните признаци и смъртта са били рядкост, най-често е установяван само

спад в производството на яйца. До 2014г. направените проучвания показват, че домашни патици могат да бъдат безсимптомни носители на HPAI H5N8.

Tang et all., (2009) предполагат, че определени замествания на аминокиселинни (Q → L в позиция 9) и делецията на една аминокиселина в мястото на разцепване на хемаглутинина, може да бъдат определящи за патогенността на вирусите. При проучването на корейските HPAI H5N8 вируси е установено, наличие на L в позиция 9 с делеция в позиция 4 на мястото на разцепване на HA, докато HPAI H5N1 вируси, циркулиращи в Южна Корея през 2008г. и 2010г. показват, Q в позиция 9 с делеция на същото място.

При проучване на заболяването при зеленоглави патици експериментално заразени с HPAI H5N1 и HPAI H5N8 вируси е установено, че вирусоизлъчителството и репликация в тъкани са по-високи и по-продължителни при тези групи инжектирани с H5N8. Тези резултати доказват, че новият реасортант HPAI H5N8 има ефективното хоризонтално предаване, довело до разпространение на вируса на птичата инфлуенца между зеленоглави патици и улесняващо разпространението на вируса сред дивите птици.

Много от HPAI H5N1 вируси, които се появиха след 2002г. имат високо съдържание на вирус в проби от трахея. ***В случая с HPAI H5N8 вирусните титри и вирусо-излъчитеството са високи не само в носоглътката, но и в клоакалните проби, което показва, че HPAI H5N8 вирусите могат ефективно да се предават чрез дихателната и храносмилателния система.***

Проучванията направени на HPAI H5N8 изолирани в Европа през ноември и декември 2014г. показват, че изолатите от Италия, Великобритания, Холандия и Германия имат една и съща последователност на аминокиселините в мястото на разцепване на хемаглутина, а именно RNSPLRERRRKR*GLFAIA. При филогенетичният анализ на 214 HPAI H5 вируси и въз основата на 1325 нуклеотида от хемаглутинина на H5N8 изолирани от Германия, Холандия и Великобритания, се установи 99,5-99,8% идентичност между тях. Доказа се, че европейските вируси принадлежат също към генетичен подтип 2.3.4.4. и имат близка родственост с корейските H5N8 изолати. Интересното в този анализ е генетичната им връзка и с H5N6 вируси изолирани в Китай през 2013-2014г., които също принадлежат към генетичен подтип 2.3.4.4. Най-близка родственост е доказана и между вирусите от генетичен подтип 2.3.4.4 с вируси

изолирани от Непал през 2013 г. от генетичен подтип 2.3.2.1а.

Проучването на холандската референтна лаборатория показва, изключително близък произход на три изолата, два Корейски и един Японски – съответно A/baikal teal/Donglim/3/2014, A/broiler duck/Korea/Buan2/2014 и A/chicken/Kumamoto/1-7/2014. Това е поредното доказателсто, че инфекцията с HPAI H5N8 се пренася с прелетните птици.

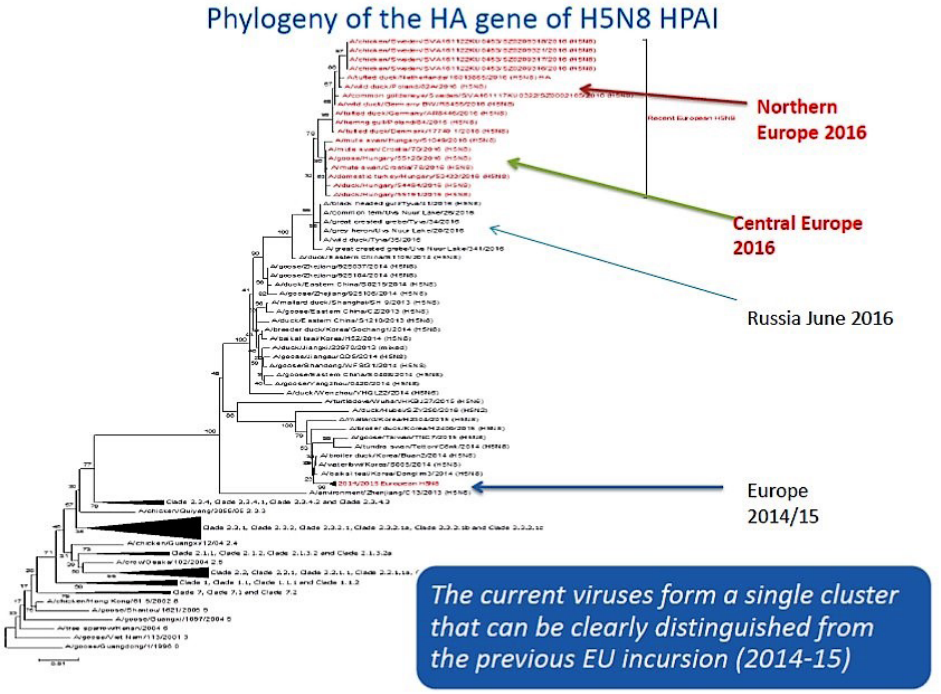
Филогенетичните дървета на HA, NA и NS на вируса QH-H5N8, групиран с вируси H5N8, изолирани в края на май 2016г. от диви водоплаващи птици в езерото Ubsu-Nur (UN-H5N8), образуват **монофилетичен клъстер. За разлика от щамовете H5N8, описани по-рано в Южна Корея през 2014-2015г. (подобни на Buan2, група А), този клъстер попада в група В H5N8 вируси (Gochang1-подобни), образувайки нова, транс-континентална подгрупа В (icB1).** Така вирусите от 2014г. и 2016г. **имат дотатъчни различия в гена на HA**, които предполагат достатъчно вариации и **представляват техните отделни фенотипни промени.** Анализът на филогенетичната мрежа на H5 вирусите, свързан със съседите, на HA сегмента от генетичен Clade 2.3.4.4. също подкрепя факта, че щамовете QH-H5N8 и UN-H5N8 образуват монофилетичен клъстер и са се развили еволюционно независимо от вирусите от група А H5N8 на този Clade. Филогенетичните дървета, конструирани чрез използване на последователности от вътрешните гени на вирусите QH-H5N8 и UN-H5N8 са тясно свързани още и с различни LPAI вируси, циркулиращи във водолюбиви птици в Монголия през 2015г. PB1 генът произхожда от различни LPAI вируси, разпръснати в относително голям географски регион (Източна и Южна Азия) за дълъг период от време (2010-2015г.

След като дивите птици са напуснали Централен Сибир, което е мястото на тяхното лятно местообитание и размножаване са се насочили към местата за зимуване през есента на 2016г. те са разпростртранили вирус UN-H5N8 в други региони (основно в Европа) чрез миграционните пътища.

Наличната генетична информация показва, че щамовете na HPAI H5N8, изолирани в засегнатите страни от Централна Европа през есента на 2016г. са много подобни на вирус Инфлуенца А UN-H5N8. Първоначалните анализи на HA гена, генерирани от пробите в огнищата на HPAI H5N8 2016г. показват, че европейските вируси образуват два много тясно свързани клъстера, които се различават по географски произход - Северна Европа (Дания, Германия, Холандия,

Полша, Швеция) и Централна Европа (Хърватия, Унгария), вероятно отразяващи различни пътища за въвеждането им чрез диви птици и отделните трансверзални циркулационни басейни на дивите прелетни и синантропни птици.

Филогенетично дърво на сходство на клъстерите на HPAI H5N8 2016г. в Северна и Централна Европа с общ предшественик от 2014 г., вирус Инфлуенца А UN-H5N8 (Русия)



Филогенетичното разстояние между клъстерите на HPAI H5N8 2016г. в Северна и Централна Европа обаче е достатъчно близко, за да покаже, че те са подобни вируси с общ прародител, вероятно вирус Инфлуенца А UN-H5N8, които са достигнали до Европа по различни

географски маршрути, а разликите в клъстера за 2014г. и 2016г. върху гена на HA достатъчни различия и представляват техните отделни фенотипни промени.

Инфекцията предизвикана от H5N8 през 2014г. не причинява тежко заболяване или висока смъртност при дивите зеленоглави патици. За разлика от тях обаче, при птици от кокошия вид (пуйки, пилета), предизвиква висока смъртност. Във Великобритания е наблюдавана ниска до умерена вирулентност при домашни патици. За разлика от H5N8, повечето щамове на H5N1 имат висока смъртност не само при птици от кокошия вид, но и при дивите птици (Гужгулова и Стоименов., 2015).

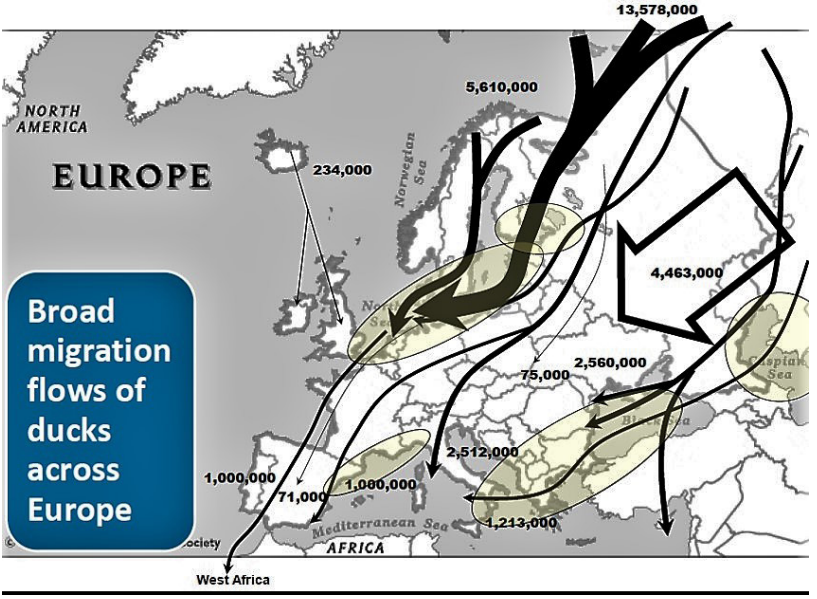
Високопатогенният инфлуенца А вирус (HPAIV) подтип H5N1 е изолиран за първи път от гъска през 1996г. в Гуангдонг Китай (Gs/GD). Този вирус еволюира и се превърна в прародител на множество хемаглутининови генетични подтипове и претърпя ресортация с различни невраминидаза и вътрешни генни сегменти за да генерира H5N8 подтип 2.3.4.4 Gs / GD HPAIV, които за първи път бе установен при домашни птици в Китай през 2013 г. (Zhao et al., 2012), последвано от огнища в Южна Корея през януари 2014 г. (Lee et al., 2014). По време на тези огнища, бяха идентифицирани 2 отделни групи H5N8 вируси; група А (Buan-подобни) и група В (Gochang-подобни). Не е имало допълнителни огнища на вируси от група В, след първоначалното им откриване в Китай и Южна Корея през 2014 г. (Zhou et al., 2016; Wu et al., 2014). За разлика от тях, в началото на 2014 г. група А вируси преобладават в Южна Корея (Jeong et al., 2014) и през септември на същата година вируси от група А са били изолирани от фиш (Anas Penelope) в Якутия в североизточен Сибир (Marchenko et al., 2015). Въз основа на пътищата на миграция на дивите птици на птица, вероятно HPAIV (H5N8) са достигнали до Сибир по време на пролетната миграция на дивите птици през 2014 г. (Lee et al., 2015). Разпространението на вирусът вероятно е извършено от птици тръгващи от Сибир до различни страни от Азия, Европа и Северна Америка по време на есенната миграция.

7. Разпространение на HPAI H5N8 през 2016/2017 г.

На 28.10.2016 г. HPAI от щам H5N8 на Инфлуенца А вирус бе установен при умрял ням лебед (Cygnus olor) в Тоткомлош, окръг Бекет, Унгария и на 04.11.2016 г. в стопанство от 10201 пуйки за угояване, което се намира на разстояние от около 50 км от случая с лебеда. В Полша също бяха установени случаи на HPAI от щам H5N8, при намерени умрели ням лебед, диви гъски и чайки в близост до границата с Германия.

Тези три случая бележат началото на сезонната есенна циркулация на HPAI H5N8 вируса на Инфлуенца А по птиците в Европа за 2016г., който факт сам по себе си е тревожен поради това, че се установява твърде рано, още в самото начало на есенния прелет на дивите мигриращи птици.

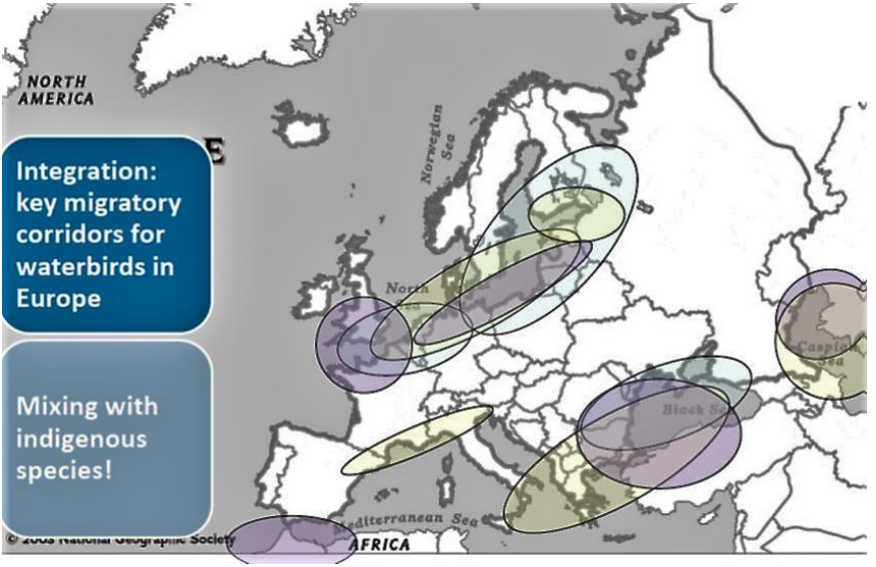
Трансверзални миграционни маршрути над Европа и количества на мигрирали дивите патици в есенния сезон на 2016г.



Към 11-и ноември 2016г. вече осем страни в Европа (Австрия, Хърватска, Дания, Германия, Унгария, Холандия, Полша и Швейцария) докладваха за нови случаи на високопатогенна Инфлуенца А (HPAI)

от щам H5N8. Тези случаи бяха установени при различни видове диви птици, включително качулата потапница (Aythya fuligula), чайки, диви гъски, ням лебед и др., като най-вече те се манифестираха с намирането на умрели диви прелетни и водолюбиви птици. През месец декември 2016 г. епизоотичната вълна от HPAI от щам H5N8 при диви и промишлено отглеждани птици в Европа продължава да се разпространява. В периода 01-10.12.2016г. няколко нови страни от ЕС вече са засегнати (Финландия, Франция, Румъния, Швеция и Хърватия). Регистрирани са 101 огнища при домашни птици (Австрия, Унгария, Германия, Холандия, Дания, Финландия и Швеция), пет при затворени птици (Германия и Холандия), едно ЕО при отглеждани на открито диви птици (Франция) и над 150 случая на установени умрели диви птици. Вирусните изолати, свързани с тези случаи, имат високо генетично сходство, което потвърждава произхода и връзката им с миграционните пътища и намерените мъртви видове диви птици. През последния месец случаи на HPAI от щам H5N8 са докладвани още в Украйна, Южна Русия, Иран и Израел и наскоро в Египет, който добавя допълнителна информация на участието на миграционните пътища над Черно и Средиземно море. В допълнение, новите случаи в Европа (Сърбия и Румъния), Северна Африка (Тунис) и по-нататъшно разпространение в Израел и Иран показват, че епизоотията продължава своето развитие. До този момент регистрираните 101 огнища при домашни птици представлява увеличение с 66 след последната актуализация на 17-и ноември 2016г., В Унгария и Франция при домашни птици има и вторично разпространение на инфекцията между фермите. Унгария вече е със 70 ЕО към 17.11.2016г., от които 17 са вторични. Франция съобщи за разпространение на HPAI от щам H5N8 в шест ферми за разплодни патици. Всички те са в Югозападните райони на страната, където още няколко високо патогенни и ниско патогенни щамове на птичия грип бяха установени през миналата година.

Интегрирана схема на основните хоризонтални миграционни маршрути в Европа и смесването на дивите прелетни птици с местните синантропни птици



В края на май 2016 г., група В, подтип 2.3.4.4 на HPAI H5N8 вирус е бил открит при мъртви и отстреляни диви птици в езерото Убсу Нур в Република Тува, на границата между Русия и Монголия (Lee et al., 2016). На 7 ноември, 2016г., бяха намерени и много мъртви качулати потапници (Aythya fuligula) в Езерото Плюн в Шлезвиг-Холщайн, Северна Германия, и в езерото Констанс в Баден-Вюртемберг, Южна Германия. Повечето от тях са били позитивни за HPAI H5N8. Епизоотията сред дивите птици продължи да се разпространява към централна Германия. Към декември 2016г., няколко дворни стопанства, 4 зоологически градини, както и няколко големи търговски комплекса също бяха засегнати. Най-вероятният път на проникване на вируса в фермите от типа „заден двор“ и в зоологическите градини бе прекия или непряк контакт с диви птици.

Засегнатите птици са били откривани мъртви или с проява на тежки клинични признаци, като апатия или внезапна смърт (в някои части на засегнатите стопанствата до 90% смъртност преди умъртвяване). Често наблюдаваните макроскопски изменения при засегнатите птици били: тежка дифузна некроза на черния дроб, мултифокални петехии, и хиперемични и едематозни бели дробове. Имунохистохимичното изследване потвърждава вирусен (NP)

антиген и различни лезии в черния дроб, сърцето, белите дробове, мозъка, панкреаса, далака и тимуса. Някои пилета също показват тежък дифузно катарален ентероколит; грипен вирус А NP антиген присъства в чревния епител (Pohlmann et al., 2017).

Спектърът на засегнатите видове диви птици, бе твърде широк и включваше главно потапници, лебеди, гмурци, чайки, мишелови, врани и белоопашат орел (Pohlmann et al., 2017). Към 30 ноември 2016г., ≈ 400 заразени диви птици бяха открити в 13 федерални провинции на Германия. По това време инфекция при птици с HPAI H5N8 също са бяха докладвани от Австрия, Хърватия, Дания, Финландия, Франция, Унгария, Полша, Румъния, Швеция, Швейцария и Холандия.

Високата патогенност за кокошеви птици бе потвърдена чрез определяне на интравенозния патогенен индекс. За вирус A/Aythya fuligula/Germany-SH/AR8444/2016 той е 2.93, по-висок в сравнение с 2.81 индекса за H5N8, циркулиращ през 2014г. (A/Turkey/Germany-MV/AR2472/2014 г.) (Pohlmann et al., 2017). Клинично заболяване е отбелязано при всички заразени видове птици, като в повечето случаи е свързано с висока заболеваемост и висока смъртност.

Следва да се отбележи, че понастоящем циркулиращият HPAIV H5N8 2016г. е с интравенозен патогенен индекс (IVPI) ~ 3,0, докато вирусите през 2014/2015 показват IVPI от около 2,5 до 2,8.

За домашните патици вирулентността HPAI H5N8 2016г. е по-висока, отколкото за вирусите, открити по целия свят в клас 2.3.4.4 през 2014/2015г. Това твърдение се основава на високата смъртност на домашните патици, установена във ферми в югозападна Франция, Холандия и Унгария през 2016г. в сравнение с ниската смъртност на домашните патици в стопанствата в Обединеното кралство, Германия и Холандия, заразени с HPAI H5N8 вируси през 2014г.

Всички геномни сегменти на новите вируси H5N8 подтип 2.3.4.4 от група Б изолирани в Германия през 2016г. се различават значително от щамовете H5N8 група А подтип 2.3.4.4 изолирани през 2014-2015г. в Германия и други европейски страни (Harder et al., 2015). Този извод е в подкрепа на констатациите и проучванията, че не е имало продължителна циркулация на група А-подобни вируси сред дивите птици след установяването им в Европа през 2014г. (Poen et al., 2016). При търсенето в Базата данни се установи, че H5N8 подтип 2.3.4.4 вируси открити за първи път при диви птици на границата между Русия и Монголия в края на месец май 2016г. са най-

близки до изолираните в Германия. Разширеното търсене потвърди, че изолатите от Германия през 2016г., описани в това проучване са нови реасортанти, които могат да бъдат ясно разграничени от изолатите от Русия и Монголия през 2016 г. (Pohlmann et al., 2017). Трябва да се отбележи, че вирусите изолирани на границата между Русия и Монголия са най вероятно ранен рекомбинант на H5N8 подтип 2.3.4.4 група B (Lee et al., 2016). Тези нови H5N8 вируси са централно Азиатски реасортанти, които са с произход от щамове, циркулиращи в Източна Азия. Гените на 3 сегмента (HA, NA, и NS протеини) се клъстерират със сегменти на H5N8 подтип 2.3.4.4 група B вируси, идентифицирани в източната част на Китай; останалите 5 гени (PB1, PB2, PA, NP, и M протеин) се клъстерират с вируси с ниска патогенност, които са били идентифицирани в Монголия, Китай и Виетнам (Lee et al., 2016).

В заключение можем да кажем, че нов реасортант инфлуенца А (H5N8) вирус е отговорен за последните огнища на HPAIV в Германия (Pohlmann et al., 2017). Наблюдаваните разлики в патогенността за широк спектър от водоплаващи птици в сравнение с тази на H5N8 вируси от 2014-2015 г. корелират с новия състав на генома на тези вируси. Новите NP и PA сегменти на H5N8 вирусите изолирани в Германия през 2016 г. са кандидати за бъдещи молекулярно-биологични и генетични изследвания. Тези нови щамове може по-ефективно, да се предават и излъчват при диви птици и към домашни такива, хипотеза, в съответствие с големия брой случаи сред дивите птици през ноември 2016 г.

- Към дата (06/02/17) 1420 огнища на H5N8 високопатогенна инфлуенца по птиците са били докладвани. При домашни птици (647), диви птици (744) и затворени птици (29) в 26 европейски страни.
- Към дата (06/02/17) 13 огнища на H5N5 високопатогенна инфлуенца по птиците са били докладвани при домашни птици (3), диви птици (10) от 7 европейски страни.

Нови събития, от последното обновяване на ситуация (16/01/17):

- Налице са множество случаи на вторично разпространение сред домашни птици във Франция, Полша, Германия, Унгария, България и Обединеното кралство.
- Нови огнища при домашни птици са съобщени за първи път в

Македония

- При диви птици са докладвани огнища за първи път в Португалия и Македония
- Белгия съобщи за първи път за H5N8 (затворени птици).
- В момента пет страни са съобщили за H5N8 само при диви птици.
- Засегната площ от заболяването е разширена и текущия надзор е предоставил доказателства за HPAI H5N8 при по-голям брой видове диви птици (все още предимно видове, свързани с водните местообитания).
- HPAI H5N8 е детектирана и при фазани (Великобритания), с което се разширява епизоотологичната картина.

Генетичният анализ на HA гена продължава да показва участието на тясно свързани H5 вируси. Освен това тези вируси образуват отделен клъстер и са тясно свързани с тях, но се различават от тези, открити в Руската федерация през юни 2016 година при диви птици. Могат да бъдат и ясно разграничени от вирусите, установени в ЕС през 2014/15 г. Анализ на HA ген на вирусите от сегашната епидемия показва два много тясно свързани, но разделени клъстери, което съпоставено с географското положение на страните в които те са детектирани и миграционните пътища, очертава две отделни навлизания на вируса чрез дивите птици.

Огнищата на HPAI H5N8 в Европа по страни от 19.10.2016 до 06.02.2017 г.

Страни	H5N8			H5N5		
	Домашни птици	Диви птици	Птици в плен/ волиери	Домашни птици	Диви птици	Общо
Унгария	231	56	4			391
Франция	201	17	1			219
България	60	4	1			65
Германия	48	248	9	3		305
Полша	38	39			2	79
Чехия	20	27				47
Холандия	8	42	6		1	57
Румъния	8	32	1			41

Великобритания	8	18				26
Словакия	6	39	3			48
Италия	4	3			1	8
Швеция	3	16	2			21
Сърбия	3	12				15
Гърция	3	4			1	8
Украйна	3	1				4
Австрия	2	21				23
Хърватска	2	9				11
Дания	1	39				40
Македония	1	1				2
Швейцария		87				87
Финландия		12	1			13
Словения		10			3	13
Ирландия		5				5
Черна Гора					2	2
Белгия			1			1
Португалия		1				1
Испания		1				1
Общо	**647**	**744**	**29**	**3**	**10**	**1433**

Към 22.04. 2017г. над 2700 огнища и случаи на HPAI H5N8 при домашни диеви и зоопаркови птици бяха докладвани в 29 европейски страни.

- Налице са множество случаи на вторично разпространение сред домашни птици във Франция, Полша, Германия, Унгария,

България Испания, Хърватия Румъния и Обединеното кралство.

- Засега 5 страни са обявили огнища само по диви птици (Ирландия, Литва, Португалия, Словения и Швейцария).

Огнища на HPAI H5N8 в Европа по страни от 19.10.2016 до 22.03.2017 г.

Страни	H5N8		
	Домашни птици	Диви птици	Птици в плен
Унгария	234	86	3
Франция	467	51	5
България	67	13	2
Германия	77	708	15
Полша	65	66	
Чехия	37	39	
Холандия	8	46	9
Румъния	34	89	2
Великобритания	9	22	
Словакия	8	57	3
Италия	10	4	
Швеция	3	30	2
Сърбия	4	20	
Гърция	4	8	
Украйна	3	2	1
Австрия	2	51	1
Хърватска	9	12	
Дания	1	46	1
Боцна и Херцеговина	1		1
Македония	1	1	
Литва		4	
Швейцария		87	
Финландия		13	1

Словения		38	
Ирландия		10	
Черна Гора			
Белгия		2	1
Португалия		1	
Испания	10	2	
Общо	**1054**	**1508**	**47**

От графиката се вижда, че в Унгария, Франция и България броят на случаите на HPAI H5N8 при патици-мюлари е най-голям. Това е така вероятно, защото в тези страни има множество ферми за патици за гушене, а спецификата и начина на отглеждането им предразполага развитието на заболяването. Освен това сред тях циркулират и множество слабопатогенни инфлуенца А вируси.

Когато проучваме динамиката на предаване на инфекциозния агент ние се интересуваме кои фактори имат отношение към броя на инфектираните стада или индивидуални диви птици за единица време.

Определянето на $\boldsymbol{R_0}$ *(basic reproduction number)* - основният епизоотологичен показател за броя на вторично инфектираните

топанства/индивиди от всяко първично инфектирано огнище/индивид в популацията при отсъствие на специфичен имунитет и мерки за ограничаване и ликвидиране на инфекцията.

$R_0 = \beta * K * D$, където

β = степента на риск за предаване на инфекцията при контакт

K = броят на потенциалните инфекциозни контакти за единица време

D = продължителност на инфекциозността на един заразен индивид (измерен за същата единица време както K)

Основните фактори които определят коефициента R_0 са 4:

- Вероятност за предаване на инфекцията при контакт между инфектирани и възприемчиви индивиди („ефективни контакти“);
- Честота на ефективните контакти;
- Продължителност на инфекциозния период;
- Съотношението на вече имунните спрямо неимунните индивиди в популацията.

R_0 **освен** това е и е показател за това дали дадена инфекция ще продължи да се разпространява в популацията или, не. Една инфекциозна болест се превръща в ензоотична, когато се поддържа непрекъснато в дадена популация без необходимост от повторното и внасяне отвън. Това означава, че средно всеки инфектиран индивид инфектира по един възприемчив. Ако броят им е по-голям ще има експоненциално нарастване на броя на инфектираните докато се стигне до епидемия и обратно, ако броят на инфектираните е по-малък инфекцията ще заглъхне и в крайна сметка ще се преустанови.

Математически изразено, едно стабилно ензоотично състояние изглежда така: $R_0 \times S = 1.$

S е пропорцията на възприемчивите към болестта индивиди спрямо популацията.

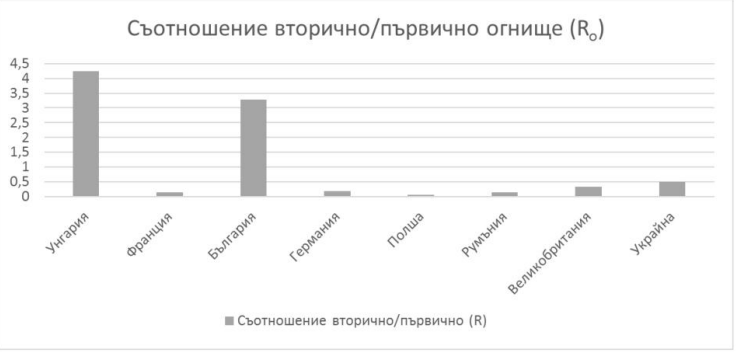
Когато $R_0<1$, инфекцията ще затихне след продължително развитие при положение, че появата на нови случаи се запазва в постоянни граници, но ако $R_0>1$, тя ще продължи да се разпространява в популацията. Колкото по-голямо е R_0 толкова по-голяма е вероятността от възникването на епидемия (респективно от епизоотия) и толкова

по-трудно за овладяване е положението.

Основният репродуктивен брой се повлиява от различни фактори като: продължителността от време през което инфектираните индивиди са способни да инфектират други възприемчиви индивиди от популацията; степента на възприемчивост към инфекцията на различните възрастови групи, инфекциозността на патогенния агент, броя на възприемчивите индивиди от популацията с която инфектираните индивиди са били в контакт, стадния имунитет (Иванов и съавт., 2012).

Брой първични, вторични огнища и съотношението между тях по страни (R_o)

Държава	Първично огнище	Вторично огнище	Съотношение
Унгария	44	187	4,25
Франция	178	23	0,13
България	14	46	3,29
Германия	41	7	0,17
Полша	32	6	0,06
Румъния	7	1	0,14
Великобритания	6	2	0,33
Украйна	2	1	0,5



На базата съотношенията между вторичните и първичните огнища можем да съдим за наличие на значителни пропуски в системите за биосигурност в нашите ферми за патици. Графиката илюстрира съотношенията, като по този показател е видно, че те (пропуските) са най-големи в Унгария и България, съответно 4,25 и 3,29 (към 22.03.201 г.)

Когато се цели ограничаване на инфекцията трябва да се стремим да намалим R_0, а то може да бъде намалено по няколко начина:

- Редуциране или елиминиране на източниците на инфекция;
- Скъсяване на времето на оцеляване на патогена в околната среда;
- Редуциране или елиминиране на източниците на пътищата на предаване;
- Предотвратяване или намаляване на изложеността на животните на риск от заразяване;
- Редуциране на векторните популации или предотвратяване на излагането на животните на векторите;
- Повишаване резистентността и създъване на имунитет във възприемчивите индивиди.

Общо 87 различни видове диви птици са били засегнати в Европа през сезона 2016/17г.. Около 88% от птиците бяха идентифицирани до ниво вид и съвпадаха със списъка на прицелните (таргетните) за заболяването видове и приоритетни за наблюдение при надзора за HPAI в ЕС (първоначално изготвен след нахлуване на HPAI H5N1 през 2005/06г.). Основните заразени видове при настоящите огнища, които не са част от списъка целеви видове на ЕС HPAI H5N1 са; Сребриста чайка (*Larus argentatus*)-24 засегнати птици и голяма черногърба чайка (*Larus Marinus*)-11 докладвани случая. Приблизително 21% от всички случаи на HPAI H5N8 бяха констатирани при неми лебеди *(Cygnus olor),* 9% при качулата потапница (*Aythya fuligula*), 4% при поен лебед (*Cygnus Cygnus*). Оказва се, че най-много са потвърдените случаи при ням лебед. Причината за големия брой констатирани случаи при лебеди вероятно се дължи на факта, че това са големи едри птици, които веднъж кацнали на мястото за зимуване остават там за по дълъг период, което им осигурява и по продължителен контакт с контаминираната околна среда.

Засегнати видове диви птици от HPAI H5N8 за сезон 2016/2017 г.- брой и процентно съотношение до 06.02.2017г.

Вид засегната птица	Брой на случаите	%
Ням лебед (*Cygnus olor)*		21%
Патици	102	12%
Качулата потапница *(Aythya fuligula)*	77	9%
Неустановени видове	77	9%
Чайки	59	7%
Лебеди	49	6%
Поен лебед (*Cygnus cygnus*)	32	4%
Гъски	30	4%
Сребриста чайка (*Larus argentatus*)	24	3%
Зеленоглава патица (*Anas platyrhynchos*)	22	3%
Фиш (*Anas penelope)*	19	2%
Морски орел *(Haliaeetus albicilla)*	19	2%
Речна чайка *(Chroicocephalus ridibundus)*	17	2%
Обикновен мишелов *(Buteo buteo)*	12	1%
Голяма черногърба чайка (*Larus marinus*)	11	1%
Голям гмурец *(Podiceps cristatus)*	11	1%
Сива гъска *(Anser anser)*	11	1%
Кафявоглава потапница *(Aythya farina)*	8	1%
Чапли	8	1%
Голям корморан *(Phalacrocorax carbo)*	7	1%
Сива чапла *(Ardea cinerea)*	7	1%
Голяма белочела гъска *(Anser albifrons albifrons)*	7	1%

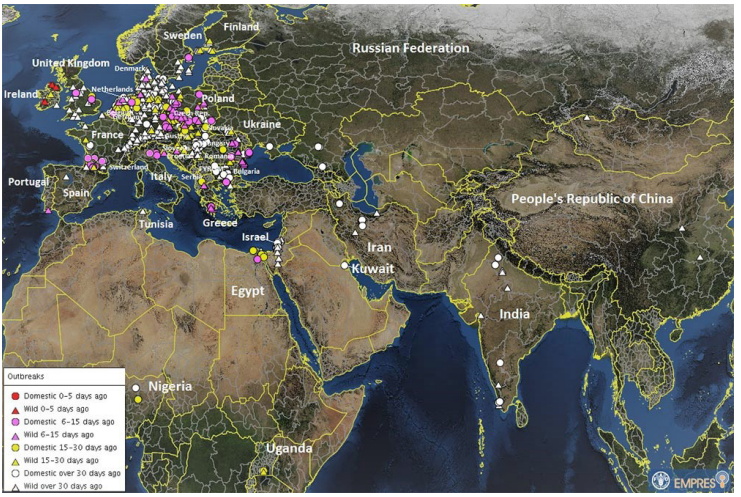
Лиска *(Fulica atra)*	5	1%
Сврака (*Pica pica*)	4	≤ 1%
Малка белочела гъска *(Anser erythropus)*	4	≤ 1%
Малък гмурец *(Tachybaptus ruficollis)*	4	≤ 1%
Сокол скитник *(Falco peregrinus)*	4	≤ 1%
Зимно бърне *(Anas crecca)*	3	≤ 1%
Совоподобни	3	≤ 1%
Buzzard spp	2	≤ 1%
Чайка буревестница (Larus canus)	2	≤ 1%
Зеленоножка (*Gallinula chloropus*)	2	≤ 1%
Сива врана (*Corvus cornix*)	2	≤ 1%
Червеноклюна потапница (*Netta rufina)*	2	≤ 1%
Бял щъркел *(Ciconia ciconia)*	2	≤ 1%
Канадска гъска *(Branta Canadensis)*	2	≤ 1%
Черна врана (*Corvus corone*)	1	≤ 1%
Обикновенна гага (*Somateria mollissima*)	1	≤ 1%
Звънарка (*Bucephala clangula*)	1	≤ 1%
Common raven	1	≤ 1%
Ръчна рибарка (*Sterna hirundo*)	1	≤ 1%
Свирци (*Numenius* spp.)	1	≤ 1%
Орел	1	≤ 1%
Бухал *(Bubo bubo)*	1	≤ 1%
Малък ястреб *(Accipiter nisus)*	1	≤ 1%
Голяма белочела гъска *(Anser albifrons)*	1	≤ 1%
Голям горски водобегач (*Tringa ochropus*)	1	≤ 1%
Малка черногърба чайка (*Larus fuscus*)	1	≤ 1%

Бял ангъч (*Tadorna tadorna*)	1	≤ 1%
Поен дрозд *(Turdus philomelos)*	1	≤ 1%
Wigeon spp.	1	≤ 1%
Керкенез *(Falco tinnunculus)*	1	≤ 1%
Гривяк (Columba palumbus)	1	≤ 1%
Кос (Turdus merula)	1	≤ 1%
Птиците с Болд са в списъка на високорисковите за HPAI		

Докладвани са 80 случая на масова смъртност (≥5 птици мъртви), при диви птици: два в Германия, в които са установени 113 и 92 мъртви птици, и още един случай при който са установени 58 мъртви качулати потапници, една Лиска и една Голяма черногърба чайка намерени около езерото Plon в Германия. Един случай в Полша съобщава се за 74 качулати потапници и чайки намерени мъртви в Zachodnio-Pomorskie. Има още Тридесет и три нови огнища с масова смъртност при диви птици (докладвани 10-25 птици мъртви), но точни данни за видовете птици и за самите случаи липсват.

Досега повечето огнища при диви птици са били открити чрез пасивен надзор (смъртност на диви птици). Това е в контраст със случаите през 2014/15г., когато множеството от случаите на HPAI H5N8 подтип 2.3.4.4 бяха установени чрез активен надзор, но тогава такава масова смъртност при дивите птици не бе наблюдавана. Фенотипните промени във вируса вероятно са свързани с генотипни различия между различните пространствени групи на хемаглутинина (HA) на HPAI H5N8 (подтип 2.3.4.4.), които са навлезли в Европа през 2014 година.

До февруари 2017г. засегнатите видове домашни птици са: кокошки *(Gallus Gallus domesticus),* зеленоглава патица (*Anas platyrhynchos domesticus*), Пуйки (*Meleagris gallopavo*), Гъски (*Anserinae sp.),* Токачки (*Numida Meleagris*).

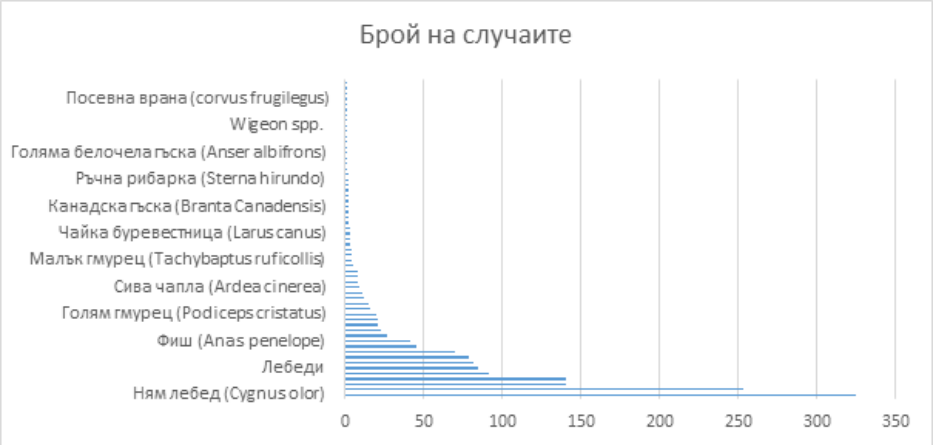


Карта, показваща разпространението на HPAI H5N8 към 12.02.2017 г. Източник EMPRES FAO.

Засегнати видове диви птици от HPAI H5N8 за сезон 2016/2017 г.- брой и процентно съотношение към 22.03.2017 г.

Вид засегната птица	Брой на случаите	%
Ням лебед (*Cygnus olor*)	325	20%
Патици	253	16%
Качулата потапница *(Aythya fuligula)*	140	9%
Неустановени видове	140	9%
Чайки	91	6%
Лебеди	84	5%
Поен лебед (*Cygnus cygnus*)	82	5%
Гъски	79	5%
Сребриста чайка (*Larus argentatus*)	70	4%
Зеленоглава патица (Anas platyrhynchos)	45	3%
Фиш (*Anas penelope*)	41	2%
Морски орел (Haliaeetus albicilla)	27	2%
Речна чайка (*Chroicocephalus ridibundus*)	23	1%
Обикновен мишелов (*Buteo buteo*)	21	1%
Голяма черногърба чайка (*Larus marinus*)	21	1%
Голям гмурец (*Podiceps cristatus*)	20	1%
Сива гъска (*Anser anser*)	16	1%
Кафявоглава потапница (*Aythya farina*)	15	1%
Чапли	12	1%
Голям корморан (*Phalacrocorax carbo*)	11	1%
Сива чапла (*Ardea cinerea*)	9	1%
Голяма белочела гъска (Anser albifrons albifrons)	8	<1%
Лиска (*Fulica atra*)	8	<1%
Сврака (*Pica pica*)	8	<1%
Малка белочела гъска (*Anser erythropus*)	5	<1%
Малък гмурец (*Tachybaptus ruficollis*)	4	<1%
Сокол скитник (*Falco peregrinus*)	4	<1%
Зимно бърне (*Anas crecca*)	4	<1%

Совоподобни	3	<1%
Buzzard spp	3	<1%
Чайка буревестница (*Larus canus*)	3	<1%
Зеленоножка (*Gallinula chloropus*)	3	<1%
Сива врана (*Corvus cornix*)	2	<1%
Червеноклюна потапница (*Netta rufina*)	2	<1%
Бял щъркел (*Ciconia ciconia*)	2	<1%
Канадска гъска (*Branta Canadensis)*	2	<1%
Черна врана (*Corvus corone*)	2	<1%
Обикновенна гага (*Somateria mollissima*)	2	<1%
Звънарка (*Bucephala clangula*)	2	<1%
Common raven	2	<1%
Ръчна рибарка (*Sterna hirundo*)	2	<1%
Свирци (*Numenius* spp.)	2	<1%
Орел	1	<1%
Бухал (*Bubo bubo*)	1	<1%
Малък ястреб (*Accipiter nisus*)	1	<1%
Голяма белочела гъска (*Anser albifrons*)	1	<1%
Голям горски водобегач (*Tringa ochropus*)	1	<1%
Малка черногърба чайка (*Larus fuscus*)	1	<1%
Бял ангъч (*Tadorna tadorna*)	1	<1%
Поен дрозд *(Turdus philomelos)*	1	<1%
Wigeon spp.	1	<1%
Керкенез (*Falco tinnunculus)*	1	<1%
Гривяк (Columba palumbus)	1	<1%
Кос (Turdus merula)	1	<1%
Гугутка (Streptopelia decaocto)	1	<1%
Посевна врана (corvus frugilegus)	1	<1%
Посевна гъска (Anser fabalis)	1	<1%
Късоклюна гъска (Anser brachyrhynchus)	1	<1%
Червеночела лиска (Fulica cristata)	1	<1%



8. Разпространение на HPAI в България през последното десетилетие

В исторически план Високопатогенната птича Инфлуенца А, предизвиквана от щама H5N1 на два пъти е навлизала в България. За първи път това бе в периода 29.01-28.02.2006г., когато се разрази голямата пандемична вълна от HPAI H5N1 от Азия и бяха засегнати много страни от Азия, Русия, Европа, Близкия Изток и Африка. Тогава на територията на Р. България вирусът бе изолиран от единични прелетни птици (4 броя лебеди и една зеленоглава патица) без да се засягнат домашни или промишлено отглеждани птици. Генетичните изследвания показаха, че се касае за генетичен подтип 2.2 и гено-група 2.2.1. Този вирус достигна и до Северна Африка (Египет), където се разпространи в много страни от суб -Сахарната област (Чад, Сенегал, Мавритания и др.). Този генетичен подтип на HPAI H5N1 – 2.2. и до днес продължава да циркулира в Египет. **През януари 2006г. Гърция съобщава за установяването на този вирус при диви прелетни птици (лебеди), Италия (при диви птици), Словения, Германия (при лебеди), Франция (при диви патици), Египет (домашни птици), Австрия, Босна и Херцеговина, Словакия и Унгария (при лебеди), Азербайджан (при прелетни птици и домашни птици), Грузи (при лебеди), Сърбия и Черна Гора (при лебеди), Швейцария (при диви птици), Полша (при лебеди), Дания (при диви птици), Албания (при домашни птици), Швеция (диви птици), Чехия (лебеди) и Испания (диви птици). Египет съобщава за 18 случая при хора, Китай за 22, Индонезия за 76, Тайланд за 25** (EFSA, 8, 2007).

През 2010г. бе второто навлизане на HPAI H5N1 от Азия в Европа. В ранната пролет на 2010 г. в област Тулча (Румъния) бе установена висока смъртност при домашни кокошки в две села, а на 15 март 2010г, в курорта Св. Константин и Елена (край Варна) е намерен умрял мишелов. От него бе изолиран HPAI H5N1. Генетичните проучвания показаха, че вирусът е от подтип 2.3.2. и е вирус, който за първи път навлиза от Азия в Европа след 2006г. От циркулиращите постоянно в Югоизточна Азия 6 генетични подтипа на HPAI H5N1 (1, 2.2. 2.3.2. 3.4 и 7) за сега само вируси от генетични подтипове 2.2, 2.3.2. и сегашният H5N8 2.3.4.4. са проявили способността си за пандемично (трансконтинентално) разпространение. Учени (Webster R.) считат, че останалите генетични клейдове на H***PAI*** вируси, съдържащи ***H5*** циркулират само в страните от региона на Югоизточна Азия и нямат склонност за пандемично разпространение.

8.1. *Епизоотологични особености*

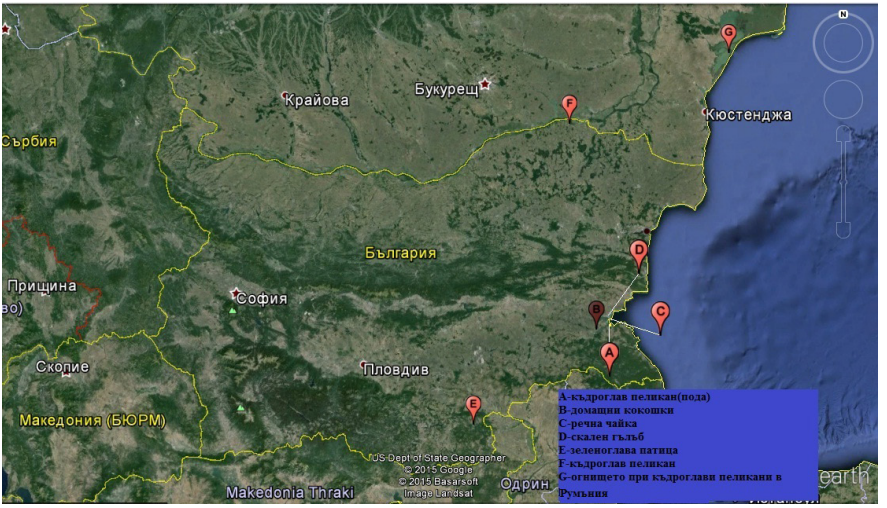
През януари 2015г. след като в цяла Европа вече имаше огнища с HPAI H5N8, в Америка огнища от HPAI H5N2, а Близкият Изток с HPAI H5N1 подтип 2.2.1.2, в България бе изолиран отново HPAI H5N1, подтип 2.3.2.1.с. *Първичното огнище бе в защитената територия на езерото* Пода, област Бургас, с GPS координати: 42.449780; 27.464885. Засегнатият вид бе Кълроглав пеликан (*Pelecanus crispus), като бе засегнат само един индивид (*case fatality rate - 100%.) Шест дни по-късно, на 30.01.2015г. бе докладвано вторично огнище на инфекцията този път при домашни птици, във ферма тип „заден двор“ в Бургаска област. Умират 20 кокошки от наличните 22, останалите 2 са унищожени. Заболеваемостта бе 100%, смъртността 90,91%, а леталитета - 90,91%. При аутопсията са наблюдавани характерни патологоанатомични признаци за високопатогенната инфлуенца по птиците (точковидни кръвоизливи по вътрешните органи и от вътрешната страна на коремната кухина, тъмно сини менгуши и гребен). Третичното огнище на болестта бе установено само след няколко дни. На 04.02.2015г. се доказа високопатогенна инфлуенца и при две синантропни птици – речна чайка *(Larus ridibundus)* и скален гълъб *(Columbia livia),* отново в Бургас. (леталитет - също е 100%).

След едномесечно „затишие“ на 22.03.2015 г. HPAI H5N1 напомня за себе си. Четвъртото огнище бе установено в Биосферен резерват Сребърна, а засегнат индивид бе за втори път кълроглавият

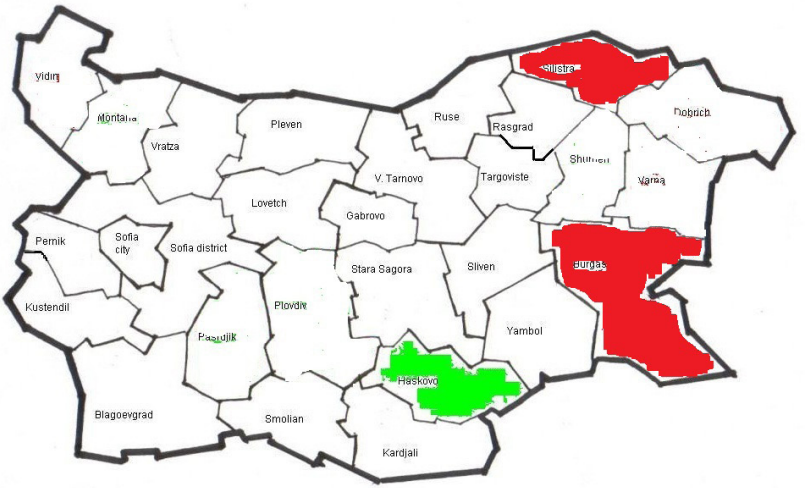
пеликан (*Pelecanus crispus)*. При спешна акция на служителите в резервата са установени 29 мъртви пеликани, при които по късно лабораторно потвърдихме високопатогенна инфлуенца субтип H5N1. Труповете са били видимо кахектични, в недобро състояние, теглото им било едва 5 кг при норма (9-9,5 кг.). В резервата към този момент е имало 65 двойки кълроглави пеликани. Успяхме да изчислим заболеваемост и смъртност, тъй-като имахме информация за големината на популацията. Заболеваемост-22,3%, смъртност-22,3%, леталитет-100%.

На 25.03.2015г, в деня на потвърждаване на високопатогенната инфлуенца в България, Румъния докладва за HPAI H5N1. В биосферен резерват край гр. Констанца, където са открити 64 трупа на пеликани на остров Ceaplace, в езерото Sinoe. Този район се намира на границата между областите Тулча и Констанца. Общият брой на пеликаните първоначално е наброявал повече от 250 птици - възрастни и млади. С изключение на мъртвите пеликани (намиращи се в различни стадии на разлагане), при други птици не са наблюдавани клинични признаци в областта.

В рамките на няколко седмици постепенно интензитета на заболелите и умрелите птици намаля, както в България, така и в Румъния.



Карта показваща координатите на положителните проби от диви птици (A, C, D, E, F) и огнището при домашни кокошки (B) в България, както и кординатите на огнището регистрирано в Румъния при диви птици (G) през 2015 г.



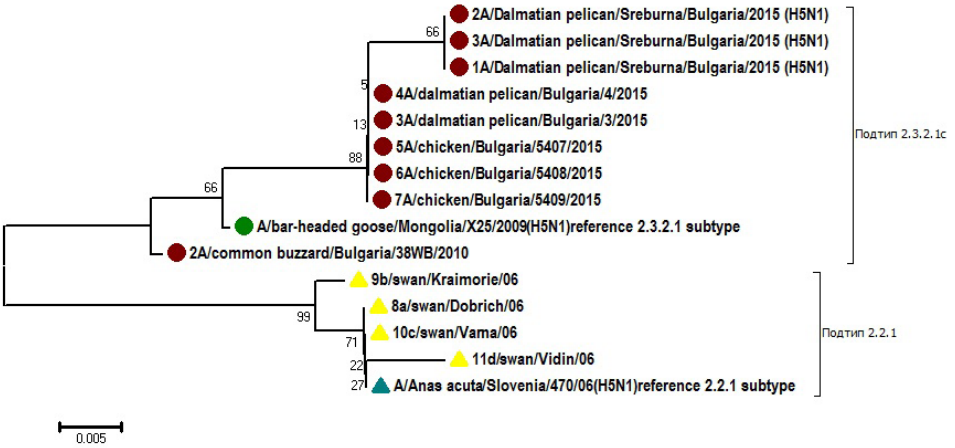
Карта на България показваща засегнатите области през 2015г.
■ – високо патогенна инфлуенца; ■ – слабо патогенна инфлуенца

Констатираните огнища на инфекцията в страната за периода 2014-2016 г. са 4, а периода, през който са установени случаите е от януари до март 2015 г. След което не се установяват нови случаи на заболяването. Най-засегнатият вид е кълроглавият пеликан, мигриращa птица пряко свързана с водните местообитания. Впечатление правят случаите на HPAI при двете синантропни птици, едната от които не е пряко свързана с водните местообитания. При анализа на старите случаи на инфекцията в страната ни през 2006 г. и 2010 г. при дивите птици, констатирахме различни засегнати видове. През 2006 г. мигриращи птици свързани с водните местообитания, а

При сравнението на нуклеотидните и аминокиселинните последователности на HA ген на вирусите от подтип 2.3.2.1c изолирани в България през 2010 г. и 2015 г. (*A/Common Buzzard/38WB/2010, A/Dalmatian pelican/Poda/Bulgaria/2015 и A/Chicken/Konstantinovo/Bulgaria/2015)* открихме само една разлика в нуклеотидните последователности между *A/Dalmatian pelican/Poda/Bulgaria/2015 и A/Chicken/Konstantinovo/Bulgaria/2015,* която не рефлектира върху АК последователности. При *A/Common Buzzard/38WB/2010* установихме множество различия в нуклеотидните последователности спрямо другите 2 вируса изолирани през 2015 г., които рефлектират в 9 различия при АК последователности.

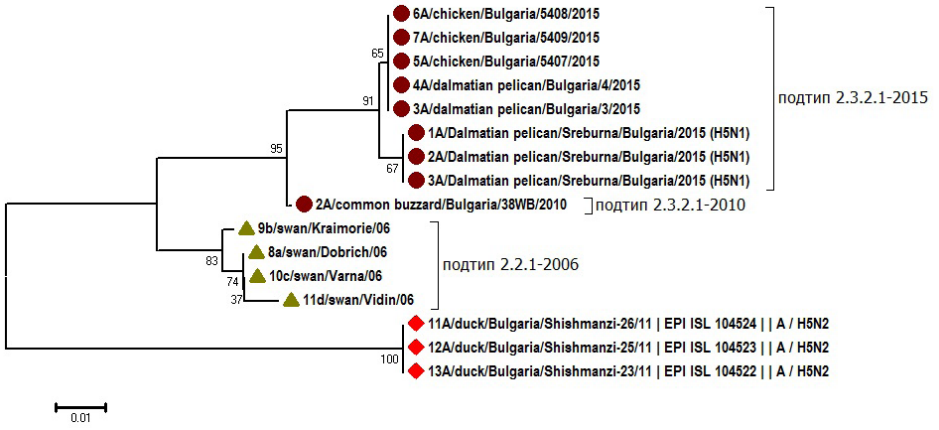
При изготвянето на филогенетично дърво само на изолираните

в България високо патогенни H5N1 вируси ясно се вижда, че тези от 2006г. изолирани от неми лебеди *(Cygnus olor)* оформят самостоятелен клон, а *A/Common Buzzard/38WB/2010*, *A/Dalmatian pelican/Poda/ Bulgaria/2015*, *A/Chicken/Konstantinovo/Bulgaria/2015, A/Dalmatian pelican/Sreburna/ Bulgaria/2015* са-по близки по между си с малки разлики. A/CommonBuzzard/38WB/2010 е най-отдалечен от групата на вирусите от подтип 2.3.2.1 (фиг.40).



Филогенетично дърво на всички HPAI H5N1 вируси изолирани в България. Изготвено с програмата MEGA 7.0, по метода Neighbor-Joining. Филогенетичното дърво е изготвено на базата на 260 бозови двойки от секвенциите на сегмент 4 (HA) на вирусите. Със зелен кръг и син триъгълник са отбелязани съответно референтни вируси от подтип 2.3.2.1c и 2.2.1. добити от Influenza research database.

Направихме филогенетичен анализ на всички вируси от субтип H5, изолирани в България. Освен представените вече HPAI H5N1 вируси в страната ни бяха изолиран и няколко LPAI от субтип H5N2 от патици - мюлари. При филогенетичен анализ се вижда, че *A/duck/Bulgaria/Shishmanzi и A/swan/Vidin/06, A/swan/Varna/06, A/swan/ Kraimorie/06, A/swan/Dobrich/06* се клъстерират в отделни клонове, което подсказва за различията им с изолатите от 2010г. и 2015г. .



Филогенетично дърво на всички H5 (HPAI, LPAI) вируси изолирани в България до момента. Изготвено с програмата MEGA 7.0, по метода Neighbor-Joining. Филогенетичното дърво е изготвено на базата секвенции от 260 базови двойки на сегмент 4 (HA) на вирусите.

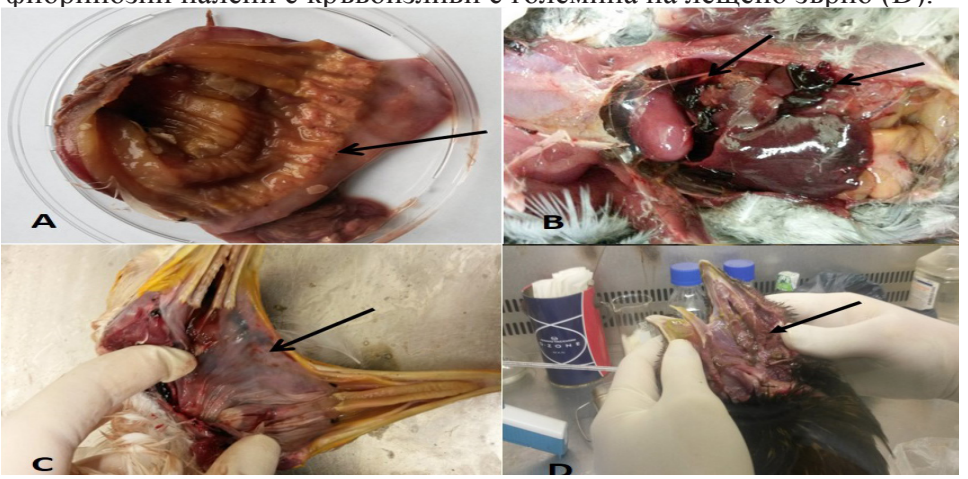
Засегнатите видове диви птици от HPAI H5N1 през 2015г. са: скален гълъб (Columbia Livia), речна чайка (Larus ridibundus) и кълроглав пеликан (Pelecanus crispus). Патологоанатомичните промени са съсредоточени в мозъка и мозъчните обвивки (кълроглавите пеликани), устната лигавица и мускулестия стомах (речна чайка), белите дробове (скален гълъб).

8.2. *Патолого-анатомични особености*

При първата поява на заболяването при кълроглав пеликан не разполагахме с цял труп, а само с малки парчета от трахея, бял дроб и клоака. При огледа им не установихме макроскопски изменения.

При следващите два случая на високопатогенна инфлуенца по дивите птици (HPAI) при скален гълъб (Columbia livia) и речна чайка (Larus ridibundus) не установихме патологични изменения по кожата по време на външния оглед. Охранеността на умрелите птици беше добра. След отваряне на плевроперитонеалната кухина не бяха установени видими външни промени в слезката и черния дроб,

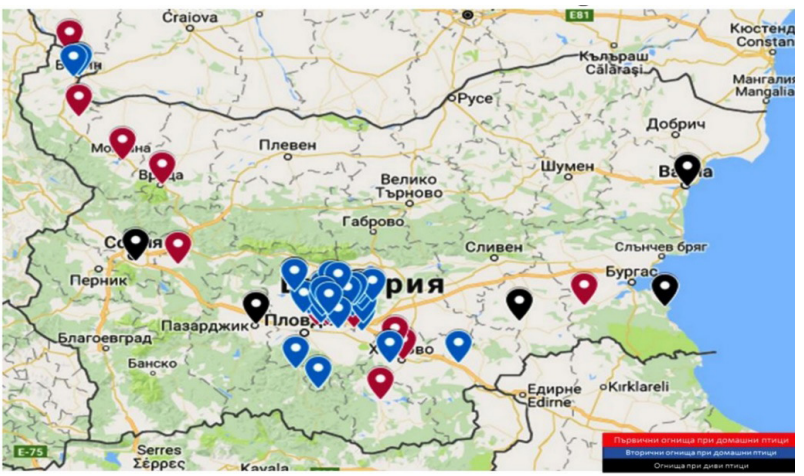
както и в техните размери, консистенция и цвят. При скалния гълъб установихме 2 масивни кръвоизлива в коремната кухина-единият в близост до черния дроб (B), а другият в основата на сърцето (B). Белият дроб беше хиперемиран с множество петехиални кръвоизливи. Не открихме изменения в размерите, цвета и консистенцията на органите на храносмилателната система. При речната чайка констатирахме петехиални кръвоизливи по устната лигавица (C) и такива по мускулестия стомах (A). В другите органи не бяха установени видими външни промени. При огнището при кокошки носачки наблюдавахме характерните патологоанатомични изменения. Множество кръвоизливи по вътрешните органи, като започнем от тези на дихателната система (бял дроб едематизиран, с кръвоизливи паренхима му). По лигавицата на устната кухина наблюдавахме фибринозни налепи с кръвоизливи с големина на лещено зърно (D).



Патологоанатомично изследване при естествена инфекция с H5N1 през 2015г.
(A)-Мускулест стомах от речна чайка, с характерни точковидни кръвоизливи. (B)-Масивни кръвоизливи около черният дроб (стрелките) предизвикани от патогенното действие на Influenza A/Columbia livia /Burgas/Bulgaria/2015(H5N1). (C)- Петехиални кръвоизливи по устната лигавица на речна чайка заразена с Influenza A/Larus ridibundus/Burgas/Bulgaria/2015(H5N1). (D)-фибринозни налепи и кръвоизливи с формата на лещено зърно по лигавицата на устната кухина на кокошка (Gallus Gallus domesticus).

9. Навлизане, разпространение и епизоотологични особености на HPAI H5N8 в България

В България за първи път вирусът от серотип H5N8 бе установен на 19.12.2016г. във Видинска област при кокошки, фазани и токачки. За целия сезон 2016/17г. са доказани над 60 епизоотични огнища на инфлуенца при домашни птици в 14 административни региона на България: Видин, Монтана, Враца, София-окръг, Пазарджик, Пловдив, Стара Загора, Хасково, Кърджали, Ямбол, Бургас, Варна, Добрич, София-град и над 10 случая при диви птици в Ямболска, Пазарджишка, Варненска, Бургаска и Добричка област. Засегнати са 44 големи ферми с патици отглеждани за угоен черен дроб (от 200 до 62 000 бр.) и една ферма с 38 000 кокошки носачки.



Фиг. Карта илюстрираща огнищата в България към 16.1.2017 г.

Първични огнища при домашни птици

Вторични огниша при домашни птици

Огнища при диви птици

Брой на случаите на HPAI H5N8 в България за сезона 2016/17 г.

Дата на лабораторно потвърждение	Брой огнища
19.12.2016	5
20.12.2016	1
21.12.2016	1
22.12.2016	1
23.12.2016	1
28.12.2016	4
29.12.2016	1
30.12.2016	11
4.1.2017	5
5.1.2017	4
6.1.2017	6
9.1.2017	10
11.1.2017	8
12.1.2017	2
13.1.2017	3
16.1.2017	1

Пикът на диагностицираните случаи бе 30.12.2016г., а първият случай бе на 19.12.2016г.. Времето на възникването на първите огнища е по-различно спрямо другите случаи на навлизания на инфлуенца А вируса в страната ни през 2006г., 2010г. и 2015г., при които случаите

са от януари до март. Това „ранно“ проявление на HPAI H5N8 през сезона 2016/17г. се дължи на по-ранното разпространение на вируса по хоризонталните миграционни пътища в Европа и неблагоприятните климатични условия в Сибир при ранното настъпване на зимата през късната есен на 2016г. в Европа и Азия.

9.1. *Епизоотологични особености*

При първите случаи на инфекцията в страната ни се наблюдаваха следните епидемиологични показатели. В Ново село видинско е засегната ферма тип заден двор с кокошки носачки като 25 са били възприемчивите птици, от тях 18 са показали клинични признаци и в последствие са умрели. На базата на тази информация изчислихме заболеваемостта-72%, смъртността-72% и леталитета-100%. При второто констатирано огнище в гр. Видин отново ферма тип заден двор с възприемчиви 148 птици 22 са засегнати като от тях всички са умрели. Заболеваемост-14,86%, смъртност-14,86% и леталитет-100%. За отбелязване е че това е смесено стопанство т.е. отглеждат се различни видове птици: кокошки носачки, фазани, токачки, пъдпъдъци, патици, пуйки. Като най засегнати са били кокошките, токачките и пуйките. Третото огнище отново в гр. Видин отново ферма тип заден двор смесено стопанство. Видовете птици отглеждани в него са различни, като най много са гълъбите. Общият брой птици е 105, а гълъбите са 41 броя. Освен тях в стопанството се отглеждат кокошки, токачки, патици, пуйки, гъски. Заболеваемостта е 11,43%, смъртност-11,43%, леталитет-100%. За отбелязване е фактът, че в това огнище нямаме данни за клинично проявена инфекция при гълъбите и при зеленоглавите патици. Следващото огнище е в град Враца при зеленоглави патици отглеждани във ферма тип заден двор. Общият им брой е 940, като от тях 4 са показали клинични признаци на лека умърлушеност, залежаване и отказ от храна, но не е наблюдавана смъртност. Заболеваеммост-0,43%, смъртност и леталитет-0%. Следващото констатирано огнище е в южната част на страната в село Маноле пловдивско. Засегната е ферма за патици мюлари с общ брой 3150 от които 6 са показали известни клинични признаци, които са породили съмнение за инфлуенца А по птиците. Заболеваемост-0,20%, като процента смъртност и леталитет е нула. При анализа на огнищата, географското им разположение концентрацията на птицевъдни обекти в областите, в които е установено заболяването може да се предположи,

че най-вероятно имаме минимум два независими пътя на интродукция на заболяването. Познавайки и технологията на отглеждане на патиците мюлари и това, че при тях циркулират множество слабо патогенни инфлуенца А вируси не изключва възможността те да са станали градивен материал за образуването на високопатогенен щам.

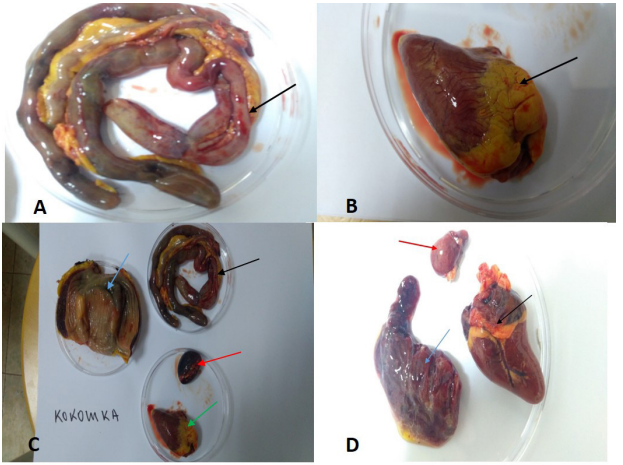
След епидемиологичното проучване за развитието на заболяването в Северозападна България се установи, че повечето огнища имат връзка по между си. Огнищата във Видин и региона са в следствие на интродуцирането на зеленоглави патици закупени от пазар за живи птици в града. Собственикът на фермата със зеленоглави патици от гр. Враца (четвъртото констатирано огнище) е продал няколко птици, които не са показвали клинични признаци, но са били носители и разпространители на вируса. По-късно след въвеждането им във фермите тип заден двор във Видин и региона, те са станали причина за възникването на огнищата там. Зеленоглавите патици отново затвърждават реномето си на „троянски кон“, тъй-като те в случая се явяват безсимптомни носители и разпространители на инфекцията. Най-вероятният път на заразяване на зеленоглавите патици е чрез мигриращи диви птици, тъй-като биосекюрити мерките в стопанствата тип „Заден двор“, в каквото те са отглеждани са по-ниски.

Когато разгледаме случаите в централна и югоизточна България и видим концентрацията на ферми за патици мюлари и броя им в този регион и съпоставим това с внасянето на еднодневни патета по същото време от Унгария (страна в която по това време има обявени над 40 огнища), можем да предположим, че най-вероятно вирусът е навлязъл по този начин. След което се е разпространил и в другите ферми на базата на някои пропуски в биосекюрити мерките в различните ферми. Има обаче вероятност вирусът да е навлязъл и чрез мигриращите диви птици. Не изключваме и трети вариант, в които нископатогенните вируси циркулиращи в популациите от патици мюлари да са станали градивен материал за нови високопатогенни вируси. За да кажем, обаче от къде точно е навлязъл вируса и коя е причината за възникване на заболяването е необходимо да бъдат секвенирани вирусите и изготвен филогенетичен анализ.

На базата на епидемиологичните данни можем да кажем, че най-възприемчиви са кокошките (*Gallus Gallus domesticus*), пуйките (*Meleagris gallopavo*), токачки (*Numida meleagris*), а зеленоглавите патици са безсимптомен носител и разпространител на инфекцията, което е подкрепено и от множеството литературни данни.

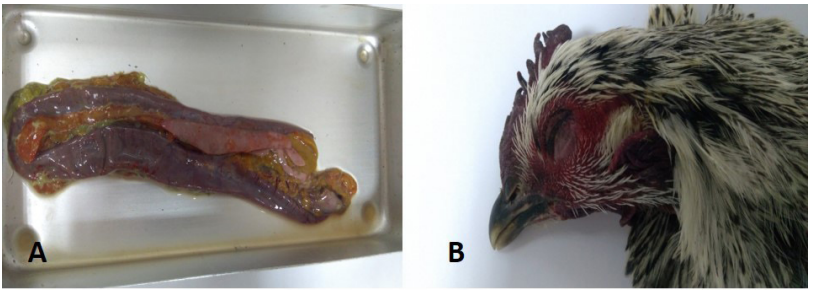
9.2. *Патолого-анатомични особености*

При патологоанатомичните изследвания при домашните птици установихме множество изменения. Най-много поражения открихме при кокошки (*Gallus Gallus domesticus)* и при токачки (*Numida meleagris*). Те бяха съсредоточени в храносмилателната система. Открихме множество петехиални кръвоизливи по лигавицата на мускулестия стомах, уголемена слезка със субкапсуларни кръвоизливи с големината на просено зърно и множество подобни на тях кръвоизливи по серозата на червата. Засегнат беше и сърдечния мускул с кръвоизливи по епикарда и мастната тъкан на сърцето. При токачките поражения открихме и в дихателната система. Белия дроб беше едематизиран. Наблюдавахме белодробна конгестия комплицирана с кръвоизливи в паренхима подобни на тези констатирани при кокошките, а също и наличие на кърваво-пенеста течност в главните бронхи. Измененията в сърцето и слезката бяха подобни на тези при кокошката с тази разлика, че слезката не беше увеличена. При зеленоглавите патици не констатирахме макроскопски изменеия.



Патологонатомични изменения при кокошки и токачки. (A) черва (кокошка) кръвоизливи във вид на петехии и екхимози. (B) Сърце с множество петехиални кръвоизливи по епикарда и сърдечната мазнина. (C) Характерни кръвоизливи по лигавицата на мускулестия стомах (синята стрелка), серозата на червата (черната стрелка), субкапсуларни на слезката (червената стрелка), сърце (зелената стрелка). (D) Характерни патологоанатомични изменения при такачки. Увеличена слезка с множество милиарни субкапсуларни кръвоизливи (червената стрелка), белодробна конгестия с кръвоизливи в паренхима (синята стрелка), сърце с точковидни кръвоизливи по епикарда и сърдечната мастна тъкан (черната стрелка).

Наблюдавт се и характерно посиняване на гребена и менгушите при домашните кокошки и множество кръвоизливи по панкреаса при токачки.



10. Заключение

До края на месец януари 2017г. в Националната референтна лаборатория по Инфлуенца А и Нюкясълска болест HPAI H5N8 в България беше доказан и при други диви и зоопаркови птици: чапли (*Ardea*), сови *(Asio otus*), лебеди (*Cygnus olor*), орехчета *(Troglodytes troglodytes*), пеликан (*Pelecanus)*, лебедопадобни гъски (*Anser cygnoides*), лиска (*Fulica atra)*. При всички огнища на инфекцията при диви птици леталитета бе 100%.

Ако сравним епизоотиите през 2015г. и 2016/17 г. ще видим че през 2016/17г. спектърът на заболелите видове диви птици е доста по-голям, което може би косвено потвърждава резултатите на холандската референтна лаборатория, че количеството излъчван вирус при патиците, заразени с HPAI H5N8 е много по-високо в сравнение с други вируси. Колкото повече вирус е излъчен толкова по голяма е възможността да бъдат заразени повече птици. Хоризонталната реализация на инфекцията е много по-голяма в сравнение с тази през 2015г. При сравнението на епизоотологичните показатели за напрегнатост и тежест през 2015г. и тези през 2016/2017г. и патологоанатомичните особености можем да кажем, че вирусът през 2015г. е по силно патогенен 90,91% заболеваемост при домашни кокошки и 100% леталитет и засягане на почти всички вътрешни органи с наличие на макроскопски изменения в тях. През 2016/2017г. при домашни кокошки 72% заболеваемост и 100% леталитет като макроскопските изменения са съсредоточени в някои органи в зависимост от засегнатите видове птици.

Що се отнася до разпространението на вируса през 2015г., наблюдавахме единични случаи при диви птици и само едно огнище при домашни птици (кокошки във ферма тип заден двор), докато през 2016/2017г. над десет огнища при диви и множество такива при домашни птици във ферми тип заден двор и ферми за патици мюлари. Само една засегната ферма при кокошки носачки бе установена през 2016/2017г. На базата на тези сравнения може да се заключи, че по-голямото разпространение на вируса през 2016/2017г. се дължи от една страна на биологичните му особености (висока степен на излъчване), а от друга на ниското ниво на биосигурност във фермите с патици-мюлари. Освен това остават за изясняване и редица нови въпроси:

- Защо през сезона 2016/17г. HPAI H5N8 се разпространи главно в Европа? В Европа бяха засегнати 29 страни с над 2700 епизоотични огнища и случаи при диви и зоопаркови птици, Единични случаи на HPAI H5N8 бяха регистрирани само в 7 други страни от Азия, Близкия Изток и Африка.
- Какъв е потенциалът за по-нататъшна еволюция на HPAI H5N8 и има ли той възможности за още по-широко пандемично разпространение?
- Възможно ли е неговото загнездване по подобие на вирусите, циркулиращи в Югозападна Франция (3 HPAI H5N1, H5N2 и H5N9 и 2 LPAI - H5N2 и H5N3) със засягане на други страни с интензивно отглеждане на водоплаващи за угоен патешки и гъши дроб?
- Защо през сезона 2016/17г. е толкова висока смъртността при дивите водолюбиви птици, както и толкова широк спектъра на засегнати диви мигриращи, местни синантропни и зоопаркови птици?
- Защо въпреки засилените мерки за биосигурност на фермите в различни страни от Западна и Централна Европа вирусът H5N8 продължи да нанася щети на промишленото птицевъдство?

11. Изводи:

• Вирусът на Високопатогенната инфлуенца А по птиците H5N8 от генетичен Clade 2.3.4.4., за разлика от субтиповете H5N8, описани по-рано в Южна Корея през 2014/15 г. (подобни на Buan2, група А) попада в групата на HPAI H5N8 вируси (Gochang1-подобни) и образува нова, транс-континентална подгрупа В (icB1), означавана още като UN HPAI H5N8. По този начин, вирусите на HPAI H5N8 от 2014г. и 2016г., циркулирали в Европа **имат дотатъчни различия в гена на хемаглутинина (HA)**, които различия предполагат достатъчно антигенни генетични вариации, които на терена се **представляват чрез техните отделни фенотипни свойства**.

• Вирусът HPAI H5N8, от генетичен Clade 2.3.4.4., добре се съхранява в Азия, с трайно поддържане в популациите от чувствителни птици, и с възможност за устойчива екологична циркулация в Китай, Южна Корея и Япония (може би по подобие на HPAI от субтип H5N1, от Clade 2.2.1., в Египет);

• Вирусът HPAI H5N8 2016/17 г. се характеризира с висока степен на отделителство, както от респираторния тракт на птиците, така и с фекалните маси на заразените птици;

• Повишената вирулентност и патогенност на вирусите за домашни и диви птици доведе до безпрецедентна епизоотия в Европа, с над 2 730 огнища и случаи на засегнати домашни, диви или зоопаркови птици;

• Способността на HPAI H5N8 вирусът да се размножава успешно в дихателния и чревния тракт на заразените патици доведе до ускорена циркулация, повишени титри на излъчване и увеличи възможността за предаване на инфекцията между птицефермите;

• Този вирус на Инфлуенца А от щам H5N8 се разпространява с непозната до момента бързина в сравнение с всички останали познати досега високопатогенни Инфлуенца А вируси, регистрирани преди това в Европа (H5N1, H7N1 и H7N7). В България за 14 дни (27.12.2016 г. – 09.01.2017 г.) инфекцията бе доказана в 45 ферми за патици и една за кокошки носачки;

• По отношение на продължителността на епизоотията, случаят също е уникален –повече от 6 месеца (с начало 26.10.2016г.) с признаци на затихване след 20 март 2017 г. От ноември 2016 г. до 01 април 2017 г., в системата за обявяване на болестите в Европейския съюз (ADNS)

ежедневно са обявявани десетки епизоотични огнища в големи ферми в Германия, Холандия, Обединеното Кралство и Франция. Само за една седмица през март 2017 г., в Германия са обявени засегнати ферми с 12 000 гъски, 6 000 пуйки, 22 000 кокошки носачки, 9 000 патици, 4 000 бройлери;

• Изключително студената зима също бе един от най-важните фактори за широкото разпространение на вируса. В продължение на повече от два месеца в Централна и Източна Европа и Балканския полуостров, температурите достигаха до минус 25° С. Експерти от Германия посочват, че при такива условия 80% от реките, езерата и други водоизточници замръзват и дивите птици търсят вода и храна в птицеферми и дворове, което спомага за разпространението вируса. През януари 2017 г., когато възникнаха най-много епизоотични огнища в Пловдивска, Старозагорска и Хасковска области, температурите бяха предимно минусови (до минус 15° С);

• Видовото разнообразие при засегнатите диви птици достигна до 87 вида, като обхвана, както прелетни водолюбиви, така и местни грабливи и синантропни. Забележително бе и поразяването на големи популации на колхидския фазан;

• Нивото на риска за повечето страни в Европа се определяше като „висок“ по отношение на възможността за проникване на заразени диви птици при тяхната миграция. С напредване на епизоотията разпространението ставаше все по-широко и не съвпадаше точно с основните хоризонтални миграционни пътища на птиците;

• Епизоотологичните данни за Европа показват още, че е възможно проникването на вируса на HPAI от субтип H5N8 в промишлените комплекси (особено в Германия, Холандия, Обединеното кралство) да е станало по индиректен път, чрез контаминирани фуражи, хора, превозни средства, вода или други непреки начини на пренасяне на инфекцията;

• След първите случаи на пренасяне на заразата с дивите прелетни птици, обхватът на засегнатите ферми при вторичните случаи при местни диви, синантропни и грабливи птици в Европа следва да се разглежда като пряко отражение на временните местообитания и по-кратките миграции на заразените с вируса птици, свързано с търсенето на храна и питейна вода, на фона на тежките климатични

условия през тази зима в Европа;

• Това улеснява предаването на инфекцията на птиците от т.нар. „заден двор“, особено при наличие на контакт между домашни водоплаващи и диви прелетни птици, по езерата и изкуствените водоеми;

• След овладяване на епизоотичната ситуация е необходимо да се прецени, доколко използваните досега технологии за отглеждане на патици-мюлари в България могат да се прилагат и в бъдеще. Бързото разпространение на вируса във фермите за патици, за производство на угоен черен дроб в областите Пловдив, Стара Загора и Хасково показа, че съществуват множество необезопасени технологични връзки и липса на условия за провеждане на мероприятията за осигуряване на необходимото ниво на биосигурност на фермите;

• През сезона 2016/17 г. генетичният Clade 2.3.4.4. на HPAI H5N8 бе третият, след Clade 2.2.1. и Clade 2.3.2.1c на HPAI H5N1, който има способността да „мигрира“ от Азия заедно с прелетните водолюбиви птици по миграционните пътища и да засяга други континенти, проявявайки своя пандемичен потенциал;

• Епизоотичните огнища в Европа, причинени от субтип H5N8, във ферми със затворен производствен цикъл и наличие на системи за биосигурност поставят с голяма острота въпросът за преоценка на съществуващите мерки за биосигурност на производствените единици (отглеждането на открито крие риск);

• Представените резултати за разпространението на инфлуенца А по време на епизоотията в България през 2016/17 г., биха могли да послужат за количествена оценка на риска за птицевъдния отрасъл и да се използват за повишаване на чувствителността на системата за ранно предупреждение и контрол на Инфлуенца А по птиците **(scientific risk based surveillance)**;

• Наблюдавана е взаимовръзка между географското местоположение на фермите и честотата на инфекцията с HPAI H5N8 при патици мюлари и гъски за угоен черен дроб във Франция, Унгария и България (в областите Пловдив, Хасково и Стара Загора);

• Високата концентрация на огнища от HPAI H5N8 в региони на страната, различни от определените в Националната програма за надзор на заболяването, налага преоценка на определените към момента рискови зони, на основата на внимателен преглед и анализ

на факторите, спомогнали за това масово проявление на болестта в областите Пловдив, Хасково и Стара Загора **(evidence based risk assessment).**

12. Препоръки:

• На основата на внимателно и задълбочено изясняване на причинно-следствените връзки между огнищата от HPAI H5N8, във фермите с патици мюлари в България през сезона 2016/17 г., чрез използването на математически и молекулярно-биологични методи за анализ (молекулярна епизоотология), следва да се направи цялостно преразглеждане на рисковите зони за проникване и разпространение на Инфлуенца А вирусите в тези области. Това ще бъде достатъчно аргументирано основание за включването им в обхвата на Националната програма за надзор на Инфлуенцата по птиците, изпълнявана от БАБХ;

• При водоплаващите птици естествено циркулират голям брой вируси с ниско-патогенна антигенна характеристика и при тях пасивният надзор най-често не е ефективен;

• Необходимо да се извършва постоянен целогодишен активен вирусологичен надзор на циркулиращите Инфлуенца А вируси във фермите за отглеждане на патици мюлари в България, както и да се обърне внимание на възможността за включването на подотрасъла отглеждане на патици за угоен черен дроб в обхвата на Националната програма за надзор на Инфлуенца А по птиците;

• Необходимо е преразглеждане и усъвършенстване на Наредба 44 за ветеринарномедицинските изисквания към животновъдните обекти и включване на подотрасъла отглеждане на патици за угоен черен дроб, като равнопоставен подотрасъл на птицевъдството в нея, заедно с всичките научно обосновани норми от зоотехническа, ветеринарно-здравна и епизоотологична гледна точка;

• Необходимо е да се направи сериозна преоценка на: системите за биосигурност, използвани в промишленото птицевъдство, на разделното отглеждане на различните производствени групи птици, подобряване на мерките за хигиена, дезинфекция и дератизация, където е необходимо, особено в рисковите за проникването на вируса места;

• Може да се помисли за рационализиране и промяна в

цикъла на отглеждане на патиците (люпене, отглеждане, гушене и клане), като активният сезон за отглеждане да бъде през летните месеци, а интензитета да се намали през зимните месеци и се избегне отглеждането им на открито (предложение от бизнес операторите);

• Използване на собствени транспортни лицензирани средства от бизнес операторите за превоз на живи птици и затваряне на технологичния цикъл, със съкращаване на фазите за преместване на патици по него на 2 – зареждане, отглеждане, гушене и транспорт до кланица (предложение от бизнес операторите);

• Съществуващият проблем с люпилните, повечето от които са от смесен тип, следва да се разреши чрез усъвършенстването и подходящото оборудване, и те безопасно да се използват за люпене, както на кокошеви, така и на водоплаващи птици (предложение от бизнес операторите).

13. Оценка на рисковете за общественото здраве:

• На този етап рискът от възникване на тежки епидемии при хора, причинени от субтип H5N8, се счита за много нисък;

• До този момент не са регистрирани случаи на човешки грип А при инфекция с HPAI H5N8 въпреки, че голям брой хора бяха изложени на контакт с този вирус при управлението на огнищата на заболяването по време на епизоотиите през 2014 г. и 2016-17 г. в Европа;

• Тази оценка, направена от Европейският център за контрол на заболяванията (ECDC) и Европейският орган по безопасност на храните (EFSA), рязко контрастира с риска за човешкото здраве от предаване на друг HPAI H5N1. Това вероятно се дължи на специфичните рецептор-свързващи свойства на вируса от субтип H5N8, които се адаптират по-добре към птичи-подобните сиало-свърващи рецептори (алфа 2-3) от чревния тракт, отколкото аналогичните рецептори (алфа 2-6) от респираторния тракт на човека;

• От друга страна, увеличеното географско разпространение на HPAI H5N8, както и честота на контакти с други бозайникови видове, налага постоянен мониторинг на огнищата от Инфлуенца А при птици, засегнати от този субтип;

• Опасенията сред ветеринарните лекари са основателни и те включват потенциалната способност на Инфлуенца А от субтип H5N8

не само да заразява бозайници, като котки и кучета, но и непрекъснато да еволюира и да се променя с непредвидими последици за патогенност, вирулентност и спектър на гостоприемници;

• Това налага въвеждането на предпазни мерки, за да се намали рискът от експозиция за тези животни и най-вече за хората, влизащи в тесен контакт с птици;

• Епидемиологичните данни и генетичният анализ на другия ново появил се през сезона 2016/17г. HPAI вирус от субтип H5N6 в Европа показват, че той е все още много по-адаптиран към организма на птиците, отколкото на човека и не засяга неговите α2.6 сиалови рецептори в респираторния тракт; Този вирус е коренно различен от HPAI H5N6, който в момента циркулира в Азия (Китай и Виетнам) и който е силно патогенен за човека;

• Независимо от това HPAI H5N6 също остава заплаха за общественото здраве и заедно с другите вируси на HPAI H5N5 и LPAI H7N7, циркулирали и изолирани в Европа през сезона 2016/17 г. следва да бъдат във фокуса на надзора на Инфлуенца А от специализираните вирусологични лаборатории (ветеринарни и хуманни).

Литературни източници:

1. Гужгулова Г (2010). Дисертация "Етиологични и молекулярно епизоотологични проучвания на вируси на Инфлуенца А по домашните и диви птици, изолирани в **България**", Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт проф. д-р Георги Павлов, София, 2010 г., 1-
2. Гужгулова Г., Стоименов Г., 2015. Генетична еволюция и произход на високопатогенната Инфлуенца А по птиците от серотипове H5N2 и H5N8 в Азия, Европа и Северна Америка. Ветеринарна сбирка ISSN 0205-3829 бр. 1-2 стр. 20-22.
3. Иванов Я, Караджов С, Кесякова С, Филипов Ч, Пепович Р (2012). „Ветеринарна епидемиология и превантивна медицина (Обща епизоотология)", София
4. Маринова-Петкова А (2012). Дисертация „Проучвания върху екологичната циркулация и молекулярната епизоотология на Инфлуенца А вирусите по домашните и диви водоплаващи птици в България", Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт проф. д-р Георги Павлов, София, 2012 г., 1-253.
5. Орешкова Н, Гужгулова Г, Маринова-Петкова А (2006). Инфлуенца А по птиците и познатите сценарии. Ветеринарна сбирка.; 9-10, 32-35.
6. Стоименов Г (2016). Дисертация „Проучвания върху вирусите на Инфлуенца А по дивите птици в България" Лесотехнически университет, София., 2016 г., 1-194.
7. Хаджиев Г (2000). Още за инфлуенцата (грип, H_5N_1) по хората в Хонк Конг, предизвикана от птичи вирус (обзор) Птицевъдство.; 9; 3; 22-25.
8. Austin FJ & Webster RG (1993). Evidence of ortho- and paramyxoviruses in fauna from Antarctica. *J. Wildl. Dis.*, 29 (4), 568-571.
9. Boon ACM, Sandbulte MR, Seiler P, Webby RJ, Songserm T, Guan Y, & Webster RG (2007). *Role of terrestrial wild birds in ecology of influenza A virus (H5N1) Emerg. Infect. Dis.13(11):1720-1724.*
10. Brown JD, Swayne DE, Cooper RJ, Burns RE, Stallknecht DE (2007). Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. Avian Dis. Mar; 51(1 Suppl):285-9.
11. Capua I, Mutinelli F, Bozza MA, Terregino C, Cattoli G (2000a).

Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches (*Struthio Camelus*). Avian Pathology 29:643-646.
12. Chen H, Smith GJ, Li KS, et al. (2006). Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103; 2845-2850.
13. Deibel R, Emord DE, Dukelow W, Hinshaw VS, Wood JM (1985). Influenza viruses and paramyxoviruses in ducks in the Atlantic flyway, 1977-1983, including an H5N2 isolate related to the virulent chicken virus. Avian Diseases 29 (4):970-985.
14. Dimitrov KM, Zarkov IS, Dinev I, Goujgoulova GV, Miller PJ, and Suarez DL (2016). Histopathological characterization and shedding dynamics of guineafowl (Numida meleagris) intravenously infected with a H6N2 Low Pathogenisity Avian Influenza Virus. Avian Diseases, 60:279-285, 2016.
15. Hanson BA, Swayne DE,Senne DA, Lobpries DS, Hurst J and Stallknecht DE (2005). Avian influenza and paramyxoviruses in wintering and resident ducks in Texas. Journal of Wildlife Diseases 41: 624–629.
16. Harder T, Maurer-Stroh S, Pohlmann A, Starick E, Höreth-Böntgen D, Albrecht K, et al. Influenza A(H5N8) virus similar to strain in Korea causing highly pathogenic avian influenza in Germany. Emerg Infect Dis. 2015;21:860–3.
17. Hinshaw VS, Bean WJ, Webster RG, Sriram G (1980). Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks. Virology 102, 412-419.
18. Hinshaw VS, Bean WJ, Webster RG, Sriram G (1980). Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks. Virology 102, 412-419.
19. Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H (1995). Perpetuation of influenza Aviruses in Alaskan waterfowl reservoirs. Archives of Virology 140: 1163-1172.
20. Ivanov ID, Zarkov IS, Koev K (2015). Patho-morphological and clinical examination in experimental infection of Guinea Fowl (Numida Meleagridis) with LPAIV H6N2. Trakia J. Sci. No 2, pp 180-184, 2015.
21. Jeong J, Kang HM, Lee EK, Song BM, Kwon YK, Kim HR, et al. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014. Vet Microbiol. 2014;173:249–57.

22. Kaleta EF, Hönicke A (2005). A retrospective description of a highly pathogenic avian influenza A virus (H7N1/Carduelis/Germany/72) in a free-living siskin (Carduelis spinus Linnaeus, 1758) and its accidental transmission to yellow canaries (Serinus canaria Linnaeus, 1758) Dtsch Tierarztl Wochenschr. Jan;112(1):17-9.
23. Kawaoka Y, Chamber TM, Sladen WL, Webster RG (1988). Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? Journal of Virology, 163, 247−250.
24. Khalenkov A, Laver WG, and Webster RG (2008). Detection and Isolation of H5N1 Influenza virus from Large Volumes of Natural Water, J Virol Methods. April ; 149(1): 180–183.
25. Krauss S, Walker D, Paul Pryor S, Niles L, Chenghong L, Hinshow VS, AND Webster RG (2004). Influenza A viruses in migrating wildaquatic birds in North America. Vector-Borneand Zoonotic Diseases 4: 177–189.
26. Lee DH, Sharshov K, Swayne DE, Kurskaya O, Sobolev I, Kabilov M, et al. Novel reassortant clade 2.3.4.4 avian influenza A(H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016. Emerg Infect Dis. 2017;23:23.
27. Lee DH, Torchetti MK, Winker K, Ip HS, Song CS, Swayne DE. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds. J Virol. 2015;89:6521–4.
28. Lee YJ, Kang HM, Lee EK, Song BM, Jeong J, Kwon YK, et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. Emerg Infect Dis. 2014;20:1087–9
29. Marchenko VY, Susloparov IM, Kolosova NP, Goncharova NI, Shipovalov AV, Durymanov AG, et al. Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014.Arch Virol. 2015;160:2857–60.
30. Morgan IR & Westbury HA (1981). Virological studies of Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. Avian Dis.,(4), 1019-1026.
31. Nagy A, Machova J, Hornickova J, Tomci M, Nagl I, Horyna B, et al. (2007). Highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in Mute swans in Czech Republic. Vet Microbiol. 2007; 120:9–16.
32. Nettles VF, Wood JM, AND Webster RG (1985). Wildlife surveillance associated with an outbreak of lethal H5N2 avian influenza in domestic poultry. Avian Diseases 29: 733–741.
33. Okazaki K, Takada A, Ito T, Imai M, Takakuwa H, Hatta M, Ozaki H, Tanizaki T, Nagano T, Ninomiya A, Demenev VA, Tyaptirganov

MM, Karatayeva TD, Yamnikova SS, Lvov DK, Kida H (2000). Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. Archives of Virology 145 (5): 885-893.
34. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus ADME, AND Fouchier RAM (2006). Global patterns ofinfluenza A virus in wild birds. Science 312:384–388.
35. Ottis K, AND Bachmann PA (1983). Isolation and characterization of ortho- and paramyxovirusesfrom feral birds in Europe. Zentral blatt fur Veterinari medizin Riehe B 30: 22–35.
36. Poen MJ, Verhagen JH, Manvell RJ, Brown I, Bestebroer TM, van der Vliet S, et al. Lack of virological and serological evidence for continued circulation of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in wild birds in the Netherlands, 14 November 2014 to 31 January 2016. Euro Surveill. 2016;21:30349.
37. Pohlmann A, Starick E, Harder T, Grund C, Höper D, Globig A, et al. Outbreaks among wild birds and domestic poultry caused by reassorted influenza A(H5N8) clade 2.3.4.4 viruses, Germany, 2016. Emerg Infect Dis. 2017 Apr
38. Sharp GB, Kawaoka Y, Jones DJ et al. (1997). Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: Distribution patterns and biological significance. J Virol; 71: 6128-6135.
39. Sharp GB, Kawaoka Y, Wright SM, Turner B, Hinshaw V, Webster RG (1993). Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A subtypes. Epidemiology and Infection 110: 161-176.
40. Slemons RD, AND Easterday BC (1975). Thenatural history of type A influenza viruses in wildwaterfowl. In Third international wildlife diseaseconference, L. A. Page (ed.) Plenum Press, NewYork, New York, pp. 215–224.
41. Slemons RD, AND Shieldcastle MC, Heyman LD, Ebednarik K, AND Senne DA (1991). Type Ainfluenza viruses in waterfowl in Ohio andimplications for domestic turkeys. Avian Diseases35: 165–173.
42. Stallknecht DE, AND Shane SM (1988). Host range of avian influenza virus in free-living birds. Veterinary Research Communications 12: 125–141.
43. Suss J, Schafer J, Sinnecker H, AND Webster RG (1994). Influenza virus subtypes inaquatic birds of eastern Germany. Archives ofVirology 135: 101–114.
44. Teifke JP, Klopfleisch R, Globig A, Starick E, Hoffman B, Wolf

PU, et al. (2007). Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenicavian infl uenza virus in mute (Cygnus olor) and whooper (Cygnus cygnus) swans. Vet Pathol. 2007; 44:137–43.
45. Webster RG, Yakho M, Hinshow VS, BEAN WR, AND MURTI KG (1978). Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. Virology 84: 268–278.
46. WHO⁄OIE⁄FAO H5N1 Evolution Working Group, 2012
47. Wu H, Peng X, Xu L, Jin C, Cheng L, Lu X, et al. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses in domestic ducks, eastern China. Emerg Infect Dis. 2014;20:1315–8.
48. Zarkov I, Dinev I (2012). Clinical and morphological studies of ducklings experimentally infected with a H6N2 strain isolate of low pathogen avian influenza A virus. Revue Méd. Vét., 2012, 163, 2, 64-69.
49. Zarkov I, Tsachev I (2011). Detection of antibodies against avian isolate of influenza A virus H6N2 in turkey poults after infection via different routes. Trakia J. Sci. 9, 2: 87-91.
50. Zarkov IS (2006). Survival of avian influenza viruses in filtered and natural surface waters of different physical and chemical parameters. Revue Med. Vet., 157, 10: 471-6.
51. Zhao G, Gu X, Lu X, Pan J, Duan Z, Zhao K, et al. Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. PLoS One. 2012;7:e46183.
52. Zhou LC, Liu J, Pei EL, Xue WJ, Lyu JM, Cai YT, et al. Novel avian influenza A(H5N8) viruses in migratory birds, China, 2013–2014. Emerg Infect Dis. 2016;22:1121–3.

EFSA КОНТАКТЕН ЦЕНТЪР
БЪЛГАРИЯ

Български контактен център,
Център за оценка на риска по хранителната верига
EFSAfocalpoint@mzh.government.bg
http://focalpointbg.com

Дизайн и предпечат: В.Евтимова,
VEvtimova@mzh.government.bg