



DOI 10.5281/zenodo.5512043

Научно становище на ЦОРХВ

относно:

Възможности за поява и разпространение на инфекция с вируса на Треска от Западен Нил в България

Съдържание:

Резюме

1. Въведение
2. Треска от Западен Нил като нозологична единица и характеристика на вируса
3. Проучване за векторите на ТЗН в България и тяхната екологична циркулация
4. Роля на комарите като вектори в разпространението и природната огнищност на болестта. Векторна компетентност и капацитет
5. Исторически данни и епидемична обстановка за Треска от Западен Нил в Европа и Средиземноморието в периода 1979-2012г.
6. Проучване на възможността за проява и разпространение на вируса на ТЗН в България в периода 2010-2015 г.
7. Оценка на риска
8. Изводи
9. Препоръки
10. Използвана литература

(Резюме)

Причинителят на заболяването ТЗН е вирус и спада към семейство *Flaviviridae* на род *Flavivirus*. Вирусът на ТЗН принадлежи към антигенната група на японския енцефалит, която включва също енцефалит от долината на р. Мъри и вирусите на Сейнт Луис. Заболяването е открито в Африка, Европа, Близкия изток, Азия, Океания, а напоследък и в Америка. Естественният цикъл на инфекцията включва птици и комари, най-често от родовете *Culex spp.* и *Aedes spp.* Много видове диви птици играят ролята на усилващи гостоприемници, докато хората, конете и другите бозайници се считат за случайни или „задънени“ гостоприемници на вируса. Птиците (особено дивите прелетни птици) са естествените резервоари, в които вирусът на ТЗН се размножава в големи количества. Поради високата и дълготрайна виремия (20-100 дни), заразените птици са първичен и дългосрочен източник на инфекция за кръвосмучещите комари, които заразяват други птици, както и хора и коне чрез ухапване. През последните години болестта еволюира от

нововъзникваща болест в повечето части на Южна Европа и Средиземноморието в сезонна инфекция и с ендемични особености за много страни. Анализът на научните факти показва, че климатично-географските и екологичните параметри в Южна и Централна Европа са благоприятни за развитието на компетентните вектори - комарите на вируса на ТЗН чрез установяване на връзка между мигриращи, местни птици и други гръбначни животни и човека. Проведените серологични тестове потвърждават, че вирусът на ТЗН циркулира в поне 4 региона на България от три области, включително различни видове животни и птици. Относително високият процент на серопреваленс в тези региони (43,5% - Дуранкулак, 39,7% - Шабла, 28,6% - Тутракан, 30,2% - Св. Оряхово) вероятно се дължи на близкото съвместно съществуване на податливи животни в близост до влажни зони, посещавани от големи колонии от различни видове мигриращи птици, които могат да бъдат носители и източник на ТЗН вирус. Откриването на вирус-специфични антитела срещу ТЗН при еднокопитни животни предполага, че така наречените "мостови" вектори най-вероятно участват в цикъла на предаване на вируса. Това трябва да се вземе предвид при оценката на риска за хората, живеещи в селски райони, населени предимно от възрастни (на възраст > 50 години), групата с най-висок риск от развитие на вирусна невроинвазивна болест при хора. Установено е, че вируси на ТЗН от генетични линии 1 и 2, засягащи хора и еднокопитни, циркулират в Европа. Това определено е необходимо да се подчертае необходимостта от анализ на всяко отделно огнище, което ще предостави повече информация за епидемиологичното значение и опазването на общественото здраве. Компетентните органи трябва да уведомят централните за кръвопреливане, за да тестват кръвните продукти по подходящ начин за вирус на ТЗН.

Possibilities for occurrence and spread of West Nile Fever virus infection in Bulgaria

(summary)

The causative agent of West Nile Disease (WND) is a virus and belongs to the *Flaviviridae* family of the genus *Flavivirus*. The WND virus belongs to the antigenic group of Japanese encephalitis, which also includes the Murray Valley encephalitis and Saint Louis encephalitis viruses. The disease has been found in Africa, Europe, the Middle East, Asia, Oceania, and more recently in America. The natural cycle of infection includes birds and mosquitoes, most commonly from the genera *Culex* spp. and *Aedes* spp. Many species of wild birds play the role of amplifier hosts, while humans, horses and other mammals are considered as incidental or "dead-end" hosts of the virus. Birds (especially wild migratory birds) are the natural reservoirs in which the WNDV multiplies in large amounts. Due to the high and long-lasting viremia (20-100 days), infected birds are a the primary and long-term source of infection for blood-sucking mosquitoes, which infect other birds, as well as humans and horses, through the bite. In recent years the disease has evolved from a new emerging disease in most parts of Southern Europe and the Mediterranean into a seasonal infection and endemic to many countries. The analysis of the scientific facts shows that the climatic-geographical and ecological parameters in Southern and Central Europe are favorable for the development of the competent mosquito vectors of the WND virus by establishing a link between migratory, resident native birds and other vertebrates and man. The conducted serological tests confirm that the WND virus circulates in at least 4 regions of Bulgaria from three districts, including different species of

animals and birds. The relatively high percentage of seroprevalence in these regions (43.5% - Durankulak, 39.7% - Shabla, 28.6% - Tutrakan, 30.2% - St. Oryahovo) are probably due to the close coexistence of susceptible animals in proximity to wetlands, visited by large colonies of various species of migratory birds, which can be carriers and a source of the WND virus. The discovery of virus-specific antibodies to WND in equids suggests that the so-called "bridge" vectors are most likely involved in the virus transmission cycle. This should be taken into account when assessing the risk to people living in rural areas, populated mainly by adult populations (age > 50 years), the group most at risk of developing neuroinvasive disease virus infection. WND viruses from genetic lines 1 and 2 affecting humans and equids have been found to circulate in Europe. This definitely emphasizes the need for analyzing every current outbreak, which will provide more information on the epidemiological significance and the protection of public health. The competent authorities have to notified the blood transfusion centers to test the blood products appropriately at the blood transfusion centers.

Въведение

Треската от Западен Нил – ТЗН (West Nile virus Disease - WNVD) е векторно-предаващо се чрез комари (mosquito-borne) вирусно заболяване. Етиологичният агент е *Flavivirus*, принадлежащ към групата на Японските енцефалитни вируси и техния антигенен на сем. *Flaviviridae* [1]. Заболяването е установено в Африка, Европа, Близкият Изток, Азия, Океания и неотдавна, и в Америка [2, 3]. Естественният цикъл на инфекцията включва птици и комари, най-често от родовете *Culex spp.* и *Aedes spp.* [4, 5]. Много от видовете диви птици играят ролята на амплификаторни гостоприемници [6], докато човекът, конете и другите бозайници се считат като инцидентни или крайни гостоприемници на вируса (dead-end hosts) [2]. Освен това неврологичните заболявания при коне и хора се отбелязват едва от края на 50-те години [7], като инфекцията при хора и коне се открива главно асимптоматично или с умерено фебрилно състояние [8, 9]. Заболеваемостта и силата на симптоматиката при хората зависят от различни фактори, като патогенност щама на вируса на ТЗН и имунният статус на пациента [10]. Екологичните аспекти на инфекцията с ТЗН, включващи комарите, птиците и хората са описани за първи път в Египет през 1950 г. [11]. В последните 30 години различни случаи на инфекция със Западно-Нилска треска при коне и хора бяха обявени в Европа и Средиземноморския басейн. Различни проучвания установиха вирусна циркулация при диви птици и комари, даващи значителен принос за по-ясна картина на циркулацията на вируса на ТЗН в Европа и в други региони на Света. Проучена бе молекулярно-генетичната основа на вируса и бяха дефинирани основните генетични линии 1 и 2. Независимо от извършените проучвания до момента за екологичните аспекти, въввлечени в предаването на вируса на ТЗН и механизмите на вирусното проникване и разпространение в нови територии все още не всичко е напълно изяснено. Циркулацията на вируса на ТЗН в момента е установена в много европейски страни и се очаква нейното по-нататъшно разпространение в следващите години, включително и в съседни на засегнатите до момента страни, където екологичните параметри и климатогеографските условия са благоприятни и където се осъществява тясна връзка между мигриращи, резидентни птици, компетентните комарни вектори, човека и селскостопанските животни. В последните години ТЗН се превръща от ново възникваща инфекция в

повечето райони Европа в една инфекция с ясно изразен сезонен характер и с елементи на ендемичност за много европейски страни. И това не е неочакван феномен на фона на промените в екологичните фактори, като високата концентрация на местни резидентни птици и степента на урбанизация в крайградските райони, където те могат да контактуват с прелетните птици. Възможността вирусът на ТЗН да бъде пренасян от прелетните мигриращи птици извън традиционните екологични ниши на циркулация на този вирус в Африка и с възможността му да се адаптира към местните „bridje“ вектори на фона на наличие по-влажни територии и или локални зони на обилни валежи с наличие на по-висока активност на компетентните вектори-комарите и това да води до епидемични взривове от ТЗН в определени региони. Към днешна дата вирусът на ТЗН е открит както в Стария свят (Европа, Близкия изток, Африка, Индия и Азия), така и в Новия свят (Северна Америка, Централна Америка и Карибите), а също и в Австралия (вирусът Kunjin е подтип на WNV).

1. Заболяването Треска от Западен Нил като нозологична единица и характеристика на вируса

Етиология

Причинителят на заболяването ТЗН е вирус и спада към семейство *Flaviviridae* на род *Flavivirus* (91). Вирусът на ТЗН принадлежи към антигенната група на Японския енцефалит, в която са включени още вирусите на Murray Valley encephalitis и енцефалита Saint Louis. Вирионите имат сферична форма, големина около 50 nm и липидна обвивка, която предпазва разположената във вътрешността едно-верижна (+ss) РНК, състояща се от около 11 000 нуклеотида (Фиг.1). Във вирусната мембрана са разположени повърхностен Е протеин (envelope protein) и мембранен (membrane) М протеин, които са отговорни за голяма част от характеристиките на вируса, като спектър на чувствителни животни, тъканен тропизъм, репликация, място на прикрепяне на вируса, стимулиране на В и Т лимфоцитите.

В 5' края на РНК веригата се намира къс участък, състоящ се от около 100 нуклеотида, който не кодира никаква информация, последван от участък, в който е кодирана информацията за синтез на 3 структурни и 7 неструктурни протеина, в следната последователност: капсид-мембрана- обвивка (envelope)-NS1- NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5. След този участък, в 3' края е разположен участък, състоящ се от около 600 нуклеотида, който не кодира никаква информация. Репликацията на вируса се извършва в цитоплазмата, в близост до ендоплазмения ретикулум (Фиг.2). След репликацията вирусните частици проникват в ендоплазмения ретикулум, от където посредством секреторния апарат напускат клетката (88).

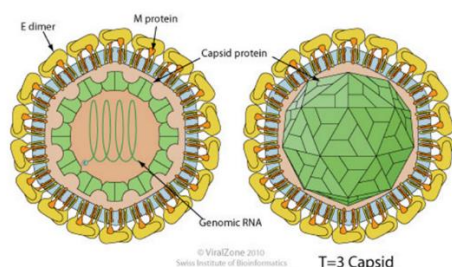
Вирионите проникват в гостоприемниковите клетки чрез рецепторно обусловена фузия (сливане) на двете мембрани. Този процес възниква в следствие на сложни електростатични и физикохимични взаимодействия между повърхностните мембранни протеини (рецептори) на клетката гостоприемник и повърхностните мембранни протеини (рецептори) на вируса, които се ускоряват от ниското рН на ендозомата (96).

Репликацията на вируса се извършва в цитоплазмата клетките (в близост до ендоплазменният ретикулум), при което вирусната РНК играе ролята на и-РНК, която пряко транслира кодираната в нея информация за синтезиране на вирусните белтъци (83).

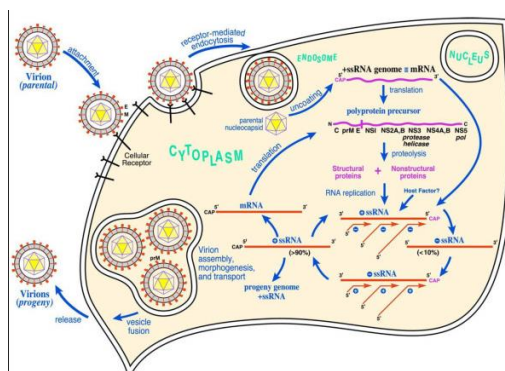
Flaviviridae

Molecular biology

VIRION



Фиг. 1. Структура и морфология на вируса на ТЗН



Фиг.2. Репликация на вируса на ТЗН в инфектираните клетки

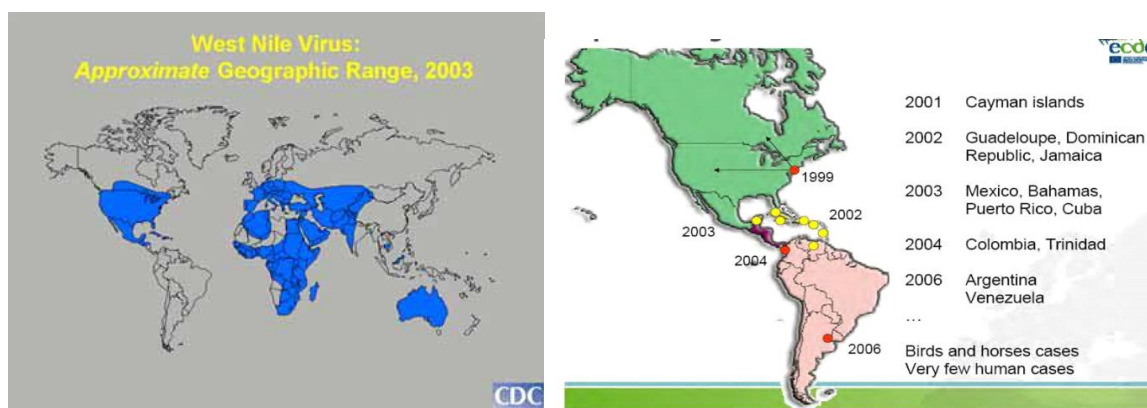
Възприемчивост

Най-често заболяването засяга птици, коне и хора. Има докладвани спорадични случаи на заболяване на ТЗН при други видове животни, като шимпанзета, кучета, котки, катерици, прилепи, елени, овце, ламы, алигатори, тюлени. При направено проучване в Канада, област Саккатчуан (Saskatchewan) през 2003 г. е установено, че по-голямата част от изследваните коне с клинични признаци на ТЗН са били на възраст ≤ 10 г., а смъртността в тази възрастова група е била 46%. 92% от леталните случаи (в следствие на естествения завършек на заболяването или на евтаназия) са се случили през месец август. Смъртността на кобилите е била 36%, на жребците - 82%, а на кастратите-45%. Конете с тъмно оцветена космена покривка са били по-често засегнати от заболяването, но процента на летални случаи при тях е бил по-нисък (36%), в сравнение с тези с друг цвят космена покривка. По-голямата част от конете с клинични симптоми на заболяването са били със светъл цвят на космената покривка и са били използвани за езда (97).

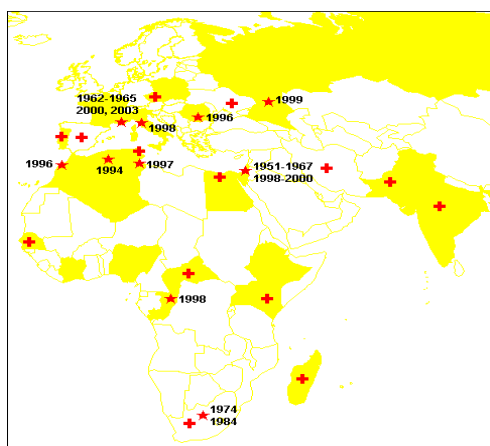
Разпространение

ТЗН е разпространена е в Африка, Средния Изток и Западна Азия. В Западното полукълбо е установена през 1999 г в Ню Йорк. През следващите 5 години се

разпространява по цялата територия на САЩ, Канада, Карибите и Латинска Америка (Фиг. 3 и 4). До 2008 г от ТЗН в САЩ са умрели 1126 човека.



Фиг.3 и 4. Територии засегнати от ТЗН в Света и Америка до 2003 г.



Фиг. 5. Територии засегнати от ТЗН в Африка и Европа до 2003 г.

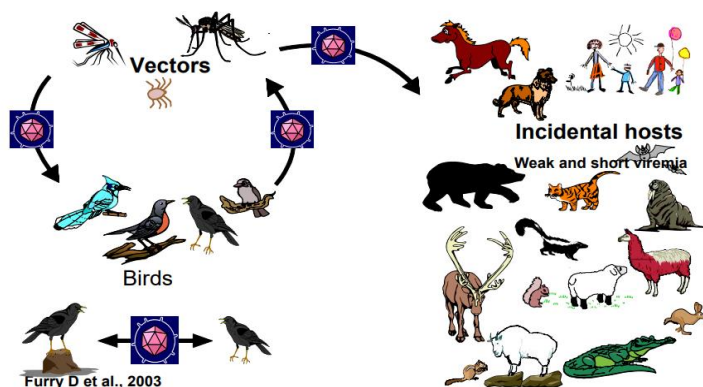
В Европа главен разпространител на вируса на ТЗН е *Culex pipiens*, като компетентни вектори са още и *Culex modestus* и *Aedes vexans*. Много автори определят бозайниците като гостоприемници в края на епизоотичната верига („dead-end hosts”). Вирусът е изолиран от 138 вида птици, принадлежащи към разредите Врбчоподобни (Passeriformes), Дъждосвирцоподобни (*Charadriiformes*), Совоподоби (*Stringoformes*) и Соколподобни (*Falconiformes*). Птиците от семейство *Corvidae* (врани и сини сойки) са особено възприемчиви към вируса на ТЗН. В България основни потенциални преносители на вируса на ТЗН са 8 вида комари: *Anopheles maculipennis complex*, *Aedes cinereus*, *Aedimorphus vexans*, *Ochlerotatus cantans*, *Culex modestus*, *Culex perexiguus*, *Culex pipiens* и *Coquillettidia richiardii*. Според местообитанието и значимостта за пренасяне на вируса на ТЗН в България тези 8 вида комари могат да се разделят на три групи: 1. Обитаващи територията цялата страна са видовете *Anopheles maculipennis complex* и *Culex pipiens*, включително и по границата с Румъния и Гърция. 2. Разпространени в Северна България и Черноморието - видовете *Culex modestus* и *Aedimorphus vexans* и 3. Обитаващи малки, но важни в епизоотично отношение територии (по границата със страни с установена инфекция от ТЗН) са видовете *Aedes*

cinereus и *Coquillettidia richiardii* - по цялото протежение на р. Дунав и *Culex perexiguus*-на ограничена територия на границата ни с Гърция, а вида *Ochlerotatus cantans* - по Черноморието.

Епизоотология на заболяването

Главният път за предаване на инфекцията е чрез ухапване от комари. Вектори на заболяването са комари от род *Culex*. В зависимост от географския район векторите са различни - в Европа главен разпространител на Треска от Западен Нил е *Culex pipiens*, а в САЩ са - *Culex pipiens* (Източната част), *Culex tarsalis* (Западната и Средна части) и *Culex quinquefasciatus* (Югоизточната част). Комарите се заразяват при кръвосмучене от болни птици. **Птиците са естествени резервоарни гостоприемници, в които вирусът се размножава в големи количества** (Фиг.6). Поради високо степенната и дълго продължаваща вiremия (от 20-100 дни), заразените птици представляват първичен и продължителен източник на инфекция за кръвосмучещите комари, които чрез акта на ухапване заразяват други птици, а също така хора и коне.

През 2004 г. бе доказано (списание "Science"), че представителите на р. *Culex* в Европа са разделени в две популации - едната се храни с кръв от птици, а другата – от конете, хората и другите бозайници. Направените проучвания в Северна Америка показват, че 40% от изследваните комари от този род са **хибриди между двата типа**, което обяснява в известна степен по-бързото разпространение на Треска от Западен Нил в САЩ.



Фиг. 6. Вирусна циркулация и резервоари на инфекцията от ТЗН

В бозайниците вирусът не се размножава толкова лесно (не се развива високо степенна вiremия по време на инфекцията) и се смята, че те не могат да бъдат източник на инфекцията. За това много автори определят бозайниците като гостоприемници в края на епизоотичната верига („dead-end hosts”) (95).

Вирусът е изолиран от умрели птици от най-малко 138 вида, принадлежащи към разредите Вrabчоподобни (*Passeriformes*), Дъждосвирцоподобни

(*Charadriiformes*), Совоподоби (*Stringoformes*) и Соколоподобни (*Falconiformes*). Птиците от семейство *Corvidae* (вра̀ни и сини сойки) са особено възприемчиви към вируса на Треска от Западен Нил (95).

Епидемията в САЩ през 2002 г. разкрива нови начини на предаване на инфекцията при хора, като **кръвопреливане, трансплантация на органи, интраутеринно и чрез кърмене**. Има докладвани случаи на заразени лабораторни работници, които са се наранили (порязали) по време на извършване на аутопсия (89). От 2003 г. кръвните банки в САЩ рутинно изследват даряваната кръв за наличие на вируса на ТЗН. Като предпазна мярка Националната Кръвна Банка на Великобритания изследва донорите, които даряват кръв в рамките на 28 дни, след пътуване до САЩ и Канада.

В регионите с умерен и субтропичен климат хората най-често се заразяват през лятото и началото на есента. В тропическите зони инциденти на заболели хора от Треска от Западен Нил се наблюдават по-често през дъждовния сезон, когато има благоприятни условия за размножаването на комарите. **Въпреки, че не съществува възрастова и полова предразположеност към заболяването, по-голямата част от случаите на енцефалит и смърт са наблюдавани при възрастни хора**. В Австралия са установени само спорадични случаи на енцефалит, причинен от Kunjin вирус (суб-тип на вируса на Треска от Западен Нил) (90).

През 1996 г. в Румъния като комарен вектор на инфекцията е установен *Culex ripiens*. Всички заразени места са изобилствали от представители на този род комари, включително птичите навеси, къщите и особено жилищните блокове, много от които са имали течове по водопроводната система и застояла вода в мазетата (90).

През 1950 г., е направено проучване в Египет и са установени два противоположни начина на протичане на инфекцията. В местности, където вирусът циркулира от много години заболяването се манифестира като често срещано заболяване сред децата, протичащо като лека треска без усложнения, което лесно може да се сбърка с други фебрилни състояния. Установено е, че в ендемични за заболяването райони в Африка естествено придобитият имунитет между децата е 50%, а между възрастните - 90 %. **В местности, където хората нямат естествено придобит имунитет към заболяването (северните части на регионите с умерен климат), срещата на тази застаряваща популация хора с вирусния агент води до превес на случаите на менингоенцефалит**. В тези райони, проучвания върху естествено придобитият имунитет при хората показват ниски стойности на серопревалентност - 2-4% в Букурещ (1996г.) и 3 % в Ню Йорк (1999г.) (88,90).

Фактори, които благоприятстват разпространението на инфекцията са извършването на дейности на открити места, липсата на прилагане на репеленти и наличието на открити водни басейни около жилищните области, които представляват места за размножаване на комарите (90). Избухването на заболяването в Букурещ и

околностите през 1996-1997 г. е една от най-големите епидемии на арбовирусна инфекция в Европа, при която са регистрирани над 500 клинични случая на заболелели хора, а смъртността е била около 10%. **Тази епидемия е доказателство, че вирусните заболявания, предавани се чрез комари могат да засегнат голям брой възприемчиви организми, дори и в региони с умерен климат (90).**

Клинична картина

При човека

При хората ТЗН обикновено протича с фебрилна реакция като грипоподобно заболяване включващи треска, главоболие, конюнктивит, ретробулбарен синдром, мускулни болки, а в някои случаи с кожни обриви и отичане на лимфните възли. Признаците на по-тежки инфекции включват силна треска, схващане на врата, мускулна слабост, конвулсии и парализи. Смъртните случаи, свързани с тежките инфекции, варират от 3% до 15% и са най-чести при по-възрастните индивиди. В повечето случаи заболяването протича асимптомно или като внезапно започваща треска, главоболие, болки в гърба, миалгия и анорексия, които продължават 3-6 дни. При половината от пациентите се установяват еритемни и макулопапулозни обриви, които започват от лицето и торса, и преминават след седмица. Често срещана е и генерализираната лимфаденопатия. Рядко установявани са миокардитът, панкреатитът и острия хепатит (90). Около 1 на 150 заразени човека развива тежка форма на заболяването, със засягане на ЦНС - менингит, енцефалит, менингиенцефалит, проявяващи се с промени в поведението (раздразнителност, обърканост, дезориентация), гадене, повръщане, депресия, летаргия, тремор, клонични гърчове. Рядко срещани признаци са припадъците, миелитът и полирадикулитът. Енцефалитът, придружен с тежка обща отпадналост и промени в съзнанието определят леталният изход на заболяването (90).

При **конете** инкубационният период на заболяването е 2-10 дни. При по-голямата част от конете то протича с треска, обща отпадналост, мускулен тремор, атаксия, които преминават след около 10 дни (5). При тежката форма се наблюдават залежаване, парези, парализи, припадъци и кома. При тази форма на протичане на заболяването изходът обикновено е летален (85). При изследване на кръвта (диференциална кръвна картина и биохимично изследване) не се установяват отклонения в изследваните показатели (85). Наблюдава се и субклинична форма на протичане на ТЗН, при която не се установяват клинични симптоми и заболяването се диагностицира само чрез лабораторни изследвания. При дивите птици не се наблюдават клинични признаци, но птиците се намират умрели (86).

Дивите птици, инфектирани с вирус на ТЗН се откриват най-често мъртви, въпреки това не е изготвено пълно описание на клиничните признаци при дивите птици. Същото се отнася и за клиничните признаци при кучета, котки, прилепи, домашни зайци и домашни птици, които също са недостатъчно добре описани.

При домашните птици заболяването започва с депресия и атаксия, манифестираща се с липса на тонус на шийната мускулатура (86).

Съществуват сведения за заболяване и смъртен случай от енцефалит предизвикан от вирус на ТЗН при възрастно **куче** в Илинойс през септември 2002. Кучето вероятно е било с потисната имунна система. Инфекция с вирус на ТЗН е демонстрирана преди това върху кучета, но нито едно не е проявило клиника на заболяване. Вирус на ТЗН е изолиран от скитащо **коте** в Ню Джърси през 1999 г., както и при две котки в Ню Йорк през 2000 г. Трите котки са били тежко болни и са умрели. Тъй като заболяването, предизвикано от вируса на ТЗН при домашни любимци е доста рядко, то кучета и котки, демонстриращи неврологични признаци, би трябвало да се преглеждат по-скоро за други по-често срещани заболявания, включително и за бяс. Ако домашен любимец покаже признаци на треска, депресия, липса на координация, мускулна слабост или спазми, парези или парализи, то ветеринарният лекар би трябвало първо да изключи заболяването бяс, а след това животното да изследва за заболяването ТЗН. От посоченото по-горе личи, **че повечето животински видове, макар и инфектирани, не развиват в достатъчна степен клинични признаци на заболяването.**

Патологоанатомични изменения

При хистопатологично изследване на срези от главен и гръбначен мозък от коне, оцветени с хематоксилин - еозин се наблюдава остър менингоенцефалит, умерена инфилтрация с лимфоцити около кръвоносните съдове и огнищни струпвания на нервни клетки (85). При патологоанатомично изследване на гъски, заболели от ТЗН в Манитоба (Канада) са установени асептичен енцефалит, с умерена периваскуларна инфилтрация с лимфоцити, огнищна глиоза, дегенерация на невроните, сателитоза, високостепенна генерализирана некроза на далака, панкреаса и черния дроб (86).

Диагноза

Диагнозата на заболяването е трудна само въз основа на клиничните признаци, патологоанатомичната находка и епизоотологичното обследване, поради многообразните и нетипични клинични признаци, нехарактерните патологоанатомични изменения и високият % на асимптомно протичане на заболяването. Насочващи към диагноза ТЗН могат да бъдат наличието на смъртност сред птиците в района (най-вече на представителите от сем. *Corvidae*), наличието на вектори на заболяването - комари от род *Culex* и констатиране на грипоподобно заболяване или менингоенцефалит сред хората. Окончателната диагноза се поставя след извършването на лабораторни изследвания.

Серологични методи

Наличието на антитела може да бъде установено чрез ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay), РВХА (реакция възпиране на хемаглутинацията) и

плакообразуващия метод (plaque reduction neutralization assay). Широко приложение в съвременната диагностика на заболяването намира ELISA методът, който е лесен и бързо приложим. (индиректна, конкуритивна, „сандвич“ ELISA). Съществуват два вида китове - Ig M capture ELISA и Ig G ELISA.

Конкуритивна ELISA

Използва се за доказване на антитела срещу вируса на ТЗН. Полистиреновите плаки са натоварени с пречистен вирусен антиген. Тази ELISA се използва за откриване на IgM антитела в конски и птичи серуми, които могат да се установят от 7-10 дни до 1-2 месеца след естествено заразяване с вируса на ТЗН и е подходяща при извършването на рутинни изследвания (screening test). Повечето коне с енцефалит, дължащ се на заразяване с вируса на ТЗН са положителни при изследване с конкуритивна ELISA скоро след началото на клинични признаци. Подходящ материал за изследването е кръвна проба, взета в началото на заболяването.

Индиректна ELISA за доказване на антитела срещу ТЗН. Полистиреновата плака е натоварена с anti-prM-E на вируса на ТЗН моноклонално антитяло. Описаната техника се използва за откриване на IgG антитела в конски серуми, които могат да се установят до 1 година след прекарване на инфекцията. При интерпретацията на резултатите трябва да се вземе в предвид, че наличието на положително реагиращи серуми те може да са в следствие на проведена ваксинация срещу ТЗН или на кръстосната реакция с представители от антигенната група на вирусите на St Louis енцефалит. Като материал за извършване на изследването служат двойни кръвни проби, взети в началото на заболяването и 14 дни след вземането на първата проба. Четирикратното покачване на титъра на антителата е доказателство за наличие на инфекция.

Плаково-редукционен метод (plaque reduction neutralization - PRN) Техниката на плакообразуване е разработена от Dulbecco (1952). Базира се на способността на вирусите да образуват плаки под плътна хранителна среда в монослойни култури. Плаките представляват групи от дегенерирани клетки, които не се оцветяват с витални бои (неутрално червено) и се виждат като бели петна на фона на червеникавия монослой (82). Плакоредукционният метод се използва за доказване на антитела срещу ТЗН. При наличие на антитела в изследваните проби те се свързват с вируса на ТЗН и образуването на плаки се подтиска.

Методът на плакообразуване е най-чувствителният серологичен метод, но трябва да се има в предвид, че както при него, така и при ELISA съществува опасност от кръстосани реакции с други представители на род *Flavivirus*, като St. Louis вирусен енцефалит и Японски вирусен енцефалит. За целта при извършването на реакцията може да се направят паралелни тестове с вирусите на St. Louis вирусен енцефалит и Японски вирусен енцефалит (94).

Вирусологични методи

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056

Вирусна изолация

Поради наличието на сходни клинични признаци е задължително предварително пробите от коне да бъдат изследвани за бяс, след което да се пристъпва към изолацията и идентификацията на вируса на ТЗН.

Подходящите за изследване материали (главен и гръбначен мозък от коне, сърце, черен дроб от птици) се нарязват със стерилни инструменти на малки парченца с големина около 1cm x 1cm, след което се хомогенизират с кварцов пясък, PBS и антибиотици (пеницилин, стрептомицин). С хомогенизираната смес се инокулират на чувствителни клетъчни линии - Vero, RK-13. Клетъчните култури се инкубират при 37°C и се наблюдават ежедневно в продължение на 14 дни за наличие на цитопатичен ефект (ЦПЕ). За визуализиране на ЦПЕ се използва общ за представителите на род *Flavivirus* поликлонален антисерум, маркиран с флуоресцин-изотиоцианат или специфични за вируса на ТЗН моноклонални антитела (IgM H5-46 и IgG 7H2), след което се наблюдават на флуоресцентен микроскоп. Клетките, които не показват ЦПЕ в рамките на 14 дни се пасират повторно и се наблюдават за наличие на ЦПЕ. Подходящи материали за извършване на вирус изолация са главен и гръбначен мозък от коне с клинични признаци на енцефалит или главен мозък, сърце и черен дроб от умрели птици. При извършване на реакцията трябва да се знае, че изолацията на вируса е по-лесна от органни проби от птици. Препоръчително е в лабораторията да се изпрати цяла глава от кон, тъй като по този начин се елиминира рискът от заразяване с бяс, запазва се вирусния титър и се свежда до минимум рискът от вторично замърсяване на материала.

Молекулярно-биологични методи

В диагностиката на вирусните заболявания по животните все по-голямо приложение намират молекулярно-биологичните методи и най-вече PCR (polymerase chain reaction- полимеразна верижна реакция). В реакцията се използват най-малко два праймера- forward primer, който определя началото на фрагмента за амплификация и reverse primer, определящ края на фрагмента. Високочувствителен метод за детекция на НК в проби от животни и най-вече в проби от коне е **гнездовият PCR метод (RT-nPCR)**. При него се използват две двойки праймери, които се добавят в две последователни стъпки на PCR реакцията. Използването на RT-nPCR увеличава специфичността на реакцията и е подходящ за амплификация на дълги ДНК фрагменти.

Широко приложение в диагностиката на терена намират **имунохроматографските методи**. Разработен е такъв метод за установяване на антигена на вируса на ТЗН в проби от комари на фирмата Medical Analysis Systems (Vec Test[®]). Принципът на метода се базира на свързването на наличният в пробата антиген с маркирано със златни частици антитяло, при което се образува антиген-антитяло - златни частици комплекс. При миграцията на тези комплекси през тест зоната те се свързват с намиращите се в нея имобилизирани антитела срещу вируса на ТЗН и

образуват имунни комплекси. Несвързаните маркирани антители преминават през тест зоната и могат да бъдат отчетени в контролната зона. Наличието на червено-пурпурна линия в тест зоната означава положителна реакция. Методът се използва с успех за първоначално определяне на потенциално опасните места на наличие на заболяването и контрол на извършената дезинсекция. При направено проучване на чувствителността и специфичността на метода, при използване на проби (клоакални и трахеални тампони) от умрели птици (гарвани, свраки, врани, сойки) е установено, че методът е особено подходящ за трахеални тампони от врани, като специфичността в случая е 83,9%, а чувствителността- 93,6%, което го прави подходящо средство за изготвяне на надзорни програми (92).

Диференциална диагноза

Тя включва разграничаване от заболяването бяс, протозоен миелоенцефалит, Западен енцефалит по конете, ринопневмонит (EHV-1), чернодробни заболявания (хепатоенцефалопатия). Клиничните признаци на ТЗН могат да бъдат сходни до тези при бяс, но при него винаги се установява прогресиране на клиничните симптоми. При Западният енцефалит по конете лезиите в краниалните дялове на ЦНС са по-тежки, поради което и клинични признаци като промени в поведението на животните и гърчове са често срещани при това заболяване. При случаи на хепатоенцефалопатия се установяват апатичност, иктерус, сънливост и промени в биохимичните показатели на кръвта. Разграничаването на ринопневмонит и Западен енцефалит по конете от ТЗН може да се направи при серологично изследване на кръвни проби (85).

Лечение

Няма разработено лечение на ТЗН. Прилага се общо укрепваща терапия, в която могат да бъдат включени и нестероидни противовъзпалителни средства. Болните животни се поставят при подходящи хигиенни условия, изолирани, без шум и други дразнителни. При необходимост конете се настаняват в люлки. Противопоказно е прилагането на кортикостероидни препарати (84).

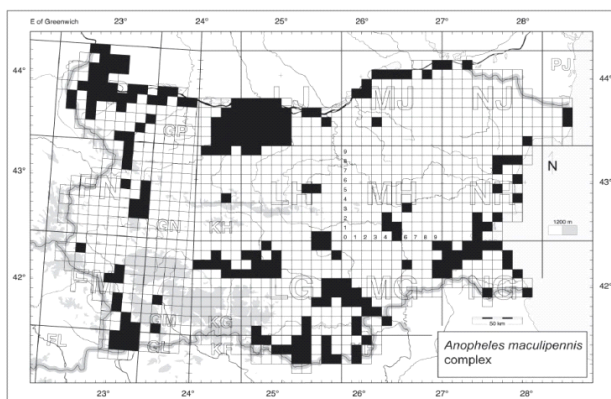
4. Проучване за векторите на заболяването ТЗН в България и тяхната екологична циркулация

По данни на Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), в България основни потенциални преносители на вируса на ТЗН са 8 вида комари: *Anopheles maculipennis complex*, *Aedes cinereus*, *Aëdimorphus vexans*, *Ochlerotatus cantans*, *Culex modestus*, *Culex perexiguus*, *Culex pipiens* и *Coquillettidia richiardii* (Фиг. 7 и 8). Според местообитанието и значимостта за пренасяне на вируса на ТЗН в България тези 8 вида комари могат да се разделят на три групи:

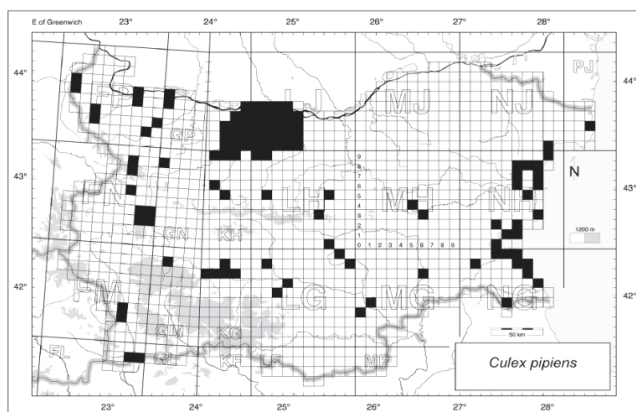
1. Обитаващи територията цялата страна - *Anopheles maculipennis complex* и *Culex pipiens*, включително и по границата с Румъния и Гърция.

2. Обитаващи големи територии предимно Северна България и Черноморието - *Culex modestus* и *Aëdimorphus vexans*.

3. Обитаващи малки но важни в епизоотично отношение територии (по границата със страни с установена ТЗН) - *Aëdes cinereus* и *Coquillettidia richiardii* - по цялото протежение на р. Дунав; *Culex perexiguus*- на ограничена територия на границата с Гърция; *Ochlerotatus cantans*- по Черноморието.



Фиг.7. Разпространение на районите с *Anopheles maculipennis* complex в България (по О. Миков – НЦЗПБ - София)



Фиг. 8. Разпространение на районите с *Culex pipiens* в България (по О. Миков–НЦЗПБ - София)

Екология на инфекциите с ТЗН

Кръвосмучещи вектори

Комарите и най-вече, тези които главно се хранят чрез кръвосмучене от птици са принципният вектор на заболяването ТЗН. Вирусът на ТЗН е бил изолоран от 43 комарни вида, доминирани от **рода *Culex***.

В Африка и Близкият Изток главен вектор на ТЗН е *Cx. univittatus* (освен това *Cx. poicilipes*, *Cx. neavei*, *Cx. decens*, *Aedes albocephalus*, от *Mimomyia* spp.), които играят важна роля в опрегелени региони. В Европа компетентни вектори за ТЗН са *Cx.*

pipiens, *Cx. modestus* и *Coquillettidia richiardii*, В Азия - *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus* и *Cx. vishnui* pre. Експериментално предаване на вирус на ТЗН е описано още при *Culiseta longiareolata*, *Cx. Bitaeniorhynchus* и *Ae. albopictus* (101,105).

Трансоварилно предаване на вируса на ТЗН е много рядко и в ниски количества и е демонстрирано само при *Cx. tritaeniorhynchus*, *Ae. Aegypti* и *Ae. Albopictus*.

Случайно вирус на ТЗН е изолиран от други хематофагни кърлежи, както меки, така и твърди, паразитиращи по птиците аргасови (меки) или амблиомни (твърди), както и експериментално е възпроизведено предаване на вируса на ТЗН при кърлежите *Ornithodoros savignyi*, *O. moubata*, *O. maritimus*, *O. erraticus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. rossicus*, *Dermacentor reticulatus* и *Haemaphysalis leachii* (101,105).

Гръбначни гостоприемници

Дивите птици са основния гостоприемник на вируса на ТЗН. Вирусът е изолиран от голямо количество птици, обитаващи влажните територии или от сухоземни птици. (100-103,106-108). При тях е установена достатъчна по степен и продължителност вiremия, даваща възможност да се заряват векторите – комари. (100,109,110). Вирусът персистира в органите на инокулирани гъски и гълъби от 20-100 дни. (110). Мигриращите птици пък са инструментът за пренасянето на вируса през периода на пролетната миграция на север от Африка към Европа и Азия (104,106-108 ,109, 111).

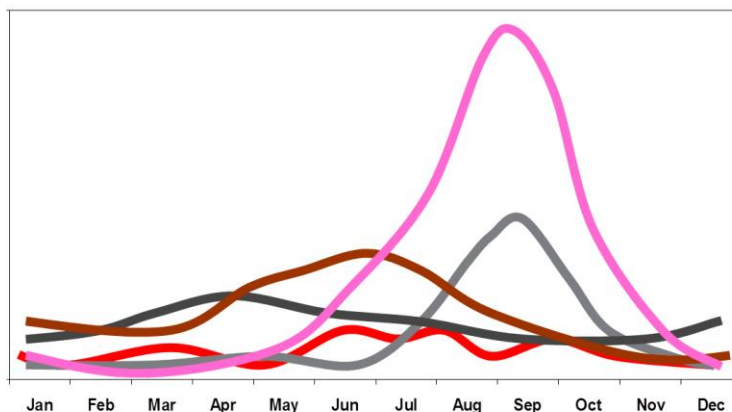
Рядко вирусът на ТЗН е бил изолиран от бозайници (*Arvicanthus niloticus*, *Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*, сентинелни мишки и хамстери, европейски кафяв заек, *Rousettus leschenaulti*, камили, крави, коне, кучета, *Galago senegalensis* и хора) в ензоотичните огнища (101-103). Бозайниците са по-малко важни в епизоотологията на ТЗН, отколкото птиците за подържането на цикъла на предаване на вируса в екосистемите (Фиг.6). Само конете и лемуриите (112) имат умерена вiremия и изглежда могат да подържат известна локална циркулация на вируса на ТЗН. Жабите (*Rana ridibunda*) също могат да приютяват вируса, като тяхното донорство за вируса към *Cx. pipiens* също е било потвърдено (112).

Екологични фактори, свързани с цикъла на предаване на вируса на ТЗН

Вирусът на ТЗН се поддържа като ензоотично циклиращ агент, първично между птици гостоприемници и комари, играещи ролята на вектори [10]. Ролята на прелетните мигриращи птици за пренасянето на вируса и интродуцирането му в Европа и Средиземноморският Басейн много ясно е оценено от множеството проучвания на испанските автори [42-45, 63, 64], в Израел [65], в Полша [63], в Румъния [23] и Чешката република [27]. На основата на филогенетичния анализ и сравнителните изследвания след секвентен анализ на целия геном на изолати на вируса на ТЗН от 1971 и 2004г., бе доказано повтарящо се интродуциране в Португалия [66]. Съгласно тази хипотеза мигриращите прелетни птици, които могат да бъдат инфектирани по време на престоя

им в Африка (в местаобитанията им през зимния сезон) носят вируса на ТЗН обратно към Европа при завръщането им през пролетния сезон. Тази хипотеза би могла да обясни защо огнищата и епизоотичните взривове на ТЗН често се наблюдават в/или са в близост до влажните и урбанизираните територии, където популациите от мигриращи птици, векторите-комари и амплифициращите вируса гостоприемници често са в постоянно присъствие и често в завишена плътност.

Тази хипотеза, би могла също така да обясни времето за поява на епидемичните взривове с интродуцирането на вируса на ТЗН през месеците април и май с мигриращите птици на север, с последващата амплификация на вируса чрез инфектиране на локалните (резидентните) популации от птици (усилващите вектори) и евентуално на откриването на вирусната инфекция чрез клинична изява при хора и еквиди от юли до септември или по-късно (Фиг. 9) [68]. Серологичните проучвания, проведени в Испания край гр. Севиля през 2004 г. [44] откриват специфични антитела срещу вируса на ТЗН при 3 вида мигриращи птици на далечни разстояния от Суб-Сахара (*Lanius senator*, *Phoenicurus phoenicurus*, *Sylvia borin*) и при един резидентен вид (*Turdus merula*).



Фиг.9. Ясно изразена лятна сезонна динамика и вариации при клиничната изява на арбовирусните инфекции (в розово – само за ТЗН)

Значителният брой вирусологично позитивни резидентни птици, установени в Италия през 2008 г., като гарвани (*Corvus corone*) и скален гълъб (*Columba livia*) [49] подсказват за възможната роля на тези **резидентни птици в подържането на локалната вирусна циркулация.** В този момент обаче поради липсата на данни за продължителността на виремичния период при тези видове няма възможност да се направят окончателни и по-категорични заключения за възможния принос на тези птици в епидемиологията на ТЗН и най-вече за подържането на инфекцията в междуепизоотичните периоди. Що се отнася до вирусната циркулация и трансмисия в популацията от птици, съществува възможност вирусът на ТЗН при враните [68] и гъските [69] да се предава и по друг начин освен с артроподни вектори. Тези проучвания обаче са провеждани само в САЩ с щамове, изолирани в района на Ню Йорк 1999г. и Израел – 1998г. Няма подобни наблюдения или експерименти в Европа или с други щамове на вируса на ТЗН. Ролята на резидентните птици в епидемиологията на ТЗН не е ясна, но по-вече информация е налична относно векторите. Вертикалното предаване

на вируса на ТЗН при комарите както се изтъкна вече по-горе е ограничено (т.е. преминаването на вируса при женските към потомството) и е демонстрирано лабораторно [69, 70], и на терен [71]. В допълнение, откриването на вируса на ТЗН в сборни улови (пулове) от комари на *Culex pipiens*, презимуващи комари в Ню Йорк през 2000 г. [72] **ясно показват свойството на вируса на ТЗН да презимува и да преживява (overwintering) в хибернирани възрастни екземпляри комари. Преживяването на възрастните комари през зимата или тяхната понижена активност през зимните месеци понякога се наблюдава и в Средиземноморските страни и други по-благоприятни температурни зони на Европа [73-75].** Ензоотичният цикъл може да перзистира (да съществува постоянно) на дадена географска ширина от едната до следващата година, без някаква външна изява на доказателство за неврологични признаци при конете и хората. Този феномен често е наблюдаван на различни места в Европа (Испания, Португалия, Русия, Турция и др.). В Италия, надзора извършен в периода 2001-2007 г. в 15 различни области с влажни зони бе в състояние да открие спорадична циркулация на вируса на ТЗН в различни региони на страната чрез наличието на сероконверсия при сентинелни птици и коне [47, 76]. Във всички случаи доказателството за навлизането на вируса на ТЗН и циркулацията му сред тях не е била последвана от широка епидемична вълна или установяване на неврологични случаи, както при конете, така и при хората. **Това се базира и на наблюдението, че инфекцията с вируса на ТЗН е много тясно свързана с влажните територии, появата, прелета и гъстотата на птичата популация, и най-вече на мигриращите птици [42, 64, 65, 77].** Клиничната изява се появява в края на лятото и началото на есента с известно закъснение, в сравнение с другите арбовирусни инфекции (Фиг.9). Механизмите, водещи до прехвърлянето на вирусната инфекция към хората и конете не са напълно изяснени. Счита се, че важна е ролята на повсеместно разпространените популации от комари, хранеща се както от хора, така и от птиците [9] **и особено видвете от *Culex pipiens species complex*. Той включва *Cx. pipiens* и *Cx. molestus* форми, които имат варираща степен на орнитофилност и антропофилност, респективно и могат да изпълняват ролята на вектори с много висок потенциал за разпространение на вируса на ТЗН [78].** В Португалия, и двата вида, *pipiens* и *molestus* формите взаимно могат да се подпомагат и да повишават своята активност и компетентност като вектори [79], но също така и с участието на резидентни птици [49]. Други и по-основни екологични, социални и промени в поведението им могат да увеличат честотата на контактите между хората и дивите птици, което да улесни инфектирането на хората. Освен това ясна е връзката между вируса на ТЗН и влажните територии, като два епизоотични взрива бяха докладвани в Европа при населени с хора зони в Букурещ през 1996 г. [19] и Волгоград през 1999 г. [26]. Болшинството от от пациентите (61%), инфектирани по време на епизоотията от ТЗН през 1996 г. живеят в региона на Букурещ [19]. *Culex pipiens* е бил преобладаващият вид комари. Блокове с жилища са били най-тежко инфектирани, поради наличието на теч от тръбите и наличието на застояли води в приземните етажи [19]. При епидемията във Волгоград през 1999 г. приблизително 65% и 30 % от случаите при хората са от Волгоград и крайградските райони около него, респективно и само 5% се откриват в селата около Волгоград [26]. Голямата градска епидемия от ТЗН в Ню Йорк станала през

1999 г. е била с 59 хоспитализирани и 7 смъртни случая [9]. Големият капацитет на вируса да предизвиква градски епидемични взривове се потвърждава с наблюденията за нарастване на случаите на взривове от болестта в урбанизираните и гъсто населени райони на САЩ. **Изводът е, че урбанизацията става важен рисков фактор за проявата на ТЗН в САЩ след интродуцирането на този вирус на този континент [80]. Не бива обаче да се забравя, че както еквидите, така и хората са случайни и крайни гостоприемници на вируса на ТЗН с незначителна роля за по-нататъшното развитие на епизоотичния процес [81].**

Естествените огнища на ТЗН в палеарктичното пространство главно са разположени във влажните екосистеми - делтите на реките и наводнените полета и се характеризират с така наречения цикъл на циркулация птица-комар на вируса. Аргасовите и амблиомните кърлежи могат да подпомагат (спомагателно и допълнително) осъществяването на цикъла на циркулация птица-птица, особено в някои екосистеми, характеризиращи се с по-сухи и топли местобитания на птиците, където липсват комари. Дори цикълът жаба-комар (112) може да функционира при определени условия в дивата природа. В Европа трансмисията на вируса на ТЗН е потвърдена по два основни начина на циркулация в екосистемите: **горски (sylvatic) цикъл**, осъществяван от дивите влаголюбиви птици и орнитофилните комари. При **градската (урбанистична) циркулация** се осъществява предаване на вируса между синантропните или домашните птици и комарите, хранещи се както от птиците, така и от бозайниците (хора и коне). Тук вектори са главно *Cx. Pipiens* и *Cx. molestus*. **Такъв е бил градският цикъл на предаване, който е доминирал в Букурещ по време на епидемичния взрив през 1996-97г. в Румъния (98 и 99).** Циркулацията на на ТЗН в Европа е подобна на тази, наблюдавана при енцефалита St. Louis в Северна Америка, където горският цикъл на циркулация между синантропните птици и *Cx. tarsalis* е алтернативен на градския цикъл между синантропните птици и *Cx. pipiens*.

Екологичната циркулация за предаването чрез комари арбовирусни инфекции е сложна и при ТЗН тя не е изключение. **Сега е известно, че вирусът на ТЗН се поддържа първично от птичата популация чрез комарите.** Птиците са естествения гостоприемник на вируса и освен това инфекцията може да бъде фатална за много естествени и екзотични видове птици. Най-важните птици, въввлечени във вирусната циркулация и амплификация са дъждосвирците (*Passeriformes*), някои чайки (*Charadriiformes*). Два вида прерийни птици (*Falconiformes* и *Strigiformes*) имат по-голяма способност да пренасят вируса към комарите, отколкото тестваните други групи от птици. **Комарите които помагат да се поддържа цикъла на предаване между птиците се наричат *поддържащи вектори*.**

Наблюдава се и предаване на вируса от птиците към човека. Тези комари се означават като „**bridge vectors**“ и обикновено са видове, които се хранят от птиците и човека. Конете и хората се означават като **крайни вектори - "dead-end hosts vectors"**, защото вирусът не циркулира в достатъчни нива в кръвта на тези реципиенти за да бъде инфекциозен за комарите.

Най-малко 62 вида комари се срещат в региона на Ню Йорк и най-малко 16 от тях, които са били тествани са се оказали положителни за инфекция с ТЗН чрез вирус изолация, доказване на нуклеинова киселина или откриване на вирусен антиген. Едно трябва да е ясно, че не е възможно всички те да се инкриминират за компетентни вектори, тъй като това не е достатъчно доказателство за тяхната заразителност, но едно е ясно, че те са пили поне един път заразна с вируса ТЗН кръв. **Някои от тези комари могат да бъдат заразени с вируса, но може да не са способни да пренасят заразата към птиците или хората.**

5. Роля на комарите като вектори в разпространението и природната огнищност на болестта. Векторна компетентност и капацитет

Различни критерии трябва да изпълнява един комарен вид да се определи като **компетентен вектор**, пренасящ вируса на ТЗН. Критериите за това могат да се обобщят в:

- 1) трябва да има повторна изолация на вируса от естествено нахранени с кръв комари;
- 2) Комарният вид следва да е чувствителен на вирусната инфекция и при добре контролирани лабораторни условия да предава инфекцията на чувствителния гостоприемник;
- 3) Комарният вид следва да се храни естествено върху естествения си гостоприемник в природата и
- 4) трябва да съществува ясна връзка между активността на комарите и предаването на вируса в природата.

Основавайки се на множество улови на комари и на лимитираните данни за предпочитанията за хранене на комарите, изглежда че **само няколко компетентни вида са много важни за подържането на вируса на ТЗН при птиците**, докато останалите по-често са въввлечени за предаването на вируса към човека, конете и другите животни като „**бридж вектори**“. За района на Ню Йорк са утановени: *Culex p. pipiens*, *Culex restuans*, *Culex salinarius*, *Ochlerotatus j. japonicus*, *Ochlerotatus triseriatus*, *Ochlerotatus atropalpus* и *Aedes albopictus*.

***Culex pipiens* предпочита да се храни чрез кръвосмучене върху птици.** Лабораторните проучвания показват, че този вектор е ефективен вектор за вируса на ТЗН. Те се основават на лабораторните резултати за *Culex pipiens*, като хранещ се върху птиците комар на множеството теренни изолати на вируса и **лабораторно демонстрираната му векторна компетентност**. По всичко изглежда, че този вид играе ролята на **най-важен вектор за подържане на ТЗН при птиците** и околжилищните местобитания на птиците. *Culex restuans* също показва потенциал да бъде въввлечен във вирусната циркулация между птиците. Беше показано, че *Ochlerotatus j. japonicus*, *Ochlerotatus triseriatus*, *Ochlerotatus atropalpus*, *Aedes albopictus*, and *Culex salinarius* са компетентни вектори в лабораторни условия. Необходими са и

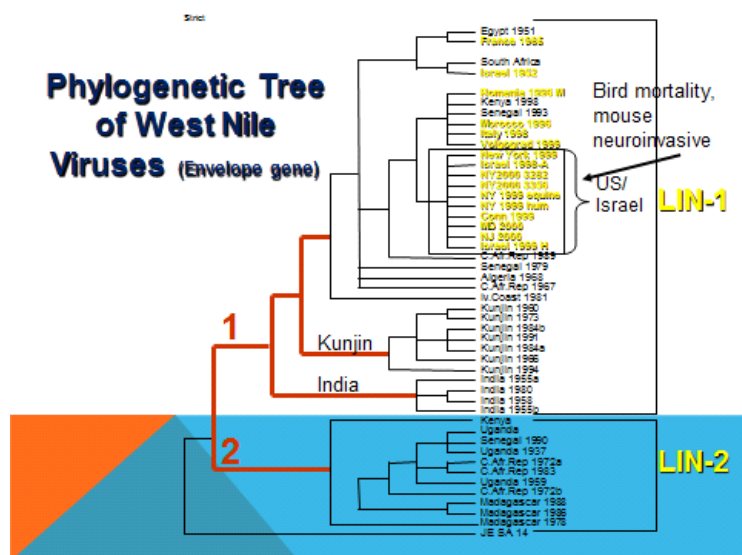
допълнителни лабораторни проучвания за да изяснят каква е ролята на тези и други комари за предаването на вируса на ТЗН към хората, конете и другите животни.

Медицинските ентомолози най-често питат имало ли е неотдавна **големи количества дъждове** и като резултат на това да се е появила **висока активност на вируса на ТЗН**. Друг най-често задаван въпрос е какво е влиянието на **последните горещини** за предаването на ТЗН. Друг въпрос е за влиянието на **неотдавнашно захлаждане** върху вирусната циркулация. На тези въпроси понякога е трудно да се отговори и много изследователи се концентрират върху провеждането на изследвания, имащи за цел установяване на връзката между температурата и количеството на падналите валежи върху екологията на вируса на ТЗН. **Показано е, че големите количества валежи могат понякога да се свържат по време със застояли води в контейнери и развъждането на комарите**. Развитието на комарите като студенокръвни инсекти зависи от средната температура на околната среда. Основно по-високите температури спомагат за по-бъзото развитие на комарите от яйце през ларва до възрастно насекомо. **Репликацията на вируса в комара също е температурно зависима**. По-студената околна среда води до по-бавна вирусна репликация, докато по-високата – до засилване на репликацията и от тук и циркулацията вируса на ТЗН.

6. Исторически данни и епидемична обстановка за заболяването Треска от Западен Нил в Европа и Средиземноморието в периода 1979-2012г.

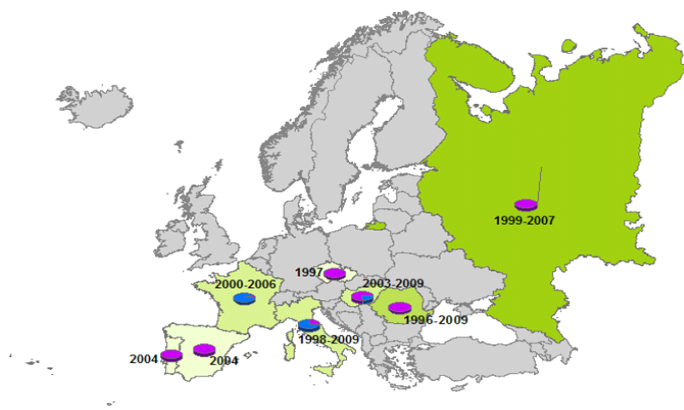
В последните десетилетия инфекцията от ТЗН при коне и хора често бе съобщавана в Европа и Средиземноморският Басейн [4, 12]. Тези случаи дават възможност за по-доброто проучване екологията на вируса на ТЗН в условията на Европейския континент. Отделно, следвайки класическия епидемиологичен подход, прилагането на съвременните технологии в диагностиката предполага изследването генома на циркулиращите на терена вируси с прилагането на най-новите технологии за секвентен анализ на генома на щамовете, въввлечени в огнищата на избухване. Стана възможно да се сравняват РНК секвенциите на изолатите и те да се групират в генетични линии и клъстери. Малки различия в РНК секвенциите могат да бъдат открити дори при последващи избухвания, с възможност за проследяване пространственото разпространение на вирусите, нещо което преди това не бе възможно с помощта на конвенционалните серологични тестове. Доказана е филогенетичната връзка на щамовете от двете основни линии, **генетична линия 1**, която се състои от щамове на вируса на ТЗН от Европа, Америка и Северна Африка и Австралия и **генетична линия 2**, която съдържа щамове, исторически изолирани в Суб-Сахарана Африка. Последните се считат за непатогенни за хора и коне. Третата генетична група вируси, предложена неотдавна включва вирусът Rabensburg, Европейски щам на вируса на ТЗН, изолиран в Чехия. Четвъртата генетична линия съдържа изолати от Кавказ [13]. Болшинството от щамовете, отговорни за огнищата на заболяване от ТЗН в Европа и Средиземноморския басейн принадлежат към **генетични линия 1 и 2** (Фиг.10). Те се групират в клъстер, наречен Европейско-Средиземноморско/Кенийски клъстер на генетична линия 1 [14]

(Фиг. 10 и 11). Някои други, особено тези отговорни за заболяванията от ТЗН в Израел са включени в т.н. Израелско/Американски клъстер. Клъстерите могат да имат важно влияние върху щамовата патогенност. Щамовете, принадлежащи към Европейско-Средиземноморско/Кенийският клъстер се характеризират с умерена патогенност за хора и коне и ограничена патогенност за птици. Обратно, щамовете, групирани в Израелско/Американският клъстер се характеризират с висока степен на предизвикана смъртност сред птиците (особено в САЩ) и също с висока заболяемост при хора и коне [15].



Фиг. 10. Филогенетично дърво на вирусите на ТЗН

Генетична линия 2 включва щамове, които са ендемични за Суб-Сахара в Африка и те се считат за щамове с ниска патогенност. Независимо от това, обаче неотдавна бе демонстрирано, че Южноафриканските щамове от генетична линия 2 са способни да индуцират тежки клинични симптоми, както при хора, така и при коне [16] с присъствието на невроинвазивни фенотипове в този клъстер, както бе демонстрирано с т.н. „миши модел“. **Това се дължи на факта, че генотипа на вируса не определя обезателно патогенността и не е задължително да има съвпадение с филогенетичното групиране. Образно казано, няма равенство между патогенност и вирулентност.** В литературата главните взривове и доказателствата за наличие на циркулация на вируса на ТЗН в Европа и Средиземноморския басейн са описани въз основа на географската им принадлежност и принадлежността към съответния генотип.



Фиг. 11. Огнища на ТЗН, предизвиквани от щамове на вируса на ТЗН от генетична линия 1 (Европейско-Средиземноморски/Кенийски клъстер)

7. Проучване на възможността за проява и разпространение на вируса на ТЗН в България в периода 2010-2015 г.

Зони на проучване:

Четири рискови зони за проникване на вируса на ТЗН на територията на Р. България бяха определени в началото на лятото на 2010 г. – гр. Тутракан, обл Силистра, с. Старо Оряхово, област Варна, езерата Дуранкулак и Шабла, обл. Добрич (Фиг.12.). Тези зони бяха определени съгласно критериите за оценка по Европейската програма за важните за птиците зони (Important Bird Areas–IBA), на възможната информация за плътността на чувствителните животни (налична в БАБХ) и с отчитане на метеорологичните данни за предходната година (средно месечното количество на валежите, температурата на околната среда, скоростта и посоката на ветровете). Не на последно място взехме под внимание и факта, че ТЗН е доказвана у нас от Русакиев и сътр., 1969 (113) и от Кацаров и сътр., 1980 (114) в този регион на страната.



Фиг. 12. Места на установените серологично позитивни случаи на ЗНТ през 2009 г. в България

Сентинелни (индикаторни) животни:

Използвани бяха 2 различни вида индикаторни животни - еквиди (коне, магарета и мулета), които се използват като работни животни и домашни птици (пилета), отглеждани в т.н. „задни дворове“. Оценката на тези два типа сентинелни животни се основаваше на няколко критерия, като чувствителността им към заболяването, ниската степен на вирулемия, която не е в състояние да доведе до разпространяване на заболяването, дългият и стабилен имуноен отговор, отглеждането им в условия предразполагащи за предаване на вируса между тях с цел установяване на постоянна изложеност на заразяване и установяване на циркулацията на вируса на ТЗН в тези зони. Освен това използването на тези два типа индикаторни животни е необходимо за установяване на сезонната динамика в циркулацията на ТЗН, като позволяваше установяването на антитела при домашните птици в началото на лятото с последващо доказване на антитела при еквидите през есента.

Лабораторни тестове:

Като скрининг тест беше използвана конкурентна ELISA, (WNDV ab ID VET). Поради кръстосаната реактивност на Nabs с други флави вируси, всички положителни проби бяха повторно тествани чрез тест за серонейтрализация (SNT). В допълнение е проведено паралелно тестване за други флави вируси (Usutu).

В лабораторния протокол за SNT бяха използвани WNV щам NY99 (снежен бухал 385-99) и бъбречни клетки от африканска зелена маймуна (Vero), получени от Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise „Дж. Капорале“. Серумните проби бяха тествани за антитела срещу вируса на ТЗН и за Usutu вируса по следния начин: Преди тестването пробите бяха инактивирани при 56°C за 30 минути. Двукратни разреждания в минималната есенциална среда на Eagle (EMEM) с L-глутамин (LONZA), съдържащи 2 % фетален говежди серум, 10 U пеницилин на ml, се извършват в 96-ямкови плаки, като се започне от 1: 5. Приготвя се 100 TCID₅₀/50 µl работно разреждане на вируса. Равни обеми на вирус и серум се смесват и инкубират при 37°C в продължение на 1 час, последвано от добавяне на клетъчна суспензия (2x10⁵ клетки/ml). Плаките бяха покрити и инкубирани в 5% CO₂ инкубатор при 37°C и червени под обрнат микроскоп след 72 часа. Положителни проби бяха изпратени за потвърждение в OIE RL в Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise „G. Caporale“ за допълнително тестване.

Резултати и обсъждане

В периода септември-ноември 2010 г. от тествани общо 231 проби (84 проби от коне и 147 от птици), посточно пребиваващи в региона на гр. Тутракан, Старо Оряхово и езерата Дуранкулак и Шабла специфични антитела за вируса на ТЗН бяха открити при 42 проби от еквиди и 37 при птици (Табл. 1).

Location	Animal species	Total tested	Percentage positive	
			WNF	Usutu
Tutrakan	Equines	20	0	0
Tutrakan	Domestic birds	102	34,3	0
Staro Oriahovo	Equines	18	50,0	0
Staro Oriahovo	Domestic birds	25	16	0
Durankulak	Equines	13	76,9	0
Durankulak	Domestic birds	10	0	0
Shabla	Equines	53	47,1	0
Shabla	Domestic birds	10	0	0

Табл 1. Серопозитивни за ЗНТ сентинелни (индикаторни) животни, установени в периода септември-ноември 2010 г.

Като още едно доказателство за наличната динамика в циркулацията на вируса на ТЗН сред тестваните животни е доказването на различни титри на антитела при изследването на една партида серуми от сентинелните животни, както и промяната в антителния отговор на тези животни през опериода на изследването в посока наличие на сероконверсия.

IgM антителата бяха установени при в 4 серумни проби от еквиди с произход района на езерото Шабла и 1 от с. Старо Оряхово. Откриването на IgM антитела в присъствието на естествени антитела бе ясно доказателство за циркулацията на вируса на ЗНТ в този регион на страната. Позитивните за знтителя срещу вируса на ТЗН серумни проби не показаха кръстосана реактивност за Usutu вирус по време на паралелното изпитване.

Доказателства за циркулация на вирус ТЗН в България

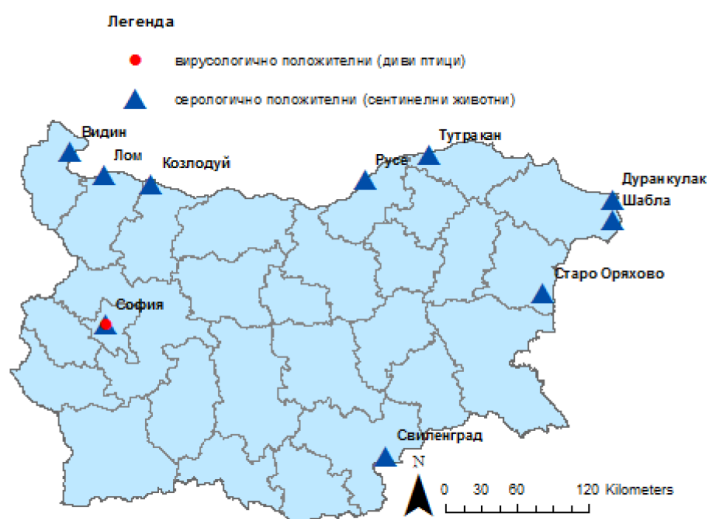
Наличието на заболяването ТЗН бе доказано в Източна и Южна Европа в много страни и от много изследователи. Ниското ниво на клинична изява на болестта бе удостоверявана с помощта на серологичния надзор, който наистина дава възможност за реално установяване разпространението и превалентността на инфекцията в популациите, засегнати от вируса на ТЗН хора, птици и селскостопански животни. Значителен процент на серологично позитивни хора и животни бе установен в много региони при различни проучвания в страните, обявили активност на вируса на ТЗН (Румъния, Испания, Италия, Франция, Русия и др.) (Lozano & Filipe 1998, Vofill et al 2006, Cernescu et al 2000, Platonov et al 2001). Широк спектър на серо-превалентност за ТЗН (1-15%), най-вече сред коне бяха описани във Франция, Испания, Хърватска, Румъния и Русия (Jimenez-Clavero et al 2007, Ozkul et al 2006, Vasilev et al 2005, Madic et al 2007, Murgue et al 2001). Нещо повече, вирусът на ТЗН бе доказан в сборни проби от комари във Франция, Португалия, Молдова, Румъния, Словения, Чешката Република, Украйна и Беларус (Koortmans et al 2007). Като резултат от проучванията в последните години за еволюцията, разпространението и динамиката на предаване заболяването ТЗН в Европа то не следва повече да се нарича **ново появяващо (re-emerging)**. В онези географски ширини и региони, където климатичните зони и факторите на околната среда позволяват ТЗН да се проявява регулярно със сезонна динамика, характерна за страните с умерен

климат и напълно да покрива критериите от епизоотологията то, тя следва да бъде отнесена към **ендемичните инфекции**. Появата на ТЗН в нови територии и степента на напрегнатост на епизоотичната ситуация са трудно предвидими и зависят, както от екологичните и биологичните фактори на околната среда (плътност на векторите и на гостоприемниците), така и от редица неизвестни или слабо проучени фактори, които могат да повлияят върху или да модифицират интензивността на инфекцията или пък чувствителността на гостоприемниците. Заболяването ТЗН трудно се контролира. Вирусната циркулация следва да се открива рано за да могат санитарните и ветеринарните власти да предприемат адекватни превантивни и протективни мерки. Необходими са координирани усилия за да се определят рисковите фактори, които са важни за епидемиологията на ТЗН и да се направи реалистична картината на тази инфекция за страната, региона на Балканите и в Европа с цел опазване на общественото здраве. Добре е да се използват и климатологичните модели за предсказване на параметрите на околната среда и климата. Особено внимание следва да се отдели на количеството и разпределението на валежите и факторите определящи температурните тенденции в промяната на климата в контекста на глобалното затопляне.

През 2015 г. антитела срещу вируса на ТЗН бяха установени при сентинелни животни в четирите региона с доказана циркулация, така и в ново включените за текущата година рискови региони на гр. Русе, гр. Видин, гр. Лом, гр. Козлодуй и гр. Свиленград (Фиг.13). В допълнение вирусът на ТЗН, принадлежащ **към линия 2** бе установен в проби от диви птици от сем. Враноподобни от гр. София. Резултатите от извършените в гр. София серологични проучвания показаха наличие на антитела при диви птици, еднокопитни животни и кучета.

Установен случаи на инфекция с вируса на ТЗН при пациент във ВМА

На 17 август 2014 г. 24-годишен мъж бе хоспитализиран в катедрата по интензивно лечение на Военномедицинска академия (София, България). Той имаше анамнеза за едноседмично заболяване, включващо треска, умора, главоболие, коремна болка, гадене и повръщане. Той беше назначен на антибиотично лечение за пет дни от семейния лекар с частичен ефект. Ден преди хоспитализацията той е имал главоболие, замаяност, повръщане и генерализиран припадък. Екип от спешния център транспортира мъжа до ВМА. В спешното отделение той е бил интубиран в отделението по интензивно лечение. Имал е анамнеза за пневмония от предишната година и епилепсия през детството си. Пациентът живее в Хърватия и е дошъл в България, във гр. Варна за лятната ваканция. По време на постъпването той е в лошо общо състояние с психични разстройства и треска. Серумна проба за изследване за антитела срещу вируса на ТЗН, изпратена до Националната референтна лаборатория, е била установена положителна за IgM и отрицателна за IgG антитела.



Фиг. 13. Установени случаи на Треска от Западен Нил в България за периода 2010-2015 г.

По време на болничния престой са проведени поддържащи, симптоматични, емпирични антибиотични и антивирусни терапии. Благодарение на адекватното интензивно лечение, мъжът се възстанови и тръбата за интубация беше отстранена. На 14 -ия ден той е изписан афебрилен, с нормален психичен статус, епилептична профилактика и химиопрофилактика. Изследването на CSF показва дискретни промени, показателни за вирусен енцефалит (151). Като се има предвид клиничната проява на енцефалит, лабораторните находки и епидемиологичните данни, стигнахме до извода, че това е инфекция с вируса на ТЗН (Ваутова and all, 2014).

Диагностициране:

Заболяването вследствие инфекция с вируса на ТЗН при хора трудно се диагностицира, защото по клинична картина тези, които ще имат симптоми – много малко от тях ще потърсят лекарска помощ, като за няколко дни състоянието отминава, без да се изисква специфично лечение. По клинична картина е много трудно да се постави диагноза – възможно е да се усъмним, и както при всички инфекции, трябва да се направи етиологична диагностика – т.е. да се направят такива специализирани изследвания, в които да търсим основно имунния отговор за среща с вируса на ТЗН. Всички възрастови групи могат да бъдат атакувани от тежката клинична форма на болестта, но хората над 60 години с имунодефицитни състояния, диабет и др. могат да бъдат по-рискови за неврологичните прояви на болестта.

8. Оценка на риска

Както при всяко инфекциозно заболяване с голямо значение за общественото здраве и за националното стопанство е необходимо е да се осъществява интегриран серологичен и вирусологичен надзор на ТЗН, както от медицинските, така и от ветеринарните власти. От изключително значение е на национално ниво да се обменя информация за надзора и установяване на географския лимит на разпространение на

векторите и циркулацията на вируса, както и да се прави оценка за риска на заболяването между компетентните органи (БАБХ и НИЗПБ, респективно ОДБХ и РЗИ) в областите. Идентифицирането на вируса на ТЗН в сборни улови от комари, при птици или еквиди може да даде допълнителна информация за циркулацията на вируса на определни територии.

Анализът на научните факти показва, че заболяването ТЗН устойчиво се проявява в региони, които вече са били засегнати и в предишни години от това заболяване, като се очаква по-нататъшно разпространение на инфекциите с този вирус в следващите години и в други съседни на засегнатите до момента региони или страни. Това се дължи на факта, че климато-географските и екологичните параметри в Южна и Централна Европа са благоприятни за развитието на компетентните комарни вектори на вируса на ТЗН като се осъществява връзка между мигриращи прелетни, резидентните местни птици и другите гръбначни животни (в т.ч. селскостопански) и човека. **Забелязва се и известно изместване пика на инцидентността на заболяването от лятото към ранната есен, което също се свързва със сезонната динамика и плътност на компетентните вектори – комарите.**

2012 г. бе първата година, през която здравните власти на страните-членки на ЕС бяха поканени от EFSA/ECDC да докладват данните за наличие ТЗН при животни. 11 страни-членки са представили данни които показват, че на този етап все още не всички страни са имали действащи мониторингови и надзорни системи. Повечето данни са от надзора или мониторинга при коне и други еквиди и по-малко информация е получена за други животински видове. За позитивни за ТЗН еквиди се съобщава, от страните от Южна, Централна и Западна Европа.

Серопозитивните животни, например конете могат да служат като индикатор за излагане на инфекция, която може да бъде придобита на територията на обитаване или при пътувания (състезателни коне) в ендемични за ТЗН региони. В светлината на представените данни за разпространението на ТЗН сред еднокопитните в Европа наложително е да се установят мониторингови и надзорни системи и в страните от Централна и Северна Европа с цел да се установи появата на заболяването навреме и да се следи и оцени неговия потенциал за засягане на хора. Вирусът на ТЗН се поддържа в природата чрез първичен цикъл на предаване между комари и няколко вида птици, които играят ролята на усилващи гостоприемници. В Стария свят смъртността на птиците е била спорадично свързана с инфекция с вируса на ТЗН, както в Израел. Хората, конете и другите бозайници могат да бъдат заразени от ухапване от заразени комари, но те са инцидентни и крайни гостоприемници, предвид ниските нива на виремия, които могат да развият. **Предаването от човек на човек може да се осъществи само чрез кръвопреливане или трансплантация на органи.** Инфекцията при хората обикновено е безсимптомна, но могат да се наблюдават леки грипоподобни симптоми. В някои рискови категории хора, като възрастни хора, хронично болни и имунокомпрометирани хора, инфекцията с вируса на ТЗН може да доведе до тежък енцефалит и до смърт на пациента. При коне заболяването обикновено е субклинично, въпреки че някои животни могат да проявят неврологични симптоми и да развият фатален енцефалит.

В страните с умерен климат вирусна инфекция при хора и при еднокопитни обикновено се среща през по-топлите месеци, от юли до октомври, в съответствие с хипотезата за въвеждане на вируса по време на пролетната миграция на птиците, последвана от амплификация на вируса в началото на лятото. **Глобалното присъствие на комари, принадлежащи към рода *Culex*, и географското разпространение на вируса на ТЗН от мигриращи птици са в основата на глобалното разпространение на инфекцията, особено в тропическите и умерените зони.**

Описани са седем различни генетични линии на вируса на ТЗН, но само две от тях са по-често срещани:

- **линия 1**, която включва щамове на вируса на ТЗН, циркулиращи в Европа, Северна Америка, Северна Африка и Австралия, и
- **линия 2**, която е исторически присъстваща в Африка на юг от Сахара и Мадагаскар и по-скоро наблюдавано в някои европейски страни (Албания, Австрия, Гърция, Унгария, Италия, Румъния, Русия и Сърбия).

В миналото линия 2 се е считала за непатогенна за хора и коне [114, 123], но по - наскоро в Европа този щам демонстрира способността си да причинява тежки клинични симптоми както при хора, така и при еднокопитни [124, 125]. По - голямата част от вирусите, принадлежащи към линия 1, са групирани в клъстер, **наречен „европейски средиземноморски/кенийски клъстер“**, докато тези, отговорни за огнищата в Израел и в Новия свят, са групирани в **„израелско/американски клъстер“** [126].

Като се има предвид нарастващата осведоменост за болестта на Западен Нил (WND), през последните десетилетия в Европа и в средиземноморския басейн се наблюдава увеличаване на случаите на хора и коне [127].

Няколко средиземноморски държави съобщават за случаи на ТЗН при животни и хора от 2009 до 2013 г. През този период случаи на ТЗН са докладвани в Алжир, България, Хърватия, Бивша югославска република Македония, Гърция, Унгария, Израел, Италия, Косово, Черна гора, Мароко, окупирани палестински територии, Португалия, Румъния, Русия, Сърбия, Испания, Тунис, Турция и Украйна.

Повтарянето на случаите на ТЗН в същите географски райони се обяснява както с повторното проникване на вируса чрез мигриращи птици, така и с установяването на цикли на зимуване, вероятно подкрепени от местни популации птици или заразени възрастни комари, оцелели през зимния сезон [128–130].

Клинични случаи на ТЗН не са били официално докладвани в Турция до 2010 г., въпреки че предишни серологични проучвания разкриват експозицията на хора спрямо вируса в различни региони [131]. През 2010 г. са открити 12 лабораторно потвърдени случая при хора в 15 провинции в западна Турция. През 2011 г. са били открити още три лабораторно потвърдени случая в същата част на страната. Откриването на вируса на ТЗН при хора в една и съща област през две последователни години може да показва

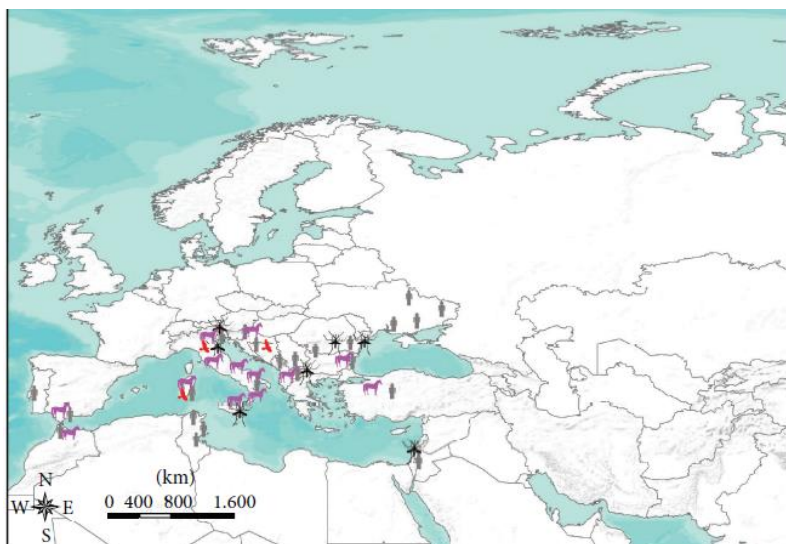
установяването на **локален ендемичен цикъл** на предаване с презимуване на вируса. Първата изолация на вирус на ТЗН от линия 1 е докладвана през 2011 г. при 2 коня в провинция Ескишехир и при мъж в провинция Анкара [134]. Линия 1 на ТЗН също е била изолирана през 2012 г. при 87-годишна жена в провинция Анкара [135].

В южна Румъния първото голямо огнище на ТЗН бе съобщено още през 1996 г. [136, 137], макар че циркулацията на вируса за първи път е открита през 1955 г. в централна Трансилвания. Щам на вируса от линия 1 циркулира в Румъния между 1997 и 2009 г. [138]. Проведените през 2007 г. серологични проучвания при коне показаха наличието на инфекция с вируса на ТЗН в окръг Браила, в югоизточната част на Румъния [139]. От 2008 до 2009 г. е открита вирусна циркулация в окръзите Браила и Долж, където са докладвани 4 случая на хора [137]. Вирусът на ТЗН е открит при женски *Culex ripiens* (включително презимуващи женски), събрани в Букурещ и окръг Тулча от 2007 до 2009 г., а също и в *Coquilletidia richiardii*, *Aedes caspius* и *Anopheles maculipennis s.l.*, събрани през същия период в окръг Тулча [137].

През октомври 2010 г. за първи път в България бяха съобщени осем случая - 5 магарета и 3 коня, отгледани в североизточната част на страната, бяха положителни за серологични изследвания. По това време не са открити потвърдени случаи при хора, но през 2012 г. два случая на хора в област Бургас са докладвани на EFSA/ECDC [132].

В Украйна са регистрирани 20 случая на ТЗН при хора между 2011 и 2012 г. [131]. Тези случаи вероятно принадлежат към същия клъстер, включващ Румъния и България. През август 2013 г. бе докладван още един случай при хора в Житомирска област [133].

В Испания бяха съобщени няколко случая на ТЗН при коне и хора през 2010 г. Първият клиничен случай беше открит при кон през септември 2010 г. в Андалусия (Южна Испания). След първия клиничен случай е създадена програма за надзор на ТЗН и са докладвани други клинични случаи при коне [140]. Бяха съобщени четиридесет и четири случая на WND при коне от Андалусия (в провинциите Кадис, Севиля и Малага) (Анонимен, 2013 г.). В проучване, проведено от септември до декември 2010 г., фрагмент от вирусна РНК, принадлежащ към линия 1 на вируса, открит от кръвта и цереброспиналната течност на смъртоносно заразен кон [141]. През септември 2010 г. беше потвърден първият случай при хора при 60-годишен мъж, а на следващия месец беше докладван 77-годишен пациент. И двата случая, показващи симптоми на енцефалит, са открити в Кадис едновременно със случаите на ТЗН при коне [140]. През 2011 г. са съобщени общо 12 случая на коне в провинции Малага, Севиля и Кадис (Андалусия), докато през 2012 г. четири случая на коне в провинция Кадис и през 2013 г. нова епидемия обхваща провинциите Севиля и Уелва: между август и ноември с потвърдени 40 случая на ТЗН при коне (фиг.14).



Lineage 1
 Birds
 Equidae
 Humans
 Mosquitoes pools

Фиг. 14. Проявление на вирус на ТЗН от линия 1 в Европа и в Средиземноморски Басейн от 2009 до 2013

2.

В Португалия са регистрирани два случая на ТЗН през 2010 г. при еднокопитни, в района на Lisboa e Vale do Tejo, показващи неврологични клинични признаци [142].

В Италия, в края на лятото на 1998 г., инфекцията от ТЗН беше открита за първи път при коне в региона Тоскана [45]. През август 2008 г., голяма епидемия засегна три региона в североизточната част на Италия (Емилия Романя, Венето и Ломбардия) [143,144]. През 2009 г. ТЗН се появи отново в същите региони от предходната година и в други региони на централна Италия, които никога не са участвали досега. Бяха потвърдени общо 223 случая при еднокопитни, 37 от които с клинични признаци в Емилия Романя, Фриули-Венеция Джулия, Лациум, Ломбардия, Тоскана и Венето. Вирусна циркулация е открита и при птици (видът, който е по-засегнат, е сврака, *Pica pica*) в регионите Емилия Романя и Венето, в басейните срещу комари в Емилия Романя и при домашните птици в района на Молизе [128]. Филогенетичният анализ на изолатите показва, че вирусът, циркулиращ през 2009 г., принадлежи към линия 1, с висока идентичност между 2008 и 2009 г. на WNDV италиански щамове [128]. Това откритие силно подкрепя хипотезата за презимуване на вируса и евентуално ендемизация в местните популации гостоприемници [21]. През 2010 г. вирусът на ТЗН продължи да циркулира във вече засегнатите географски райони, но се разпространи в нови региони, като регионите на Сицилия и Апулия [145]. Съобщавани са общо 128 случая на конете, като 11 от тях показват клинични признаци. Сероконвертирали животни срещу вируса на ТЗН са наблюдавани при домашни птици в регионите Молизе и Апулия. През 2011 г. бяха потвърдени допълнителни 197 случая при еднокопитни (58 с клинични признаци и 14 смъртни случая) в същите региони от предходните години, но с включването на нови райони в Южна Италия (региони Калабрия и Базиликата) и за първи път Остров Сардиния. Наблюдението на диви видове птици в Сардиния позволи изолирането на

вирус на ТЗН от линия 1 в малка бухалка (*Athene noctua*), сойка (*Garrulus glandarius*) и зеленоглава патица (*Anas platyrhynchos*). Линия 1 е открита в Сицилия (един басейн против комари и кон) и във региона Фриули-Венеция (един басейн против комари). През 2012 г. ТЗН е потвърдена в 30 конски конюшни в същия регион, засегнат от разпространението на вируса през предходните години: съобщават се за общо 63 случая във Венето, Сардиния, Фриули-Венеция Джулия и Лацио, като 15 от тях показват клинични признаци. Сероконвертирали сентинелни пилета бяха открити в района на Базиликата. Линия 1 на вируса на ТЗН е идентифицирана при диви птици и в басейни с комари в регионите Венето и Фриули-Венеция Джулия. До 2008 г. не са регистрирани случаи на хора. Но от 2008 г. до 2011 г. са докладвани 43 случая на ТЗН в пет италиански региона (Емилия Романя, Венето, Ломбардия, Фриули-Венеция Джулия и Сардиния) със 16% от смъртността [49]. През 2012 г. са идентифицирани 28 случая на ТЗН в същите райони, по-рано засегнати от инфекция с WNV, и в района на провинция Basilicata [147]. Вирус на ТЗН от линия 1 е идентифицирана при кръводарители през 2010 г. и през 2012 г. в региона Венето. Частичното секвениране на вирусната РНК демонстрира почти перфектна идентичност с вируса, изолиран в същата област през 2011 г. при коне и отклонение от щам, отговорен за огнището в северната част на Италия през 2008-2009 г. [146, 148]. Четири случая на хора са възникнали в Сардиния в края на лятото на 2011 г. Геномните последователности на изолати от трима пациенти разкриват щам, строго свързан с щамове WNV, циркулиращи в Италия през 2008 и 2009 г., и с щамове, циркулиращи в Европа и Израел от края на 2004 г. до 2011 г. [52]. През 2013 г. ТЗН се разпространява в регионите Емилия Романя, Ломбардия, Венето, Сардиния и Сицилия. В района на Венето вирус на ТЗН от линия 1 е открита при донор на органи и при кръводарител.

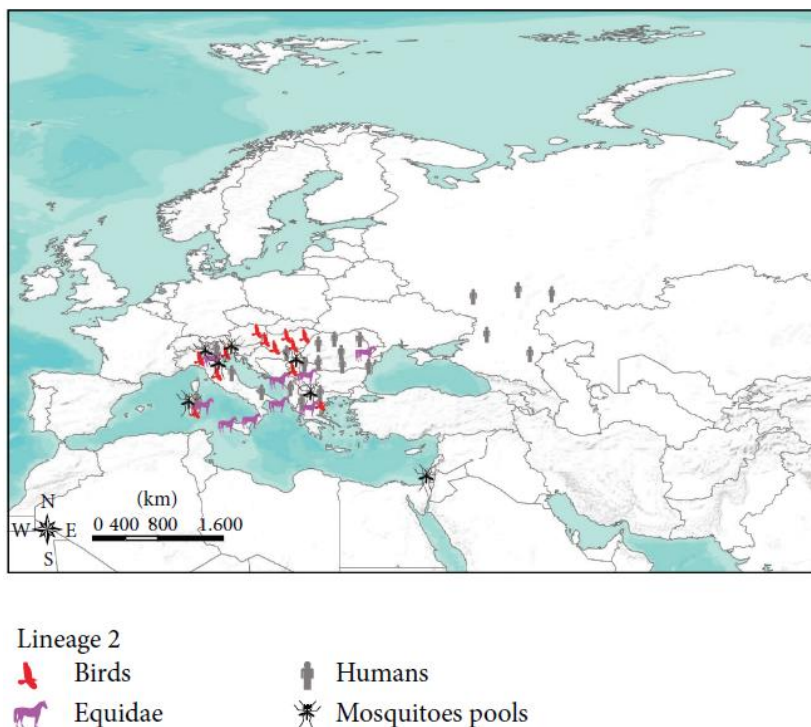
През 2012 г. на Балканите в Косово и Черна гора съобщиха съответно за 6 и 1 случая на хора [131]. През 2013 г. в Черна гора бяха съобщени още четири случая на хора [133]. През 2011 г. Македония събщи за 4 потвърдени случая на ТЗН при хора в Скопие, настъпили от 25 август до 6 октомври, и допълнителни 10 потвърдени случая при коне и 36 при птици [149]. През 2012 г. в Македония са докладвани още шест случая при хора [132]. През 2013 г. през юли е установен човешки случай [133].

За първи път случаи на ТЗН при хора са докладвани в Босна и Херцеговина през 2012 г. [132]. През 2013 г. бяха потвърдени 3 случая на хора в кантоните Модрица и Тузланско-Подрински [133]. Между края на август и началото на септември 2013 г. инфекция от ТЗН е открита при 2 гарвана (*Corvus cornix*) [56].

През 2020 г. ТЗН предизвика забележителни огнища области в Европа, като Испания и Холандия. Най-голямото огнище на ТЗН при хора в Европейския съюз/Европейското икономическо пространство (EU/ ЕИП) бе регистрирано през 2018 г., когато 11 държави съобщиха за 1548 местно придобити комари инфекции [114]. Броят на инфекциите с вируса на ТЗН през 2018 г. надхвърли кумулативния брой на всички регистрирани инфекции между 2010 и 2017 г. и най-големият брой от ново засегнати райони (n = 45) е докладвано [115]. През 2019 г. броят на отчетените придобити на местно ниво инфекциите с ТЗН при хора спаднаха със 73% в сравнение с 2018 г.

Повечето държави отчитат брой на инфекциите с вируса на ТЗН, подобни на тези преди 2018 г., то Гърция продължи да съобщи за голям брой инфекции. От началото на трансмисионния сезон 2020 на 1-ви юни, а към 12 ноември страните от ЕС/ЕИП имат докладвани 315 човешки случая на ТЗН инфекция с известни мястото на заразяване чрез европейската надзорна система (TESSy): Гърция (n = 143), Испания (n = 77), Италия (n = 66), Германия (n = 13), Румъния (n = 6), Холандия (n = 6), Унгария (n = 3) и България (n = 1) [3]. **Прави впечатление, че някои държави докладват много нисък брой инфекции през 2020 г., вариращ от нула до шест (напр. Австрия, Унгария, Сърбия, Румъния). Освен това в други ендемични страни съобщавайки за голям брой случаи (т.е. Гърция и Италия), делът на по-тежката проява на инфекцията, невроинвазивната ТЗН е по-висока от средната стойност за предходните 5 години.**

През последното десетилетие в географското разпространение на ТЗН в Европа се наблюдава генетичен щам на линия 2 (в Централна Европа и в средиземноморския регион) [117]. В Германия този щам беше първи открит през 2018 г. при птици и коне. Първите пет локално придобити случая на ТЗН при хора бяха отчетени през 2019 г. В проследяването на ендемичния взрив от това огнище на девет локално придобити случая на треска от Западен Нил в Лайпциг, през август и Септември 2020 г. [118]. Авторите предполагат ендемичност и сезонно разпространение на ТЗН, линия 2 в град Лайпциг през 2020 г., а също и през следващите години те предлагат на населението и здравните работници допълнително да бъде повишен надзорът при индикаторни животни. ТЗН от линия 2 за първи път също се съобщава при птици и комарни проби в Холандия в края на август 2020 г. и диагностицирането за първи път на ТЗН при хора в региона на гр. Утрехт, през септември и октомври същата година [116,119].



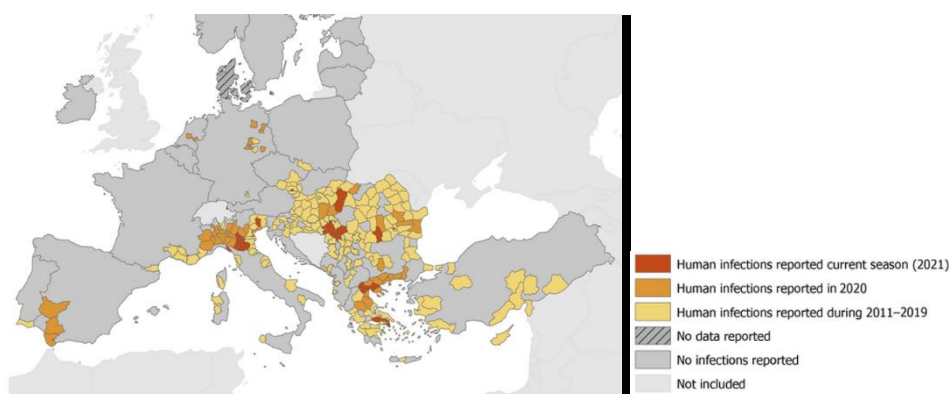
Фиг. 15. Проявление на вирус на ТЗН от линия 2 в Европа и в Средиземноморски Басейн от 2009 до 2013 г.

От 2017 г. ТЗН от линия 2 се разпространява допълнително на запад в средиземноморския регион, през юг от Франция, достигайки до Каталуня в североизточна Испания, където причинява само спорадични случаи при птици (Фиг. 15) [120]. Въпреки това, безпрецедентно огнище на WNV инфекции се случи в южните испански провинции Севиля, Кадис и Бадахос, между юли и септември 2020 г., включващ 77 инфекции, диагностицирани при хора и 137 документирани огнища сред еднокопитни [116]. ТЗН от линия 1 е открит както при хора, така и при животни, следователно това огнище няма епидемиологична връзка с други едновременни огнища на ТЗН в Европа [120]. За отбелязване, Испания не съобщава за локално придобити ТЗН инфекции в хора от 2017 до 2019 г.

Въпреки че броят на инфекциите с ТЗН при хора през 2020 г. беше географски разширен в сравнение с предходните години то продължи като екологичните двигатели на това разширение на ТЗН са сложни и не са проучени все още в детайли. Въпреки това температурата на околната среда е известна като един важен определящ фактор чрез своя ефект относно степента на размножаване на комарите и външния вирус период при комари [121]. Според месечния климат бюлетини на службата за изменение на климата „Коперник“ [122], положителни аномалии на повърхностния въздух са регистрирани в южните райони на Иберийския полуостров от юли до август, както и в северозападна Европа от август до октомври. **Пространствено-времето припокриване с огнищата на ТЗН може да са просто съвпадение, но в дългосрочен план условията на околната среда са склонни да станат по-благоприятни за създаването на сезонни прояви на разпространение на болестта в много европейски региони [121].** Повечето от диагностицираните инфекции от ТЗН при хора през 2020 г. бяха съобщени от райони с проявление на вируса през предходните години. **Това, заедно с преобладаващите генетични линии 1 и 2, показва презимуване и локална циркулация от вируса на ТЗН в Южна Европа.** Следователно, веднъж установен на дадена територия вирусът на ТЗН, съдържа вероятност за поддръжка и риск от повторно появяване на инфекции в редица без задължително ново интродуциране с мигриращи птици. Годишните колебания в активността на вируса на ТЗН могат да бъдат повлияни от няколко фактора. През 2020 г. извънредната и безпрецедентна тежест за националната здравна диагностика системи, причинени от корона вирусната пандемия (COVID- 19) може да е повлияла на надзора на ТЗН в някои страни. Поддържане на националната готовност за сезона Избухванията на вируса на ТЗН през следващите години са особено важно в страни, където - дори и спорадични случаи са докладвани по-рано, както и в държави, където екологичните условия са подходящи за появата и ендемизирането на заболяването ТЗН. Рискът и въздействието върху общественото здраве на човешките инфекции с вируса на ТЗН в различни европейски държави ясно и значително варира. В някои страни надзорът на инфекциите от ТЗН при хора показват, че естественият цикъл на вируса на ТЗН включва птици гостоприемници и комари вектори, докато - освен хората - еднокопитни също са чести, случайни гостоприемници на вируса. Следователно, интегрирано наблюдение на циркулацията на вируса на ТЗН между животни и хора с взимането на навременни мерки за реакция и контрол, напр. за кръв безопасност на кръвта в кръводарителските центрове и при трансплантацията на органи,

контрол на векторите, осведоменост и информация кампании, може да позволи по-ефективно използване на националните ресурси и капацитет за контрол на ТЗН. Инфекциите от вируса на ТЗН при животните трябва да бъдат диагностицирани своевременно и ЕС/ЕИП страните се насърчават да съобщават за инфекции чрез Европейската система за уведомяване за болести по животните. Тези данни се визуализират заедно с данните на системата за надзор - TESSy за човешки случаи в седмичника на ECDC със съставянето на актуализирани карти за инфекциите от ТЗН в Европа [144]. Съвместните данни от надзора на ТЗН при животни и хора могат да предоставят повече точна информация за активността на вируса в активния за предаване сезон, а съвместните усилия за надзор и контрол на заболяването ТЗН може да бъде добър пример за прилагането на принципа за „едно здраве“ като подход към зоонозните заболявания.

От началото на сезона на предаване на ТЗН през 2021 г., за страните от ЕС/ЕИП до 27 август 2021 г. са докладвани 3 огнища сред еднокопитни в Испания, 43 случая на инфекция с ТЗН при хора от които в Гърция (25), Италия (11), Румъния (3), Австрия (2) и Унгария (2) и 1 смърт в Гърция (1). Съседни на ЕС държави съобщават за 6 случая на инфекция с ТЗН при хора (6) със 2 смъртни случая в Сърбия (Фиг. 16).



Фиг. 16. Разпространение на инфекциите вируса на ТЗН при хора в Европа и в Средиземноморския Басейн от 2011 до 26 август 2021 г. (с натрупване от 2011-2019) (по 152)

Имайки предвид фактите около географското разпространение на ТЗН в последните години и, че в повечето страни с докладвано заболяване ТЗН през 2012 г. заболяването е било установявано и през 2010 и 2011 г. (Русия, Гърция, Румъния, Турция, Израел, Италия). Това показва, че **ТЗН се превръща от ново възникващо заболяване в повечето райони Европа в сезонна инфекция с характер на ендемичност за много страни.** И това не е неочаквано на фона на промените в екологичните фактори като високата концентрация на местни резидентни птици и степента на урбанизация в крайградските райони, където могат да контактуват местните резидентни и прелетните птици с възможност вирусът на ТЗН да бъде пренасян от прелетните мигриращи птици извън традиционните екологични ниши на вирусна циркулация и вируса в Африка и да се адаптира към местните „мостови“ вектори и всичко това на фона на наличие по-влажни територии и или сезони с обилни валежи и по-висока активност

компетентни вектори-комари. През 2020 г. ТЗН предизвика забележителни огнища в Европа, като Испания и Холандия. Най-голямото огнище на инфекции с вируса на ТЗН при хора в Европейския съюз/Европейското икономическо пространство (EU/ ЕИП) бе регистрирано през 2018 г., когато 11 държави съобщиха за 1548 местно придобити комари инфекции. Броят на инфекциите с вируса на ТЗН през 2018 г. надхвърли кумулативния брой на всички регистрирани инфекции между 2010 и 2017 г. и най-големият брой на докладвани ново засегнати райони (n = 45).

Естествено бе да се очакваше се по-нататъшно разпространение на инфекциите със ТЗН в следващите години, включително и в съседните на засегнатите до този момент страни, където екологичните параметри са благоприятни и се осъществява връзка между мигриращи прелетни, резидентни птици, компетентни комарни вектори другите гръбначни животни (в т.ч. селскостопански) и човека.

Проведените серологични проучвания потвърждават, че вирусът на ТЗН циркулира най-малко в 4 региона на България от три области, включвайки различни видове животни. **Това следва да се вземе в предвид когато се оценява риска за хората които обитават селските райони, заселени с предимно с популации от възрастно население (възраст>50г.), група, застрашена най-често от проява на нервноинвазивно заболяване при инфекция с вирус на ЗНТ.**

Надзора на ЗНТ следва да включва и други региони на страната чрез създаването на програма за надзор, разчетена и добре обезпечена във времето и пространството с използване на сентинелни животни от резидентни птици и еквида, а така също и постоянен надзор над векторите. Този надзор следва да се извършва съвместно със здравните власти и да се подпомага финансово от Държавата.

Интензивният надзор на заболяването ТЗН, включително и изолацията на вирус от сборни проби на комари от различните региони на страната следва да продължи. **Особено внимание следва да се обърне на онези региони, които се считат за най-рискови и се характеризират с тясно съжителство на чувствителни животни в близост до влажни територии, посещавани от големи колонии разнообразни видове мигриращи птици по *Via Pontica* и *Via Aristiteles*, които могат да бъдат носители и източник на инфекция с вируса на ЗНТ.**

Изводи:

1. Птиците (особено дивите прелетни) са естествени резервоарни гостоприемници, в които вирусът ТЗН се размножава в големи количества. Поради високо степенната и дълго продължаваща времения (от 20-100 дни) заразените птици представляват първичен и продължителен източник на инфекция за кръвосмучещите комари, които чрез акта на ухапване заразяват други птици, а също така хора и коне.

2. В последните години ТЗН се превръща от ново възникващо заболяване в повечето райони на Южна Европа и Средиземноморието в сезонна инфекция с характер на ендемичност за много страни.
3. Анализът на научните факти показва, че заболяването ТЗН устойчиво се проявява в региони, които вече са били засегнати и в предишни години от това заболяване, като се очаква по-нататъшно разпространение на инфекциите с този вирус в следващите години и в други съседни на засегнатите до момента региони или страни. Това се дължи на факта, че климато-географските и екологичните параметри в Южна и Централна Европа са благоприятни за развитието на компетентните комарни вектори на вируса на ТЗН като се осъществява връзка между мигриращи прелетни, резидентните местни птици и другите гръбначни животни (в т.ч. селскостопански) и човека.
4. Забелязва се и известно изместване пика на инцидентността на заболяването от лятото към ранната есен, което също се свързва със сезонната динамика и плътност на компетентните вектори – комарите.
5. Многопосочното и интензивно сътрудничество на медицинските и ветеринарни органи на държавите и завишеният надзор на заболяването в последните години дава възможност инфекцията с вируса на ТЗН да се установява във все по-нови региони.
6. Проведените серологични проучвания потвърждават, че вирусът на ТЗН циркулира най-малко в 4 региона на България от три области, включвайки различни видове животни и птици.
7. Сравнително високият процент на серопревалентност в тези региони (43,5%-Дуранкулак, 39,7%-Шабла, 28,6%-Тутракан, 30,2%- Ст.Оряхово) вероятно са в резултат на тясното съжителство на чувствителните животни в близост до влажните територии, посещавани от големи колонии разнообразни видове мигриращи птици, които могат да бъдат носители и източник на инфекция с вируса на ТЗН.
8. Откриването на специфични за вируса на ТЗН антитела при крайни готоприемници (“dead-end”) еквиди подсказва, че т.н. “bridge“ вектори най-вероятно са въввлечени в цикъла на предаване на вируса. Това следва да се вземе в предвид когато се оценява риска за хората които обитават селските райони, заселени с предимно с популации от възрастно население (възраст>50г.), група, застрашена най-често от проява на нервноинвазивно заболяване при инфекция с вируса на ТЗН.
9. Включването на теста за серум неутрализация срещу Usutu вирус, който е антигенно тясно свързан с вируса на ТЗН позволява да се повиши

специфичността на серологичния метод и да се избегнат неспецифичните кръстосаните реакции.

10. Вирусите на ТЗН от генетични линии 1 и 2, засягащи човека и еквидите са установени да циркулират в Европа. Определено следва да се наблегне на анализиране на настоящите огнища, което да даде повече информация за епидемиологичното значение на този факт и за опазване на публичното здраве.
11. За сега няма данни генетичната линия 2 на вируса на ЗНТ да е по-вирулентна, но това е едно от направленията по които следва да се работи в бъдеще е за установяване влиянието и върху динамиката на циркулация и предаване на вируса.
12. Вирусът на ТЗН от генетична линия 2 вече е идентифициран в Гърция през 2010 г. при донор на кръв, а през 2011 г. подобен вирус е бил изолиран от болен с безсимптомно протичаща инфекция от ТЗН. Това подсказва, че задължително е в районите с установени случаи на ТЗН при хора следва навреме да се уведомяват компетентните власти (РЗИ) да се извършват и подходящи изследвания в кръвните продукти в кръвопреливните центрове

Препоръки:

- **контрол на кръвните продукти**

Прилагането на избирателен или постоянен контрол над донорите на кръв в инфектираните райони остава крайъгълен камък за предотвратяване предаването на вируса чрез кръвни продукти. ECDC предоставя всяка седмица актуализирана информация за заразените региони в Европа за да се поддържа актуална информация за тази дейност.

- **диагностичен капацитет**

Съществува необходимост от по-нататъшно развиване на лабораторния капацитет за осъществяването на съвременна диагностика и мониторинг на заболяването, вирусната циркулация и сезонната динамика при компетентните вектори. Секвенирането и генотипирането на вирусните изолати на ТЗН е задължително.

- **Лични предпазни средства и контрол над векторите**

Необходимо е за всяко лице посещаващо или живещо в региони със случаи на ТЗН по хората и животните да бъде добре информирано относно мерките за предпазване от ухапване от комари. Използването на репеленти за инсекти е препоръчително, както и използването на наметала, мрежи или друго подходящо облекло. В местата с висока концентрация на популации от комари са необходими механични прегради за комарите (мрежи). Контролът на векторите включва борба с преимагналните форми на комарите, борба с възрастните комари и има за цел да ограничи разпространението на започнал епидемичен

взрив на болестта, но само в началните случаи на ТЗН, когато клиничните изяви на болестта са все още спорадични.

Използвана литература

1. Karabatsos N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. 3rd ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine & Hygiene 1985.
2. Komar N. West Nile viral encephalitis. Rev Sci Tech 2000; 19: 166-76.
3. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. Science 1999; 286: 2333-7.
4. Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. Emerg Infect Dis 1999; 5: 643-50.
5. Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, et al. West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. Emerg Infect Dis 2001; 7: 722-5.
6. Komar N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO. Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. Emerg Infect Dis 2001; 7: 621-5.
7. Spigland I, Jasinska-Klingberg W, Hofshi E, Goldblum N. Clinical and laboratory observations in an outbreak of West Nile fever in Israel in 1957. Harefuah 1958; 54: 275-80; English & French abstracts 80-1.
8. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. Emerg Infect Dis 2001; 7: 692-6.
9. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. Lancet Infect Dis 2002; 2: 519-29.
10. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. Lancet Neurol 2007; 6: 171-81.
11. Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Riz KF. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. Am J Trop Med Hyg 1956; 5: 579-620.
12. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. Ann NY Acad Sci 2001; 951: 117-26.
13. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. Emerg Infect Dis 2006; 12: 618-23.
14. Schuffenecker I, Peyrefitte CN, el Harrak M, Murri S, Leblond A, Zeller HG. West Nile virus in Morocco, 2003. Emerg Infect Dis 2005; 11: 306-9.
15. Komar N, Panella NA, Boyce E. Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. Emerg Infect Dis 2001; 7: 736-8.

16. Venter M, Human S, Zaayman D, et al. Lineage 2 west Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 877-84.
17. Tber AA. West Nile fever in horses in Morocco. *Bull OIE* 1996; 108: 867-9.
18. Triki H, Murri S, Le Guenno B, et al. West Nile viral meningoencephalitis in Tunisia. *Med Trop (Mars)* 2001; 61: 487-90.
19. Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 1998; 352: 767-71.
20. Cernescu C, Nedelcu NI, Tardei G, Ruta S, Tsai TF. Continued transmission of West Nile virus to humans in southeastern Romania, 1997-1998. *J Infect Dis* 2000; 181: 710-2.
21. Ceianu CS, Ungureanu A, Nicolescu G, et al. West Nile virus surveillance in Romania: 1997-2000. *Viral Immunol* 2001; 14: 251-62.
22. Ionescu A, Bria P, Rizac V, et al. Some preliminary studies assessing the presence of West Nile virus antibodies in horses in Romania. *Proceedings of the International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, Oslo 2006.*
23. Nicolescu G, Purcarea-Ciulacu V, Prioteasa L, et al. West Nile Virus in Romania. Report to the EDEN annual meeting 2009.
- [24] Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z. West Nile fever in Czechland. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 594-5.
25. Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z, Sebesta O. First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol* 1998; 42: 119-20.
26. Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 128-32.
27. Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z, et al. Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 659-66.
28. ProMED-mail. West Nile virus - Russia (Astrakhan) Archive Number 200509112688. 2005; Published Date 11-SEP-2005.
- [29] ProMED-mail. West Nile virus - Russia (Rostov Region) Archive Number 200609252742. 2006; Published Date 25-SEP-2006.
30. Joubert L, Oudar J, Hannoun C, et al. Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningoencephalomyelitis of the horse. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1970; 118: 239-47.
31. Panthier R, Hannoun C, Oudar J, et al. Isolation of West Nile virus in a Camargue horse with encephalomyelitis. *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1966; 262: 1308-10.

32. Panthier R. [Epidemiology of the West Nile virus: study of an outbreak in Camargue. I. Introduction]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1968; 114: 518-20.
33. Panthier R, Hannoun C, Beytout D, Mouchet J. [Epidemiology of West Nile virus. Study of a center in Camargue. 3.-Human diseases]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1968; 115: 435-45.
34. Hannoun C, Panthier R, Mouchet J, Eouzan JP. [Isolation in France of the West Nile Virus from Patients and from the Vector *Culex Modestus Ficalbi*]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1964; 259: 4170-2.
35. Filipe AR, De Andrade HR. Arboviruses in the Iberian Peninsula. *Acta Virol* 1990; 34: 582-91.
36. Filipe AR. Isolation in Portugal of West Nile virus from *Anopheles maculipennis* mosquitoes. *Acta Virol* 1972; 163: 61.
37. Lozano A, Filipe AR. Antibodies against the West Nile virus and other arthropod transmitted viruses in the Ebro Delta region. *Rev Esp Salud Publica* 1998; 72: 245-50.
- [38] Cantile C, Di Guardo G, Eleni C, Arispici M. Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet J* 2000; 32: 31-5.
39. Mailles A, Dellamonica P, Zeller H, Durand JP, Zientara S, Moffette R. Human and equine infections in France, August- September 2003. *Eurosurveillance* 2003; 10/23/2003.
40. Leblond A, Hendrikx P, Sabatier P. West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; 7: 403-10.
41. Kaptoul D, Viladrich PF, Domingo C, et al. West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 70-1.
42. Figuerola J, Soriguer R, Rojo G, Gomez Tejedor C, Jimenez- Clavero MA. Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1915-7.
- 43 Figuerola J, Jimenez-Clavero MA, Rojo G, Gomez-Tejedor C, Soriguer R. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain. *Avian Pathol* 2007; 36: 209-12.
44. Lopez G, Jimenez-Clavero MA, Tejedor CG, Soriguer R, Figuerola J. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 615-21.
45. Esteves A, Almeida AP, Galao RP, et al. West Nile virus in Southern Portugal, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 410- 3.

46. World Organisation for Animal Health - OIE. West Nile Fever, France. Immediate Notification 2006.

47. Filipponi G, Lelli R, Savini G, et al. West Nile Virus surveillance in Italy: results of three years activities. 2005 National Conference on West Nile Virus in the United States, San Jose, California, February, 8-9 2005.

48. Monaco F, Lelli R, Teodori L, et al. Re-emergence of West Nile Virus in Italy. Zoonoses and Public Health 2009; doi: 10.1111/j.863-2378.009.01245.x.

49. Calistri P, Giovannini A, Savini G, et al. West Nile Virus Transmission in 2008 in North-Eastern Italy. Zoonoses and Public Health 2009; doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01303.x.

50. Rossini G, Cavrini F, Pierro A, et al. First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 – case report. Eur Surveill 2008; 13.

51. Gobbi F, Napoletano G, Piovesan C, et al. Where is West Nile fever? Lessons learnt from recent human cases in northern Italy. Eurosurveillance 2009; 14.

52. Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R. Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. Eurosurveillance 2008; 27: 13.

53. Malkinson M, Weisman Y, Pokamonski S, King R, Deubel V. Intercontinental transmission of West Nile virus by migrating white storks. Emerg Infect Dis 2001; 7: 540.

54. World Organisation for Animal Health - OIE. West Nile Fever in Israel in geese. Dis Inform 1999; 12: 166.

55. Chowers MY, Lang R, Nassar F, et al. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. Emerg Infect Dis 2001; 7: 675-8.

56. Weinberger M, Pitlik SD, Gandacu D, et al. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. Emerg Infect Dis 2001; 7: 686-91.

57. Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnár Z, et al. West Nile virus infections in Hungary, August – September 2008. Eurosurveillance 2008; 13.

58. World Organisation for Animal Health - OIE. West Nile Fever, Austria. Immediate Notification 2008.

59. Gratz NG. The vector-borne human infections of Europe. Their distribution and burden on public health. World Health Organization Europe 2004.

60. Kantzanou MN, Moschidis ZM, Kremastinou G, et al. Searching for West Nile virus (WNV) in Greece. Transf Med 2009; 19: doi: 10.1111/j.1365-3148.2009.00964.x.

61. Madic J, Savini G, Di Gennaro A, et al. Serological evidence for West Nile virus infection in horses in Croatia. Vet Rec 2007; 160: 772-3.

62. Hubalek Z, Wegner E, Halouzka J, et al. Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland. *Viral Immunol* 2008; 21: 247-53.
63. Figuerola J, Jimenez-Clavero MA, Lopez G, et al. Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Vet Microbiol* 2008; 132: 39-46.
64. Jimenez-Clavero MA, Sotelo E, Fernandez-Pinero J, et al. West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1489-91.
65. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, et al. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 392-7.
66. Parreira R, Severino P, Freitas F, Piedade J, Almeida APG, Esteves A. Two distinct introductions of the West Nile Virus in Portugal disclosed by phylogenetic analysis of genomic sequences. *Vector- Borne Zoonotic Dis* 2007; 7: 344-352.
67. Rappole JH, Hubalek Z. Migratory birds and West Nile virus. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 47S-58S.
68. McLean RG, Ubico SR, Docherty DE, Hansen WR, Sileo L, McNamara TS. West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann NY Acad Sci* 2001; 951: 54-7.
69. Baqar S, Hayes CG, Murphy JR, Watts DM. Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 757-62.
70. Dohm DJ, Sardelis MR, Turell MJ. Experimental vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2002; 39: 640-4.
71. Miller BR, Nasci RS, Godsey MS, et al. First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 240-6.
72. Nasci RS, Savage HM, White DJ, et al. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 742-4.
73. Romi R, Severini F, Toma L. Cold acclimation and overwintering of female *Aedes albopictus* in Roma. *J Am Mosq Control Assoc* 2006; 22: 149-51.
74. Zhou G, Miesfeld RL. Energy metabolism during diapause in *Culex pipiens* mosquitoes. *J Insect Physiol* 2009; 55: 40-6.
75. Robich RM, Denlinger DL. Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15912-7.

76. Filippini G, Ciarrocca E, Savini G, Corsi I, Dell'Ariceia G, Lelli R. West Nile virus transmission in resident birds, Italy. IMED 2007 International meeting on emerging diseases and surveillance, Vienna (Austria), February 23-25, 2007.

77. Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infect Dis* 2000; 6: 319 -28.

78. Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, et al. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 2004; 303: 1535-8.

79. Gomes B, Sousa CA, Novo MT, et al. Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*) in the Comporta region, Portugal. *BMC Evol Biol* 2009; 9: 262.

80. Brown HE, Childs JE, Diuk-Wasser MA, Fish D. Ecological factors associated with West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1539-45.

81. Ewald PW. *Evolution of Infectious Disease*. New York, USA: Oxford University Press 1994.

82. Диловски М., Хараламбиев Х., Текерлеков П., Герганов Г., 1982. Диагностика на вирусните болести по домашните животни. София, Земиздат, 1982, стр. 36-39..
Николова М., Ветеринарно медицинска вирусология, ISBN 954-703-011-6, Ариел, 1996, стр. 37-46 (10), стр. 183-187 (5).

83. Цачев Ил. 2006 Екзотични инфекциозни болести по животните, Стара Загора, 50 стр.

84. Abutarbush S.M., O'Connor B.P., Clark C., Sampieri F., Naylor J.M., 2004. Clinical West Nile virus infection in 2 horses in western Canada. *Can Vet J* 2004; 45:315-317.

85. Austin R.J., Whiting T.L., Anderson R.A., Drebot M.A., 2004. An outbreak of West Nile virus- associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can Vet J* 2004; 45:117-123.

86. California Department of public health, Mosquito & vector control association of California, University of California, 2008. California mosquito-borne virus surveillance & response plan.

87. Campbell G. L., Martin A. A., Lanciotti R.S., Gubler D. J., West Nile Virus, *The Lancet Infectious disease*, vol 2, September 2002, pp. 519-529 (11).

88. Elizondo-Quiroga D., Davis C.T., Fernandez-Salas I., Escobar-Lopez R., Olmos D.V., Gastalum L.C., Acosta M.A., Elizondo-Quiroga A., Gonzalez-Rojas H.I., Cordero J.F., Guzman H., Rosa A.T., Blitvich b.j., Barrett A.D., Beaty B.J., Tesh R.B., 2005. West Nile virus isolation in humans and mosquitoes, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.*, vol 1, №9, september 2005.

89. Hema Azad, Sajan Thomas, 2004. West Nile encephalitis. Hospital physician, may 2004, p. 12-16.

90. International Committiee on Taxonomy of Viruses, 2002. –www.ncbi.nlm.nih.gov.

91. Lindsay R., Barker I., Nayar G., Drebot M., Calvin S., Scammell C., Sachvie C., Scammell-La Fleur T., Dibernardo A., Andonova M., Artsob H., 2003. Rapid antigen-capture assay to detect West Nile virus in dead Corvids. *Emerg. Infect. Dis.*, vol 9, №11, november 2003.

92. Morales M.A., Barrandeguy M., Fabbri C., Garcia J.B., Vissanti A., Trono K., Gutierrez G., Pigretti S., Menchaca H., Garrido N., Taylor N., Fernandez F., Levis S., Enria D., 2006. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, vol 12, №10, october 2006.

93. Office of International Epizooties, 2008. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 6 ed., chapter 2.1.20 West Nile Virus, pp. 377-385 (9).

94. OIE CC-IZSM 2008. Assessment of surveillance systems for West Nile Virus and Crimean-Congo Haemorrhagic fever in the Balkans- Project on the implementation of a surveillance network for vector borne diseases in the Balkans countries, Italy.

95. Ryuta Kanai, Kalipada Kar, Karen Anthony, L. Hannah Gould, Michel Ledizet, Erol Fikrig, Wayne A. Marasco, Raymond A. Koski, Yorgo Modis, 2006. Crystal structure of West Nile Virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *J. of virology*, vol 80, №22, nov. 2006, p. 11000-11008.

96. Tasha Epp., Cheryl Waldner, Keith West, Hugh Townsend, 2007. Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *Can. Vet. J.*, 2007; 48:1137-1145.

97. Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 1998;352:767-71.

98. Savage HM, Ceianu C, Nicolescu G, Karabatsos N, Lanciotti R, Vladimirescu A, et al. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania, 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. In press 1999.

99. Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 1956;5:579-620.

100. Karabatsos N, editor. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. 3rd ed., and Supplements 1986-98. San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985.

101. Peiris JSM, Amerasinghe FP. West Nile fever. In: Beran GW, Steele JH, editors. Handbook of zoonoses. Section B: Viral. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 1994. p. 139-48.
102. Hubčlek Z, Halouzka J. Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe. Acta Scientiarum Naturalium Brno 1996;30(no.4-5):1-95.
103. Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. J Gen Virol 1997;78:2293-7.
104. Hurlbut HS. West Nile virus infection in arthropods. Am J Trop Med Hyg 1956;5:76-85.
105. Nir Y, Goldwasser R, Lasowski Y, Avivi A. Isolation of arboviruses from wild birds in Israel. Am J Epidemiol 1967;86:372-8.
106. Watson GE, Shope RE, Kaiser MN. An ectoparasite and virus survey of migratory birds in the eastern Mediterranean. In: Cherepanov IA, editor. Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses. Novosibirsk: Nauka; 1972 p.176-80.
107. Ernek E, Kozuch O, Nosek J, Teplan J, Folk C. Arboviruses in birds captured in Slovakia. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology (Prague) 1977;21:353-9.
108. Work TH, Hurlbut HS, Taylor RM. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. Am J Trop Med Hyg 1955;4:872-8.
109. Semenov BF, Chunikhin SP, Karmysheva VY, Yakovleva NI. Studies of chronic arbovirus infections in birds. 1. Experiments with West Nile, Sindbis, Bhanja and SFS viruses (in Russian). Vestnik Akademii Medicinskikh NaukSSSR (Moskva) 1973;2:79-83.
110. Hannoun C, Corniou B, Mouchet J. Role of migrating birds in arbovirus transfer between Africa and Europe. In: Cherepanov AI, editor. Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses. Novosibirsk: Nauka; 1972; p. 167-72.
111. Kostyukov MA, Alekseev AN, Bulychev VP, Gordeeva ZE. Experimental infection of *Culex pipiens* mosquitoes with West Nile virus by feeding on infected *Rana ridibunda* frogs and its subsequent transmission (in Russian). Med Parazitol (Mosk) 1986;6:76-8.
112. Rusakiev M. Studies on the distribution of arboviruses transmitted by mosquitoes in Bulgaria. In: Břrdoř V, editor. Arboviruses of the California complex and the Bunyamwera group. Bratislava: Publ House SAS; 1969. p. 389-92.

113. Katsarov G, Vasilenko S, Vargin V, Butenko S, Tkachenko E. Serological studies on the distribution of some arboviruses in Bulgaria. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases* 1980;8:32-5.

114. T. Bakonyi, E. Ivanics, K. Erdelyi et al., "Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, no. 4, pp. 618–623, 2006.

115. H. Work, H. S. Hurlbut, and R. M. Taylor, "Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 4, no. 5, pp. 872–888, 1955.

116. G. L. Hamer, E. D. Walker, J. D. Brawn et al., "Rapid amplification of West Nile virus: the role of hatch-year birds," *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 8, no. 1, pp. 57–67, 2008.

117. Z. Hubalek and J. Halouzka, "West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 5, no. 5, pp. 643–650, 1999.

118. M. Malkinson, C. Banet, Y. Weisman et al., "Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no. 4, pp. 392–397, 2002.

119. G. Savini, G. Puggioni, A. di Gennaro et al., "West Nile virus lineage 2 in Sardinian wild birds in 2012: a further threat to public health," *Epidemiology and Infection*, vol. 141, no. 11, pp. 2313–2316, 2013.

120. R. A. Bowen and N.M. Nemeth, "Experimental infections with West Nile virus," *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 20, no. 3, pp. 293–297, 2007.

121. L. N. Pealer, A. A. Marfin, L. R. Petersen et al., "Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002," *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 13, pp. 1236–1245, 2003.

122. M. Iwamoto, D. B. Jernigan, A. Guasch et al., "Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients," *The New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 22, pp. 2196–2203, 2003. [11] J. H. Rappole and Z. Hubalek, "Migratory birds and West Nile virus," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 94, pp. 47S–58S, 2003.

123. T. Bakonyi, Z. Hubalek, I. Rudolf, and N. Nowotny, "Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, no. 2, pp. 225–231, 2005.

124. M. Venter, S. Human, D. Zaayman et al., "Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 6, pp. 877–884, 2009.

125. T. Bakonyi, E. Ferenczi, K. Erd'elyi et al., "Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009," *Veterinary Microbiology*, vol. 165, no. 1-2, pp. 61–70, 2013.
126. I. Schuffenecker, C. N. Peyrefitte, M. El Harrak, S. Murri, A. Leblond, and H. G. Zeller, "West Nile Virus in Morocco, 2003," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, no. 2, pp. 306–309, 2005.
127. P. Calistri, A. Giovannini, Z. Hubalek et al., "Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin," *The Open Virology Journal*, vol. 4, pp. 29–37, 2010.
128. F. Monaco, G. Savini, P. Calistri et al., "2009 West Nile disease epidemic in Italy: first evidence of overwintering in Western Europe?" *Research in Veterinary Science*, vol. 91, no. 2, pp. 321– 326, 2011.
129. A. Farajollahi, W. J. Crans, P. Bryant et al., "Detection of West Nile Viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003," *Journal of Medical Entomology*, vol. 42, no. 3, pp. 490–494, 2005.
130. G. Kuno, "Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts," *Reviews in Medical Virology*, vol. 11, no. 3, pp. 165–190, 2001.
131. EpiSouth Weekly Epi Bulletin, "West Nile virus circulation in the EpiSouth countries and neighbouring areas seasons 2010," 2013, [http://www.episouthnetwork.org/sites/default/files/outputs/note west nile episouth 2010 2011 2012 june2013 .pdf](http://www.episouthnetwork.org/sites/default/files/outputs/note%20west%20nile%20episouth%202010%202011%20june2013.pdf).
132. ECDC, West Nile Fever, Table on cases, 2012, [http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west nile fever/west-nile-fevermaps/ pages/historical-data.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west%20nile%20fever/west-nile-fevermaps/pages/historical-data.aspx).
133. ECDC, West Nile Fever, Table on cases, 2013, [http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west nile fever/West-Nile-fevermaps/ Pages/historical-data.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west%20nile%20fever/West-Nile-fevermaps/Pages/historical-data.aspx).
134. A. Ozkul, K. Ergunay, A. Koysuren et al., "Concurrent occurrence of human and equine West Nile virus infections in Central Anatolia, Turkey: the first evidence for circulation of lineage 1 viruses," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 17, no. 7, pp. e546–e551, 2013.
135. M. " Ocal, H. "Onder, E. M. Arsava, A. L. P. S, " ehnaz, A. " Ozkul, and K. Erc"unay, "A case of central nervous system infection due to West Nile virus lineage-1 in Ankara Province, Turkey," *Mikrobiyoloji Bulteni*, vol. 47, no. 1, pp. 164–172, 2013.
136. A. Sribu, C. S. Ceianu, R. I. Panculescu-Gatej et al., "Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010," *Eurosurveillance*, vol. 16, no. 2, 2011.
137. ECDC, Mission reports, 2011. West Nile virus infection outbreak in humans in Romania, 2010. October 2010, [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/mission reports/ Pages/index.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/mission_reports/Pages/index.aspx).
138. CFSPH, "West Nile virus infection, "Technical Factsheets, 2013, [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/west nile fever .pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/west%20nile%20fever.pdf).

139. F. Popovici, A. Sarbu, O. Nicolae et al., “West Nile fever in a patient in Romania, August 2008: case report,” *Euro Surveillace*, vol. 13, no. 39, 2008.

140. I. Garc'ia-Bocanegra, J. A. Ja'en-T'eliez, S. Napp et al., “West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 12, pp. 2397–2399, 2011.

141. I. Garc'ia-Bocanegra, J. A. Ja'en-T'eliez, S. Napp et al., “Monitoring of the West Nile virus epidemic in Spain between 2010 and 2011,” *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 59, no. 5, pp. 448–455, 2012.

142. World Organisation for Animal Health-OIE, “West Nile fever in Portugal,” Immediate Notification and Follow-Up Report no. 1, World Organisation for Animal Health-OIE, 2010.

143. Calistri, A. Giovannini, G. Savini et al., “West Nile virus transmission in 2008 in north-eastern Italy,” *Zoonoses and Public Health*, vol. 57, no. 3, pp. 211–219, 2010.

144. F. Monaco, R. Lelli, L. Teodori et al., “Emergence of West Nile virus in Italy,” *Zoonoses and Public Health*, vol. 57, no. 3, pp. 211–219, 2010.

145. P. Calistri, F. Monaco, G. Savini et al., “Further spread of West Nile virus in Italy,” *Veterinaria Italiana*, vol. 46, no. 4, pp. 471–474, 2010.

146. C. Rizzo, P. Salcuni, L. Nicoletti et al., “Epidemiological surveillance of West Nile neuroinvasive diseases in Italy, 2008 to 2011,” *Eurosurveillance*, vol. 17, no. 20, 2012.

147. Circolare Ministeriale del 14/06/2013, “Sorveglianza dei casi umani delle malattie trasmesse da vettori con particolare riferimento alla Chikungunya, Dengue e West Nile Disease- 2013”.

148. Barzon, M. Pacenti, E. Franchin et al., “New endemic West Nile virus lineage 1A in Northern Italy, July 2012,” *Eurosurveillance*, vol. 17, no. 31, article 1, 2012.

149. World Organisation for Animal Health (OIE), “West Nile fever in Bosnia and Herzegovina. Immediate notification,” Follow-Up Report 1, OIE, 2013.

150. Daria Di Sabatino, Rossana Bruno, Francesca Sauro, Maria Luisa Danzetta, Francesca Cito, Simona Iannetti, Valeria Narcisi, Fabrizio De Massis, and Paolo Calistri, Epidemiology of West Nile Disease in Europe and in the Mediterranean Basin from 2009 to 2013 *BioMed Research International* Vol. 2014, Article ID 907852, 10 pages

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/907852>

151. M. Baymakova, E. Panayotova, I. Christova, S. Dakova, R. Mihaylova-Garnizova, K. Ramshev, K. Plochev West Nile virus infection in a Bulgarian man: case report, *Problems of infectious and parasitic diseases* Vol. 42, 2/2014.

152. West Nile virus in Europe in 2021 - infections among humans and outbreaks among equids and/or birds, updated 26 August 2021, European Centre for Disease Prevention and Control An agency of the European Union, Map 27 Aug 2021 Period: 20 Aug 2021 - 27 Aug 2021.

153. С. Чакърва, Програма за надзор и контрол на болестта треска от Западен Нил през 2016-2018 г. Национална програма за профилактика, надзор, контрол и ликвидиране на болестите по животните, включително зоонозите в Р. България за периода 2016-2018г.

БАБХ, www.babh.government.bg

София,

15.09.2021 г.

Изготвил:

проф. Георги Георгиев д.в.м.н.