С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

2 Разпространение и епизоотологични особености на Инфлуенца А по птиците в Европа и Света

7 Разпространение и епизоотологични особености на инфлуенца А по птиците в Европа, Азия и Света

29 Разпространение и епизоотологични особености на инфлуенца А по птиците в България

29 Слабопатогенни вируси различни от H5 и H7, изолирани в България

34 Силнопатогенни и слабопатогенни вируси субтип H5 и H7, изолорани в България

34 Слабопатогенни вируси субтип H5 и H7

35 Високопатогенни вируси субтип H5

49 Изводи и препоръки

52 Литературни източници

Разпространение и епизоотологични особености на Инфлуенца А по птиците (в България, Европа и Света)

ас. Георги Стоименов[1], доц.Габриела Гужгулова[2], проф.Бойко Ликов [3] и проф. Георги Георгиев[3]

1.Факултет по Ветеринарна Медицина -Лесотехнически Университет -София
2.Национален Диагностичен Научноизследователски Институт-БАБХ/София
3.Център за оценка на риска при Българска Агенция по Безопасност на храните

1.Разпространение и епизоотологични особености на Инфлуенца А по птиците в Европа и Света

Инфлуенца вирусът принадлежи към семейство *Orthomyxoviridae*. Името на семейството произлиза от гръцката дума 'Муха', с което се отразява склонността на вируса към епителните клетки, покриващи респираторния тракт. Думата "инфлуенца " идва от италиански (influentia), защото хората вярвали, че влиянието на планетите, звездите и луната причиняват внезапното появяване на това тежко заболяване. Англичаните приемат думата "инфлуенца" в средата на XVIII век, а французите го нарича *La grippe om gripper,* което означава "хващам, захващам, сграбчвам." (Adams, 2010). Има и подобно звучаща фраза на арабски, *anf-al-anza*, което означава "носът на козела", защото се е смятало, че козите пренасят заболяването.

Грипът (сезонната инфлуенца) е инфекциозно заболяване по хората. Причинява се от три групи грипни вируси - А (два подтипа), В и С. Тип А се разделя в подтипове, според характеристиките на две повърхностни белтъчни молекули.

Подтиповете се отбелязват по следния начин: А (H1N1), като цифрите след обозначението на белтъчните молекули е специфично за подтипа. Тъй като тези вируси са слабо устойчиви на топлина и изсушаване, типичното разпространение на заболяването е характерно за влажните и студени месеци от годината. В тези месеци на годината обикновено се събират по-големи групи хора на затворени места (градски транспорт, учреждения и др.), което също способства за бързото и широко разпространение на инфекцията през този сезон на годината.

Грип тип А и В са разпространени по целия свят и се проявяват предимно през зимата под формата на епидемии. Грип С се появява единствено спорадично и води до заболяване с леко протичане.

Инфлуенчните вируси имат сложна структура на липопротенивата си обвивка, която съдържа хемаглутинини и хеураминидазни антигени, До сега са установени 18 вида на хемаглутинин и 11 на неураминидазата. При птиците се срещат 16 HA и 10 NA от целият им брой , които определят генотипа на вируса. Водоплаващите и сухоземните птици са установени като резервоар на всичките грипни вируси с изключение на А (H17N10) и А (H18N11), които неотдавна бяха установени при прилепи в Гватемала и Перу. (Suxiang Tong, 2013)

Данни за това заболяване има още древни времена. През **412 г.** преди Христа Хипократ описва тежко заболяване при хората, което най-вероятно е било инфлуенца. Според историците първата възможна грипна епидемия в Европа е била през **1173 г.** Има данни, че индианците на остров Hispaniola са били заразени със свински

грип през **1493 г.**, пренесен от прасета на борда на корабите на Колумб. Според медицинската статистика в рамките на последните 400 години е имало 12 пандемии, като 11 от тях започва в Китай.

Високопатогенната инфлуенца по птиците е описана за първи път през **1878г.** от Perroncito, а първата документирана пандемия сред хората е била описана през 1889-90г. Наречена е Руски грип , причинен от субтип H2N2, починали са около един милион души.

Изминалият 20-ти век се характеризира с няколко по-големи пандемии при хората, първата, от които е през **1918-1919 г. (H1N1)**. Заболяването, познато още като Испански грип, се разпространява бързо и обхваща голяма част от населението. Заразените хора, не умират от вируса, а от вторичните усложнения, причинени от бактерии, като пневмония.

По време на пандемията през 1918, приблизително 20% до 40% от населението в света се разболява и около 50 милиона души умират, от които близо 675 000 в САЩ.

За разлика от предишни пандемии и сезонните грипни епидемии, тази от 1918 е засегнала предимно здрави възрастни индивиди. Най-много болни и починали е имало в възрастовата група от 20 до 50 години. Причините за това остават неизвестни. По-късно е доказано, че вирусът има птичи произход (Taubenberger et al., 2005).

В средата на **1930-те** години, учените разработили нов електронен микроскоп, което им позволило да видят и снимат грипен вирус. До тогава се е смятало, че заболяването се причинява от бактерии. През следващите години са определени, изолирани и идентифицирани трите типа грипни вируси - A, B, C. Тип A засяга голяма част от бозайниците. Тип B инфектира само човека и протича в по-лека форма на заболяване. Тип C няма клинично значение, т.к рядко предизвиква клинични симптоми при хора и свине (Lamb, 2001).

В края на 20-те години на миналия век Richard Shope доказва за първи път вируса на инфлуенца в прасета (Shope, 1939). През **1933 г.** Sir Christopher Andrewes, Wilson Smith и Sir Patrick Laidlaw изолират инфлуенца при хора. През **1955 г.** Sir Christopher Andrewes,

Burnet и Bang доказват, че агента, които причинява така нареченото заболяване “Класическа чума” (Fowl plague) е вид инфлуенчен вирус (Adams, 20)10.

Втората пандемия при хора, която отнема живота на над 1 700 000 човека е през **1957-1958 г. (H2N2)** в Азия. През февруари 1957 г., нов грипен вирус е идентифициран в Далечния изток. Имунитет към този щам при хора на възраст под 65 години е било рядкост, за това се е прогнозирала нова пандемия. За да се подготвят, здравните власти започват строго мониториране на грипни епидемии. Производството на ваксина започва в края на май 1957 г. и е на разположение в ограничени количества от Август 1957.

През лятото на 1957 г., вирусът се появява в САЩ. Започва с поредица от малки огнища, до момента когато децата тръгват на училище. Инфекцията достига своят връх през октомври 1957 г. Най-висок процент на засегнати са децата в училищна възраст, млади хора и бременни жени. През декември 1957 г., изглежда, че най-лошото е минало.

През януари и февруари на 1958 г., се появява нова вълна от заболявания. Това е пример за потенциалната "втората вълна" на инфекция, които могат да се случат по време на пандемия.
Повечето смъртни случаи са при възрастни хора развили тежка форма на пневмония. Въпреки, че пандемията 1957 г., не е толкова пагубна както тази през 1918 г., около 69 800 души в САЩ са починали.

През **1962 г.** и **1964 г.** в Япония и Тайланд отново същият щам причиниява ендемии.

В Хонконг през **1968-1969г.** субтип **H3N2** причинява третата пандемия. В началото на 1968 г., нов грипен вирус е открит в Хонг Конг. Първите случаи в Съединените щати са били открити още през септември 1968 г. заболяването не е било широко разпространено в САЩ до края на декември 1968 г. Смъртните случаи от този вирус са достигнали своя връх през декември 1968 г. и януари 1969 г. Хората над 65-годишна възраст са били най-засегнати. Броят на смъртните случаи от септември 1968 г. и март 1969 г. е 33 800, което го прави най-леката грипна пандемия през 20-ти век. Същият вирус завърна през 1970г. и 1972 г.

По-ниският процент смъртност при тази пандемия се дължи

вероятно на няколко факта:

• Грипния вирус е бил сходен в някои отношения с този от пандемия през 1957г. Вероятно, голяма част от населението е имало вече изграден имунитет.

• Пикът на пандемията е била през декември 1968 г., когато учениците са във ваканция, и съответно не е имало контакт между възприемчиви индивиди.

• Подобряване на медицинското обслужване и използването на антибиотици при вторичните бактериални инфекции са били на разположение на всички болни.

За първи път през **1972 г.** е изолиран вирус от свободно живеещи патици.

В Русия през **1977 г.** инфлуенцата субтип **H1N1** засяга отново хора и причинява епидемия.

Грипът (инфлуенцата) по птиците, се предизвиква от influenza A вируси, и засяга голям спектър от домашни и диви птици. Инфекцията може да протече от асимптоматично и леко неразположение до тежка епидемия и бърза смърт, което зависи от вирулентността на вируса и чувствителността на заразените птици. Инфекциите с птичи грип при домашните кокошеви видове (кокошки и пуйки) се класифицират като отро протичащи с две форми-**високопатогенна птича инфлуенца** (highly pathogenic avian influenza - HPAI), известна още като чума по птиците (fowl plague) и **слабо патогенна птича инфлуенца** (low-pathogenic avian influenza - LPAI). Инфлуенцата по птиците, предизвиквана от HPAI вируси обикновено се свързва с висока вирулентност, патогенност на вирусите и смъртност, която може да достигне до 100%. В същото време слабо патогенните вируси на птичата инфлуенца (LPAI) са предимно с ниска вирулентност, но във фермите тези щамове трябва да се контролират, защото LPAI вирусите потенциално могат да станат „градивен материал” за нови

щамове, понеже по своята същност постоянно се променят генетично и могат да еволюират до силно патогенни (HPAI) вируси. В последните години познанията ни за епизоотологията и молекулярната биология на тези вируси и свързаните с нея патогенност и вирулентност хвърлиха нова светлина върху екологията и миграцията на тези вируси, както сред популациите от диви прелетни птици, така и сред домашно или промишлено отглежданите представители на кокошевите и гъсковите видове.

2. Разпространение и епизоотологични особености на инфлуенца А по птиците в Европа, Азия и Света

През **1996 г.** Азиатската форма на HPAI **H5N1** е открита в домашни гъски в Guangdong, Китай (Adams, 2006). През **1997 г.** вирусът инфектира 18 човека в Хонк Конг и при 6 от тях болестта завършва фатално. Доказано е, че хората са се заразили от домашни птици на пазарите за живи животни. Вирусите са изследвани и е установена близка родственост до тези, които циркулират в Китай. Унищожени са 4 милиона кокошки и патици.

През **1996 г.** в Великобритания, **H7N7 LPAI**, причини конюнктивит при човек, почистващ ферма за патици.

През декември **1999 г.** в Италия се появи епидемия от **H7N1**, причинявайки тежки икономически загуби за птицевъдството в Северна Италия. Засегнатите региони - регионите Венето и Ломбардия - са гъсто населени с домашни птици; в някои общини до 70 000 птици / km2. След влизането на вируса HPAI в популацията на птиците в този гъсто населен район, той се е разпространил бързо. През 2000 г., Италия обявява общо 351 огнища и на около 14 милиона домашни птици са умрели или са били умъртвени и унищожени. Основните причини за това са се дължали:

• на недостатъците на прилаганите мерки за биосигурност, напр. липса или недостатъчни физически бариери между съседни стопанства

• обичайната практика на земеделските производители да споделят оборудване и персонал

• плътна популация от домашни птици

• циркулация на LPAI вирус почти една година.

През **1999 г**. в Китай и Хонг Конг **LPAI (H9N2)** причинява грипоподобно заболяване у хора.

Вторият сериозен птичи грип в Европа се появи през **2003 г. (H7N7)** в "Gelderse Vallei", област в централната-източната част на Холандия в район с висока плътност на птицеферми. Независимо от стриктното прилагане на мерките за ликвидиране на болестта, включително използването на превантивно умъртвяване на стадата, в радиус от 1 км от заразената ферма, инфекцията се разпространява бързо. По време на епидемията са съобщени общо 241 огнища. Броят на птиците евтаназирани е около 30 милиона; около 25 милиона птици са били умъртвени в резултат на обезлюдяване на заразените стада, около 4,5 милиона птици, умъртвени с цел хуманно отношение и около 175 000 птици, умъртвени в задните дворове. По време на прилагането на мерки за унищожаване на вирусът се предава на хората, пряко ангажирани в обработката на заразени птици. Заболелите хора проявяват признаци на конюнктивит, като има доказателство и на предаване от човек на човек. Засегнати са 89 човека, от тях с клиника са били 78, и има един тежък случай с развитие на пневмония, който завършва фатално.

През **2004г. LPAI H10N7** беше доказан у две деца в Египет. До тогава е засягал само животни. (EID Weekly Updates, 2004).

Субтип **H5N1** се появява отново през **2002 г.** в Хонк Конг, като този път няма човешки жертви. Отново вирусът е близък до циркулиращите в Китай и до този, появил се 5 години по-рано (Бюлетин от WHO, 2005). **Януари 2003 г.** Виетнам обявява високопатогенна инфлуенца в една ферма. Унищожени са 70 000 птици. По-късно същата година вирусът засяга и хора. През същата година огнища при домашни птици обявяват Лаос, Тайланд, Република Корея и други страни от Югоизточна Азия.

Таблица 1. Огнища на LPAI и HPAI причинени от субтипове H5 и H7 на инфлуенца А по птиците

Страна	година	субтип	вирулен-тност	Инфектирани и унищожени птици	Мерки за контрол
Мексико	1994, 2003	H5N2	LPAI/HPAI	1 000 000 000	Ваксинация
Пенсилвания	1996, 1998	H7N2	LPAI	2 623 116	Депопулация
Австралия	1997	H7N4	HPAI	310 565	Stamping out
Хонг Конг	1997, 2003	H5N1	HPAI	3 000 000	Stamp-ing out, ваксинация
Италия	1997	H5N2	HPAI	7741	Stamping out
Ирландия	1998	H7N7	LPAI	320 000	Депопулация
С. Ирландия	1998	H7N7	LPAI	?	Депопулация
Италия	1998	H5N9	LPAI	2000	Stamping out
Белгия	1999	H5N2	LPAI	100	Stamping out
Италия	1999 2001	H7N1	HPAI/LPAI	17 000 000	Ваксинация/ stamping out
Канада, Онтарио	2000	H7N1	LPAI	?	None
Пакистан	2001, 2004	H7N3	HPAI/LPAI	10 000 000?	Ваксинация
САЩ, Северна Каролина, Вирджиния	2002	H7N2	LPAI	5 000 000	Stamping out
Чили	2002	H7N3	LPAI/HPAI	1000000	Stamping out
Италия	2002, 2003	H7N3	LPAI	6000000	Ваксинация/ stamping out
Холандия	2003	H7N7	HPAI	30 283 000	Stamping out
Белгия				2 700 000	
Германия				419 000	
САЩ, Кънектикът	2003	H7N2	LPAI	2 900 000	Ваксинация
Дания	2003	H5N7	LPAI	12 000	Stamping out

САЩ, Далауеър, Мериланд	*2004*	*H7N2*	*LPAI*	*425 000*	*Stamping out*
*Югоизточна Азия**	*2003, 2004*	*H5N1*	*HPAI*	*100000000*	*Варира*
Тайван	*2004*	*H5N2*	*LPAI*	*66 600*	*Stamping out*
Канада	*2004*	*H7N3*	*LPAI/HPAI*	*16 000*	*Stamping out*
САЩ, Тексас	*2004*	*H5N2*	*HPAI*	*6608*	*Stamping out*

** Камбоджа, Китай, Индонезия, Япония,Лаос, Република Корея, Тайланд, Виетнам*

Вирусът продължава да нанася щети в птицевъдството в страните от Азия и през **2004 г.** За първи път са обявени огнища в Индонезия, Тайланд, Корея, Япония. Във Виетнам продължава разпространението, като има и 18 потвърдени случая при хора. **Март 2004 г.** в Азия са починали вече 23 души и 100 милиона птици са унищожени. **Август 2004г.** Малайзия за първи път обявява огнище при домашни птици. До края на годината 9 страни са засегнати от вируса в 8 от тях огнищата са при домашни птици (Бюлетини от FAO и WHO). През **януари – март 2005 г.** Тайланд, Виетнам и Хонконг продължават да обявяват огнища. В Китай 6000 мигриращи птици умират през **април – юни 2005 г.** от вируса H5N1. **Юли 2005 г.** Русия и Казахстан потвърждават HPAI по домашни и диви птици. **Август 2005 г.** в Монголия около 90 мигриращи птици са засегнати от H5N1. **Октомври 2005 г.** вирусът на инфлуенца А достига Румъния (21 огнища до декември 2005г.) и Турция (1 огнище, 3700 унищожени птици) чрез миграцията на диви птици. До **декември 2005 г.** 17 страни са обявили H5N1 огнища, при 13 от които са засегнати и домашните птици (Adams, 2006). През **януари 2006 г.** субтип H5N1 на AIV е установен при лебеди в България. **Февруари 2006 г.** вирусът "прескача" в Африка, като засяга домашни птици в Нигерия. В Европа той бързо се разпространява на запад чрез дивите птици (Италия, Гърция, Швейцария). **Април 2006 г.** H5N1

е потвърден вече в 45 страни на 3 континента. **Юли – Август 2006 г.** Тайланд обявява огнища на HPAI при домашни дворни птици – патици, кокошки и бойни петли, които се отглеждат заедно. Септември 2006 г. в Индонезия разпространението на вируса взима застрашителни размери с мащаб на ендемия. **Декември 2006 г.** до момента 56 страни са обявили H5N1 огнища, при 38 от които са засегнати и домашните птици. **Януари – Февруари 2007 г.** Унгария, Япония, Виетнам, Корея, Тайланд, Пакистан, Русия, Турция, Лаос, Афганистан, Мианмар обявяват отново огнища. Във Великобритания за първи път има птици засегнати от инфлуенца субтип H5N1. Унищожени са 159 000 пуйки. Кувейт, която до момента е била свободна от това заболяване страна, обявява няколко огнища при домашни птици. Унищожени са общо 1,5 милиона. За първи път HPAI при домашни птици обявяват Пакистан през март, Саудитска Арабия - **април**, Гана – **май,** Того - **юни 2007. Юли 2007 г.** в Европа, Азия и Африка засегнатите страни продължават периодично да обявяват огнища. Франция обявява за първи път за тази година H5N1 по лебеди. **Септември – Декември 2007г.** Германия, Русия, Китай, Виетнам, Румъния, Мианмар, Пакистан, Саудитска арабия, Великобритания, Полша, Русия, Пакистан, Бенин продължават да обявяват нови огнища и случаи на инфлуенца А по диви и домашни птици. От **2003 до края на 2009 г.** има общо 467 случая на засегнати хора, от които 283 са починали (Бюлетини от FAO и WHO).

През **2007г. LPAI H7N2**, след огнище при кокошки в Уелс, Великобритания заболяват отново хора, с грипоподобни симптоми и конюнктивит.

През същата година в Хонг Конг **LPAI H9N2**, предизвиква заболяване при малко дете.

През пролетта на **2009г.** се появи нов вирус, субтип **H1N1p**, т.н. свински грип. Първият регистриран случай в САЩ е на 15.04.2009г. До юни месец същата година са докладвани 18000 случая при хора в САЩ, и са засегнати общо 74 държави. До края на годината се разпространява в 208 страни, като починалите са над 18 000.
Вирусът H1N1p се разпространи в северното и южното полукълба през пролетта и лятото на 2009 г. Този период е извън нормалния грипен сезон в страните с умерен климат в северното полукълбо, но

в типичния за зимния сезон за предаване грип за страни от южното полукълбо. В повечето страни епидемия от H1N1p се превърна в доминираща, и замени сезонните щамове на инфлуенцата.

Като всяка пандемия и тази с H1N1p (пандемичен) през 2009-2010г. има своите отличителни белези. Определящите фактори са климатични условия, като температура и влажност на въздуха, начинът на предаване на вируса, придобития имунитет в засегнатото население, модели за контакт в общността, колективни и индивидуални мерки за ограничаване разпространението на вируса. Интересното тук е, че децата и младите хора (<20 години) са значително по-податливи на заразяване с H1N1p от възрастните. Този факт вероятно се дължи на кръстосаната имунна памет от прекарали предходни инфекции с други, не H1N1p грипни щамове. По данни на СЗО през периода на пандемията са обхванати над 200 държави по света, от които над 18 000 случая са завършили фатално (Faix, 2009). По време на пандемията има съобщения и за заразени животни. Първият случай при свине е от пролетта на 2009г. във ферма в Канада. По-късно е установено, че вирусът е идентичен с този, предизвикващ заболяване при хората. Следва вълна от огнища в различни ферми по света, като засегнатите държави са 24 (Канада, Аржентина, Австралия, Чили, Обединеното Кралство, Ирландия, Норвегия, Япония, Исландия, САЩ, Тайпе, Индонезия, Финландия, Италия, Мексико, Германия, Китай, Тайланд, Корея, Русия, Дания, Франция, Сърбия, Хонг-Конг – посочени по хронологичен ред), от които 11 в рамките на Европа. Освен свине има данни и за заболели пуйки, кучета и котки.

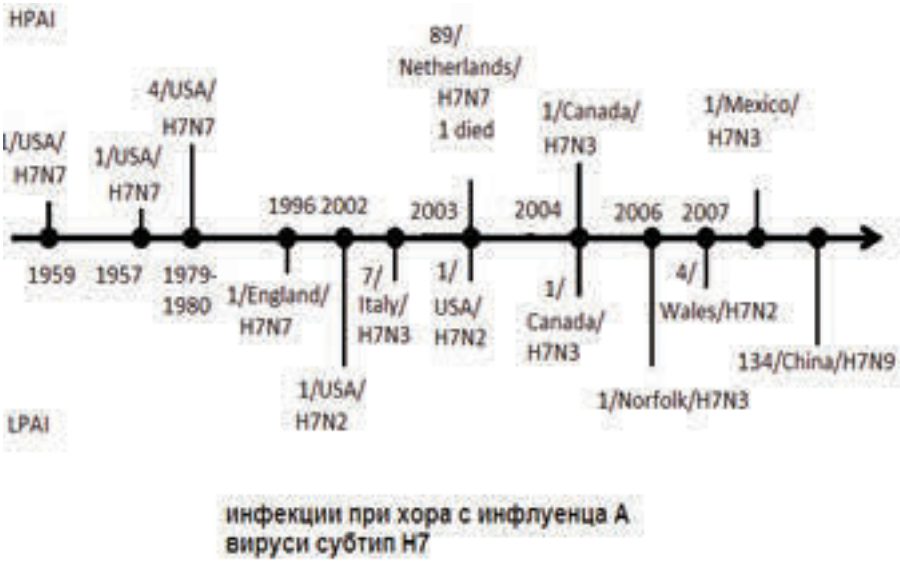
През **март 2013г.** здравните власти на Китай докладваха три случая на инфектиране на хора с нов птичи грипен вирус H7N9. В периода 1996 г. до 2012 г. инфекции на хора с птичи инфлуенца вируси, субтип H7 са докладвани в Канада, Италия, Мексико, Холандия, Обединеното Кралство и САЩ. Повечето от тези случаи са свързани с огнища при домашни птици.

Новият вирус H7N9, проявява по-агресивно поведение от докладваните случай до сега. До 12 август 2013 г. броят на лабораторно-потвърдените случаи при хора достига 135, от които 44 са смъртните случаи. Засегнати са седем провинции: Shandong,

Zhejiang, Henan, Hunan, Fujian, Jiangxi, и Jiangsu, и община Пекин, както и един случай в Тайпе (Li и сътр. 2013 г.). При генетичното проучване на вируса е установено, че хемаглутининът е с високо ниво на идентичност (95%) с H7N3 вируси, открити наскоро в патици от пазари за живи птици в Китай (Shi и др. 2013). Неураминидазата има 96% идентичност с N9 гени от вируси, циркулиращи наскоро в домашни патици в Китай и Корея, но има характерни деления на 15 нуклеотида (аминокиселини 69-73), започващи от позиция 215 (Shi и др. 2013). Останалите шест вирусни гена (PB2, PB1, PA, NP, M и NS) имат най-голяма идентичност (99%) с H9N2 птичи вируси, които циркулират в Китай от 1994 г. насам (Shi и др. 2013, Chen et al. 2013 г.).

Тези данни показват, че H7N9 вирусите при човешките случаи са най-близко родствени с неидентифицирани вируси на инфлуенца по птиците, получени от няколко потенциални родителски щама. Прегледът на литературата показва, че до сега хора не са се заразявали с H7N9 вирус (Фигура 1), както и не са били откривани и животни, носители на този вирус.

На 4 април 2013 г., само няколко дни след установяването на H7N9 при хора, Министерството на земеделието на Китай съобщава за наличие на нископатогенна инфлуенца по птиците, причинена от H7N9 в град Шанхай. Процентът на идентичност на новоизолирания птичи вирус с H7N9 вируса, изолиран по-рано от хора е 99%, от което може да се предположи, че човешките инфекции най-вероятно са в резултат на контакт с птици. На 6 април 2013 г., веднага след доказването на инфекцията с H7N9, общинските органи на Шанхай затварят пазарите за живи птици. През следващите седмици се констатира значително намаляване на заболелите хора, което допълнително подсказва, че основният рисков фактор е излагане на заразени домашни птици (CDC 2013).



Фигура 1. Инфекции при хора с инфлуенца А вируси субтип Н7 от 1959 г. до 20 юли 2013 г.

H7N9 вирусите вероятно се предават по-лесно от животните на хората, отколкото азиатският вирус А (H5N1), както може да се съди по ниската честота на откриване при домашни птици и относително високия брой на човешките случаи, констатирани от началото на епидемията (CDC 2013). След направени проучвания обаче не е установена възможност за предаване на H7N9 вируса от човек на човек, но тази възможност не може да бъде изключена в рамките на няколко малки затворени групи от инфектирани хора.

Изолираните до сега H7N9 вируси показват някои различия в гените, което предполага и различна еволюционна траектория на отделните грипни щамове. Например при A/Shanghai/1/2013 (H7N9) вируса, в гена, кодиращ нуклеопротеина (NP) има съществено различие, в сравнение с другите H7N9 вируси, както и в неураминидазата има заместване на аргинин (R) с лизин (K) в позиция 292, което води до намаляване на ефикасността на антивирусните препарати oseltamivir и zanamivir. (McKimm-Breschkin 2013, Guba-

reva et al. 1997). Освен това въз основа на последователността на аминокиселините бази на M2 протеина, H7N9 вирусите се очаква да бъдат устойчиви на противовирусните лекарства на базата на адамантан (Gao и др. 2013 г.). До момента няма данни за наличие на кръстосана реактивност на новоизолирания вирус с антитела, образувани при прилагане на настоящите сезонни ваксини, което от своя страна определя наивитет на човешката популация спрямо H7N9.

Този щам спорадично се появява в Азия, последните 6 случая са от април 2015г. в Китай. Все още няма данни за предаване от човек на човек, всичките 6 случая са имали близък достъп до птици от заден двор. Въпреки слабото разпространение обаче, процентът смъртност при заболелите варира от 20 - 30%. Две трети от болните са хора на възраст 50г. и повече, а от тях две трети са мъже. Вероятно тези разлики се дължат на разликите в експозицията на вируса и биологичната чувствителност на двата пола. Този феномен учените го обясняват с т.н. *antibody-dependent enhancement*. По-възрастните китайски мъже имат повече излагане на H7 птичия грипни вируси през живота си, поради работата, която работят. Имунната система реагира по-особен начин образувайки слаби кръстосано-реагиращи антитела, които образуват свързващи комплекси улесняващи поглъщането и репликация на вируса. При последващо заразяване, индивидът вместо да има частичен имунитет, заболява по-тежко.

През **2013г.** се появи и още един вирус в Китай субтип **H10N8**, който причини пневмония и смърт на човек в Nanchang. При направените проучвания, се установява замърсяване на околната среда, с вируси субтип H5, H9 и H10. След генетичен анализ се установява, че H10N8 има ген от родител субтип H9. Наличието на H10, H9, N8 при пилета, предполага, че те са били „генетичният съд“, в който е станала реасортацията. (Maohong Hu, 2014).

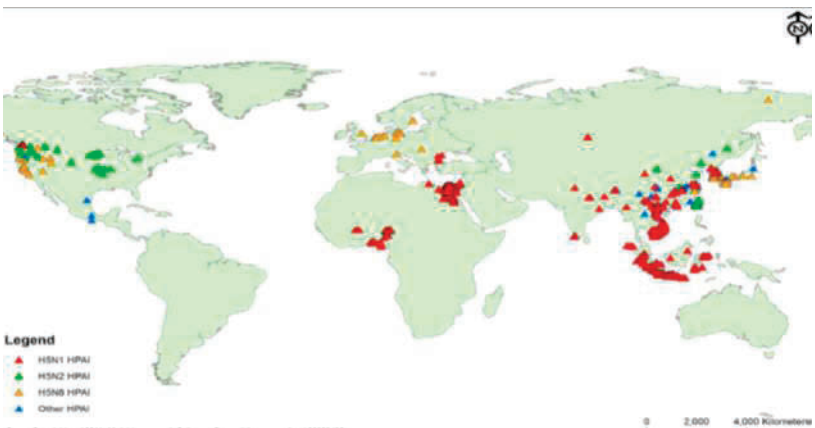
В началото на **2014г.** се появи нов вирус **H5N8** в птицеферми от Южна Корея. Данни за него има от 1983г, когато е установен при домашните патици и пуйки в Ирландия. През 2010 г. огнища на инфекцията с вируса при гъски са докладвани в ферми в провинция Яангсу, Китай. До март 2015г. само в Корея има 47 огнища и 545,000 умрели или убити домашни птици.

От януари до ноември 2014 г. инфекцията засегна редица страни в Азия, Европа,Африка и Америка (Фиг. 2). Данните на OIE показват, че през 2015г. в 28 страни са били регистрирани огнища на Високопатогенната птича Инфлуенца А с вирусни щамове, съдържащи H5 и H7, през 2014г. Те са били регистрирани в 19 страни, а през 2013г.- в 14 страни. 8 Инфлуенца А вирусни субтипове бяха с разпространение на 4 континента през 2014-15г., както следва:

• Съдържащи HA H5 - H5N1, H5N2, H5N3, H5N6, H5N8 и

• Съдържащи HA H7 - H7N2, H7N3, H7N7 и H7N9.

Сред тях убтипът H5N1 се счита за най-опасен и с най-висок потенциал като кандидат за поява на „пандемичня“ щам при хората. След широкото си разпространение в периода 2004-2008г., този H5N1 субтип остана ендемичен за Югоизточна Азия, Западна Африка и Египет.

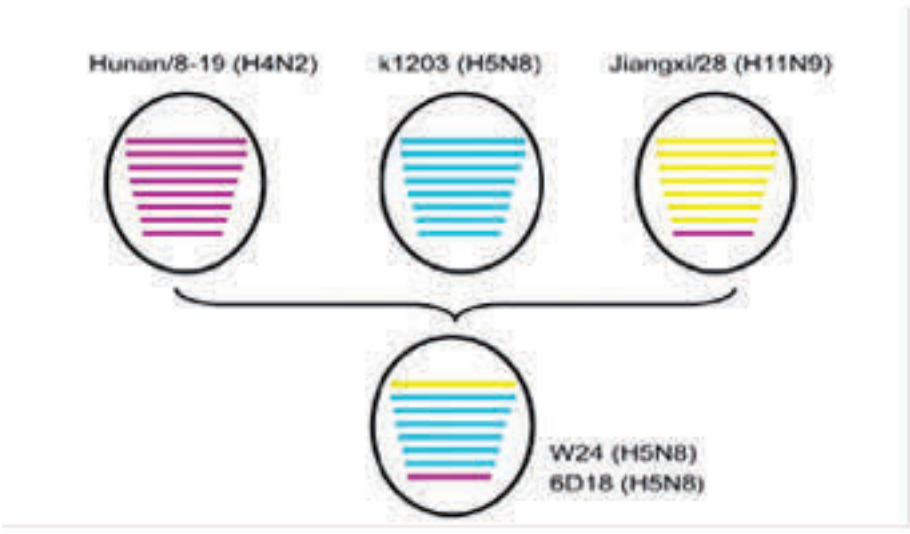


Фигура 2. Глобална експанзич на инфекции с Инфлуенца А вируси а ХА H5 и H7 през 2014-2015 г. в Света.

Проучванията на Корейският HPAI H5N8 показаха, че принадлежи към генетичен Clade 2.3.4.6 и е представен от два различни генотипа. Предполага се, че вирусите принадлежащи към основните генотипове Buan2 и Donglim3 са реасортанти. Те съдържатвирусна РНК полимераза, като основен протеин 2 (PB2),

хемаглутинин (HA), нуклеопротеин (NP) и невраминидаза (NA), гени от вирусите H4N2, H5N8 и H11N9, предизвикали заболяване в Китай през 2010г. Вирусите HPAI H5N8 са изолирани от диви и домашни птици. Установени са при уловени, видимо здрави мигриращи диви птици и в мъртви птици, включително и зеленоглави патици, както и в домашни кокошки, гъски и патици.

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



Фигура 3 Възможна схема на извършване на рвасортацията на гени между птичите грипни вируси H4N2, H5N8 и H11N9 и размяната на гени между тях за получаването на новия HPAI H5N8

Интересни са проучванията направени с изолатите от 2014г. в Южна Корея. Смъртността при H5N8 вируси от 2014 г. варира от 0% - 20%,а при H5N1 вируси от 2008 г. и 2010 г. е съответно 50% -100%. Въпреки това, при H5N8 вирусоизлъчителството от домашни патици е много по-голяма (104.5 TCID50 / 0,1 мл), докато при H5N1 вируси, открити в Южна Корея през 2008 г. и 2010 г. е доста по-слабо (съответно 103.8 TCID50 / 0,1 мл и 102.8 TCID50 / 0.1 мл). Способността на тези нови реасортантни H5N8 вируси (Фиг.3), да се реплицират успешно в дихателния и чревния тракт, без да убиват заразените патици им позволява да циркулират по ускорено в рамките на популацията и увеличава възможността им за предаване между птицефермите. По време на епидемията през 2014г. H5N8 в Южна Корея клиничните признаци и смъртността са били рядкост, най-често е установявансамо спад в производството на яйца. До сега направените проучвания показват, че домашните патици могат да бъдат „мълчаливи" носители на H5N8.

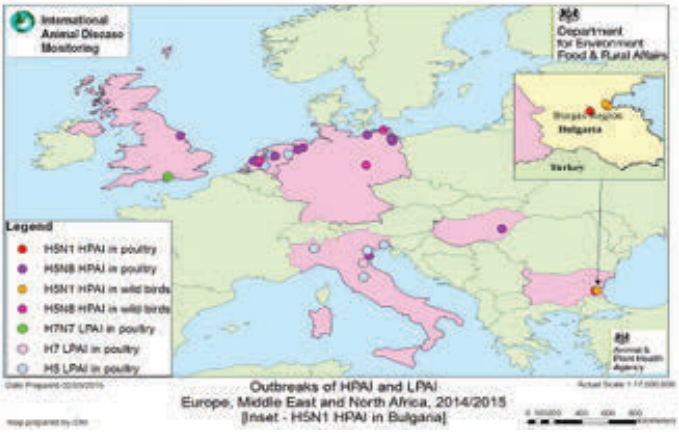
Tangetall., 2009 г. предполагат, че определени замествания на аминокиселини (Q → L в позиция 9) и деленията на една аминокиселина в мястото на разцепване на хемаглутинина, може да бъдат определящи за патогенността на вирусите. При проучването на Корейските H5N8 вируси е установено, наличие на L в позиция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

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

Много от H5N1 вируси, които се появиха след 2002 г. имат високо съдържание на вирус в проби оттрахея. В случая с H5N8 вирусните титри и вирусо излъчитеството са високи не само в носоглътката, но и в клоакалните проби, което показва, че

H5N8 вирусите могат ефективно да се предават чрез дихателната ихраносмилателния система.

През ноември и началото на декември **2014 г.** няколко епизоотични огнища на високопатогенната птича инфлуенца (HPAI) от субтип **H5N8** бяха отбелязани в птицевъдни ферми в Западна Европа (Германия, Холандия, Обединеното Кралство, Италия и отново провинция Саксония в Германия). Високо патогенният вирус на птичата Инфлуенца А (HPAI) от щам H5N8 бе установен още в началото на 2014 г. в Азия в Южна Корея, Япония и Китай. Проникването на вирус от субтип H5N8 в Европа бе осъществен с участието на различни диви прелетни птици, като вектори на предаване на заразата. Не съществува директен миграционен път на птици от Югоизточна Азия до и за Западна Европа. Последователните епизоотични огнища в Европа най-вероятно са резултат от кръстосани инфекции между дивите прелетни птици, започващо с припокриване на общите места за тяхната лятна миграция за развъждане или по точките за отдих по време на самата миграция от Централен Сибир с прекръстосване на коридорите, събиращи птиците от Източна Европа и Централен Сибир с посока Централна Европа. В Германия най-засегната бе провинция Меклембург Северна Померания. Инфекцията проникна във ферми с различни видове домашни птици от кокошия вид (Фиг.4). Засегнати бяха редица диви птици, някои от които прелетни като патици (Anas plathyrinhos). Дори дивите птици в зоопарка на гр. Рощок бяха засегнати от щама H5N8 (бял щъркел – White stork – Ciconia ciconia). В Долна Саксония и Тюрингия бяха засегнати домашни птици и пуйки за угояване.



Фигура 4. Повишена циркулация на различни субтипове HPAI вируси в Европа 2014/2015г.

В Унгария също бе установено едно огнище в Бекещ при патици за угояване, предизвиквано от щама H5N8. Последните данни за разпространение на инфекцията с HPAI H5N8 бе доказан при намерени умрели диви лебеди в центъра на гр. Стокхолм.

Проучванията направени на HPAI H5N8 изолирани в Европа през ноември и декември 2014 г. показват, че изолатите от Италия, Великобритания, Холандия и Германия имат една и съща последователност на аминокиселините в мястото на разцепване на хемаглутина, а именно RNSPLRERRRKR*GLFAIA. При филогенетичният анализ на 214 HPAI H5 вируси и въз основата на 1325 нуклеотида от хемаглутинина на H5N8 изолирани от Германия, Холандия и Великобритания, се установи 99,5-99,8% идентичност между тях. Доказа се, че европейските вируси принадлежат също към генетичен Clade 2.3.4.6. и имат близка родственост с корейските H5N8 изолати. Интересното в този анализ е генетичната им връзка и с H5N6 вируси изолирани в Китай през 2013-2014г., които също принадлежат към генетичен Clade 2.3.4.6. Най-близка родственост е доказана и между вирусите от генетичен Clade 2.3.4.6 с вируси изолирани от Непал през 2013 г. от генетичен Clade 2.3.2.1a. (Hyun-

Mi Kang, 2015).

Появилите се огнища на HPAI в Европа в края на 2014г. бяха ***резултат от директен или индиректния контакт с инфектирани диви прелетни птици,*** мигриращи по евроазиатските хоризонтални миграционни пътища и пропуски в мерките за биосигурност на фермите. По такъв начин ко-циркулацията на няколко генетични линии и субтипове на H5 HPAI в няколко континента имаше за резултат наличието на ***ускорена генетична еволюция и генетично разнообразие в тази група вируси*** с неизвестен механизъм на нейното трайно поддържане и разпространение в природата.

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

Откриването на HPAI H5N8 и неговите реасортанти при 17 вида прелетни птици е голямо предизвикателство и гаранция за техния потенциал да предизвикват тежко заболяване и смъртност при патиците и при някои видове диви, непрелетни – синантропни птици като орли и соколи. Изключително важно е да се установят вероятните преносители чрез налагане на мерките за активен надзор. Така след появата на HPAI H5N8 за период от 3 месеца са били тествани 4 018 птици, от които само две са са били заразени. Вирусът е бил изолиран предимно от евразийската дива патица свирачка (Anas Penelope). Този вид е мигриращ на далечни разстояния и вирус HPAI H5N8 е бил установяван при изследване на този вид патици в Южна Корея през 2014г. Следва да се отбележи, че установяването на вирус HPAI H5N8 при диви птици не е лесна работа. Те имат сравнително къс виремичен период и за да се установят вирусоносители следва да се вземат проби от голям брой птици. Установяването на антитела, обаче е значително по-лесна задача. За това серологичните изследвания при дивите птици следва широко да се използват. (Hyun-Mi Kang, 2015).

Първичните огнища от HPAI H5N8 и H5N2 започват **от заразени птици от т.н. „заден двор“** в Британска Колумбия –

Канада **при вероятен контакт с диви прелетни птици** и тяхната първична репликация. При по-нататъшното им разпространение ***по Тихоокеанският миграционен път чрез дивите прелетни птици*** към Северна Калифорния се разпространиха в щатите Вашингтон, Айдахо, Орегон и др. със засягане на големи ферми от пуйки или бройлери (Фиг.5).

Фиг.5. Високопатогенна птича Инфлуенца А от субтипове H5N8 и H5N2 в САЩ и Канада 2014/15 г. Огнища на високопатогенната птича инфлуенца до м. март 2015 (ляво) и до месец май 2015 г. (дясно). Вижда се отчетливо разпространението и хронологията на огнищата по основните миграционни пътища над континента.

През 2014-2015г. няколко последователни огнища на HPAI в Канада (Британска Колумбия), предизвикани от субтип **H5N2** на високопатогенна птича инфлуенца (HPAI) и последвалото установяване на субтип H5N8 при диви птици в съседния щат Орегон (САЩ) повиши бдителността на ветеринарните власти на САЩ и Канада. В резултат от извършваните задълбочени проучвания по линия на надзора на птичия грип на 12 ноември 2014г. в Канада, в щата Британска Колумбия на границата с щата Вашингтон (САЩ) бе установена завишена смъртност в стадо от 12 800 пуйки за угояване. В близост до стопанството от 2-3 седмици е имало около 300 мигриращи патици. В последствие заболяването обхвана още 10 крупни ферми с пуйки и пилета бройлери и доведе до унищожаването

на 320 000 птици (OIE 2014). Резултатите от геномните проучвания по недвусмислен начин показват произхода на щама H5N2, чиито ген за H5 е с произход от субтипа H5N8 на азиатските HPAI от клайд 2.3.4., изолиран от белочела гъска от Корея и на изолати от Япония и Русия /Байкал/ през 2014 г (OIE 2014b). Счита се, че невраминидазният компонент (N2) на вирус H5N2 е подобен на този компонент, изолиран от типични североамерикански вируси на птичата инфлуенца, съдържащи гена на N2 от вирус, изолиран от зеленокрило бърне през 2007 г.

В щата Вашингтон /САЩ/ в началото на декември 2014г. бяха установені последователно два различни щама на HPAI при отстреляни здрави диви птици – щам H5N2 при шилоопашата патица и щам H5N8 при исландски сокол. Това бе първият случаи, когато евро-азиатски HPAI вирус от субтип H5N8 навлиза в Северна Америка. Секвентният геномен анализ (CFIA 2014) на HA на вируса е бил подобен (от 99.0% до 99.3%) с вируси Influenza A/Broiler Duck/Korea/Buan2/2014 (H5N8 HPAI). Секвентният геномен анализ на невраминидазния ген (NA) е бил (от 99.6% и 99.7%) подобен на този от вирус Influenza A/waterfowl/Korea/S005/2014 (H5N8).

На 16 декември 2014г. в окръг Дъглас на щата Орегон САЩ се появи ново епизоотично огнище на високопатогенна птича Инфлуенца А от субтип H5N8 в смесено стадо от 100 птици - пилета, гъски, патици и токачки от стопанство от типа „заден двор“. Умират само пилета и токачки.

В щата Калифорния епизоотично огнище на HPAI H5N8 в началото на 2015г. бе предшествано от инфекция с щама HPAI H5N2 в щатите Вашингтон, и Айдахо. Те пък бяха предшествани от появата на H5N8 и H5N2 огнища в Британска Колумбия – Канада. След появата на епизоотични огнища в началото на март в щатите от Средния Запад където бяха засегнати ферми с пуйки за угояване епизоотолозите заподозряха и пряката роля на централния миграционен път над Северна Америка за улесняване предаването на заразата на големи разстояния. Така като причина за епизоотичните огнища в Северна Америка бяха установени двата основни магистрални миграционни пътя –Тихоокеанският и Централният (по река Мисисипи).

До момента най-засегнати са САЩ със 200 потвърдени огнища на Инфлуенца А ш 20 щата, довело до унищожаването на **50 милиона птици** от декември 2014 до май 2015 г. Това е най-голямата епизоотия от Инфлуенца по птиците в САЩ, регистрирана до момента. Най-новите засегнати щати са Кентъки и Небраска и Ню Мексико. В щата Индиана за първи път се появява щамът H5N8 в птици от т.н. „заден двор“ и първо установяване на този щам по миграционния път на р. Мисисипи (Фиг.6). За първи път в САЩ бе установен и HPAI от щама H5N1. Генетичният анализ показва, че този вирус е реасортант между Евразийския генетичен клон на H5 гена на H5N8 HPAI и N1 гена на Североамериканския клон на LPAI H5N1, който преди това е изолиран от диви птици.

Фиг.6. Основни миграционии потоци на дивите прелетни птици на Северна Америка (Тихоокеански и Централно американски по р. Мисисипи) с припокриване с Ешопазиатските пътища.

Канада също продължава да докладва за нови огнища на Инфлуенца по птиците в окръг Оксфорд (щата Онтарио) където са засегнати птицеферми с кокошки и пуйки, без да има пряка връзка

с по-рано обявените през тази година огнища в щата Британска Колумбия.

В началото на **2015 г.**, по време на усилиената циркулация на субпипове H5N8 и H5N2 в Европа проникна **H5N1** клейд 2.3.2.1.c, циркулиращ по същото време в Югоизточна Азия, Южен Китай, Виетнам и Индия. Бяха засегнати само две държави Румъния и България. Като в Румъния беше установен само при пеликани.

От циркулиращите постоянно в Югоизточна Азия генетични клейда на HPAI H5N1 (1, 2.1.3, 2.2, 2.2.1, 2.3.2, 2.3.4 и 7) за сега само вируси от генетични клейдове 2.2 и 3.2. са проявили способността си за пандемично (трансконтинентално) разпространение. Световно известни учени (Webster R.) считат, че останалите генетични клейдове на този вирус циркулират само в страните от региона на Югоизточна Азия и нямат склонност за пандемично разпространение.

До началото на месец май 2015 нямаше обяснение от къде е навлязъл отново в Европа щама H5N1 от HPAI от генетичен клайд 2.3.2.1.c. Сега това вече е ясно. Повечето засегнати диви птици от щама H5N1на HPAI са пеликани от вида Pelicanus crispus. Този вид прелетна птица мигрира на къси разстояния и дори многократното припокриване на неговите миграционни пътища и местообитания не може да обясни генетичния произход на циркулиращия щам от този генетичен клейд в Европа без данни за неговото засичане по миграционните пътища през Централна Азия. С установяването му в Алтайския край на Русия – 1 пеликан на (27.04.2015) и в Казахстан – 2 пеликана (22.05.2015 г.) в мигриращи птици, включително и в пеликани (Pelicanus crispus.) Изолираните вируси са от същия клейд 2.3.2.1 и имат 98.83% и 98.44% идентичност на последователностите при секвентен анализ на 258 bp от гена на хемаглутинина (H) с вирус Influenza A /Guandong /1/96 lineage, clade 2.3.2.1. от Китай и други вируси от Виетнам, изолирани в периода 2012-2014г. в югоизточна Азия и Индия.

През май вирусът HPAI от щам H5N1 и генетичен Clade 2.3.2.1.c продължи да предизвиква епизоотични взривове в Турция. Един умрял пеликан бе намерен на брега на Черно море в резерват в областта Кастрамону (Северна Турция).

На 20.05.2015г. бе съобщено за наличие на още едно, трето

огнище на HPAI, H5N1, засегнало стадо с 170 000 птици в региона на Маниса, който се характеризира с висока концентрация на птицевъдството в Турция.

В същото време вирусът на Високопатогенната птича Инфлуенца от щам H5N1 продължава да циркулира в Египет. Този вирус се загнезди в Централен Египет и делтата на реката Нил през 2007 г. и продължава за циркулира в тази екологична ниша и до днес. Генетичните проучвания показват, че той принадлежи към различен генетичен клейд 2.2, подгрупа 2.2.1. с много малки еволюционни промени, отнасящи се до вирулентността му и неговата патогенност за хора. Ежегодно Световната Здравна Организация на ООН съобщава за различно количество заразени с този вирус хора, а тази заразеност корелира с огромния брой на регистрирани случаи на инфекция с HPAI H5N1 пи домашните и диви прелетни птици. За 2014 г. и до януари 2015 година заразените хора в Египет от този вирус са 187.

Европейският Център за превенция и контрол на инфекциозните заболявания в бюлетина си от 20.12.2014г. прави оценка на риска за населението на Египет от заразяване с Високо патогенният вирус на птичата Инфлуенца А (HPAI) от щам H5N1. В него се изтъква, че след появата на този вирус в Египет здравните власти на тази страна спорадично съобщават за установяване на инфекция при хора с този вирус. Необичайно високото ниво на заразени хора през месец ноември 2014 г. в Египет се дължи на силното разпространение на този вирус сред домашните и дивите птици по цялото протежение на р. Нил и неговата делта. Наличието на висока корелация между местата с най-високо разпространение на заразата сред птиците и случаите на регистрирана инфекция с вируса H5N1 е показателен за това.

На 18.01.2015 г. Израелските компетентни ветеринарни власти обявиха за наличие на огнище на зараза във ферма с пуйки за угояване в Хайфа, свързано с висока смъртност. Изолираният щам на вируса на Инфлуенца А е бил Високо патогенен от щам H5N1. Вторият случаи на Високопатогенна Инфлуенца А по птиците, предизвиквана от щама H5N1 в Израел е от месец март 2015 г. (OIE, 2015). Това епизоотично огнище е било предизвикано от вирус

принадлежащ към генетичен Clade 2.2. и е било бързо ликвидирано, което не е позволило заразата да се разпространи и да предизвика вторични огнища. От тогава до сега още няколко големи ферми в палестинските територии и Хайфа бяха засегнати от този вирус, нанасяйки големи щети на отрасъла птицевъдство. Последното огнище е от 12.05.2015 г. в Хазафон, където са били засегнати 13 000 пуйки.

В същото време в Азия продължаваха да циркулират няколко щама HPAI съдържащи хемаглутинин H5 - H5N8, H5N6, H5N2. Установените общи преносители сред дивите прелетни птици за Северна Индия подхранват хипотезата за трайно заселване и циркулация на щама H5N8 в Индия по подобие на вируса HPAI H5N1 от клайд 2.2 след 2007 г. в Египет и Северна Африка.

Таблица 2. Данни за циркулацията на различни щамове на вируса на Инфлуенца А по птиците в периода 2013-май 2015 в целия свят

Държава	*Година*		
	2015	*2014*	*2013*
Австралия		*H7N2*	*H7N7, H7N2*
Бангладеж			*H5N1*
Бутан	*H5N1*		*H5N1*
България	*H5N1*		
Букина Фасо	*H5N1*	*H5N2*	
Канада	*H5N1, H5N2*	*H5N2*	
Камбоджа		*H5N1*	*H5N1*
Народна Република Китай	*H5N2, H5N6, H5N1*	*H5N1, H5N2, H5N6, H5N3, H5N8*	*H5N1, H5N2*
Китайски Тайпей	*H5N2, H5N8, H5N3*	*H5N2*	*H5N2*
Германия	*H5N8*	*H5N8*	
Хонг Конг	*H5N6*		*H5N1*

Унгария	*H5N8*		
Индия	*H5N1*	*H5N1*	*H5N1*
Израел	*H5N1*		
Италия	*H5N8*	*H5N8*	*H7N7*
Япония	*H5N8*	*H5N8*	
Република Корея	*H5N8*	*H5N8*	
Народна Република Корея		*H5N1*	*H5N1*
Лаос		*H5N6*	
Либия	*H5N1*	*H5N1*	
Мексико	*H7N3*	*H7N3*	*H7N3*
Мианмар	*H5N1*		
Непал		*H5N1*	*H5N1*
Холандия	*H5N8*	*H5N8*	
Нигерия	*H5N1*		
Палестина	*H5N1, H5N?*		
Румъния	*H5N1*		
Русия	*H5N8*	*H5N1, H5N8*	
ЮАР			*H5N2*
Швеция	*H5N8*		
Великобритания	*H5N8*	*H5N8*	
САЩ	*H5N8, H5N2, H5N1*	*H5N8, H5N2*	
Виетнам	*H5N1, H5N8*	*H5N1, H5N8*	*H5N1*

3. Разпространение и епизоотологични особености на инфлуенца А по птиците в България

България заема особено географско положение. На територията й се пресичат два основни пътя, по които дивите птици мигрират през есента на юг и се връщат обратно на следващата пролет. Тези пътища на миграция и този механизъм са еволюционно закрепени. По крайбрежието на Черно море и влажните му зони минава основния миграционен път, известен от древността като Via Pontica, с маршрут: течението на река Нил, бреговете на Източна Африка и Арабския полуостров, през Босфора, Бургаската езерна екосистема, Варненската езерна екосистема, езерата Дуранкулак и Шабла, а от там – по течението на река Дунав. По този път мигрират прелетните птици, които се събират от Северна Европа – Швеция, Норвегия, и останалите скандинавски райони, Западен Сибир, Полша. Вторият главен миграционен път на птиците е известен като Via Aristoteles. Той преминава и през територията на България - от долината на р. Струма, по Софийското поле и Искърското дефиле.

3.1. Слабопатогенни вируси различни от H5 и H7, изолирани в България

През 2004г. е изолиран за първи път в България LPAI субтип **H6N2** от зеленоглава патица обитаваща езерото Пода (Zarkov et al., 2006).

По-късно през 2006 и 2008г. са доказани и 7 слабопатогенни вируса, от които 2 при зеленоглави патици - **H4N6** и **H10N7** и 4 при патици мюлари - **H4N2**, 2 бр - **H6N5, H4N6**.

Зеленоглавите патици, са широко разпространен вид в света. В България има постоянна популация от около 6000 птици. По време на прелета им, броят им на територията на страната се увеличава и може да достигне до 148 000 (Kostadinova, 2007). Голямата численост, дългите миграции и влажните местообитания, определят зеленоглавите патици като един от векторите на разпространение на HPAI в света (Keawcharoen et al., 2008).

H10N7 е по-рядко срещан субтип. За първи път той е доказан

в Германия при пилета през 1949г., а при зеленоглави патици през 1977г. в Албърта, Канада. Инфлуенцата субтип H10N7 предизвиква от леко до по-тежко заболяване с 34% леталитет при птиците (Karunakaran at al., 1983; Serena Beato et al., 2006), но има данни че засяга и хора. Това е индикация, че LPAI не бива да се подценяват.

Инфлуенца А по птиците субтип H4 и H6 се разделят на европейско и северно-американско родословия. Много често се среща смесване на гените между двете родословия, особено ако гостоприемниците са диви водоплаващи. Доказано е, че вируси от субтип H4 и H6 могат да инфектират както домашните птици така и хората (Spackman et al., 2005).

H4N6 е по-често срещан субтип в Северна Америка от колкото в Европа. H4N6 е изолиран за първи път от зеленоглавки в Албърта, Канада през 1977г. (UNIPROT, Taxonomy).

Данни за инфлуенца А H6N5 датират от 1972г. - открит е при средиземноморски буревестник в Австралия. Този субтип, както и H4N2 при патици са изолирани за първи път в Хонк Конг през 1976г. В периода 2008-2011 г. са изолирани още 133 слабопатогенни инфлуенца А вируса в 64 ферми за патици мюлари от пет региона на България. Изолираните LPAI са от субтипове **H6, H4, H3, H1** и **H10,** като процентът на субтип H6 е изчислен на 41%. Между тези вируси са установени всички 9 NA субтипове, освен N4. Около 38% от изолираните вируси са със субтип N2. Около ¼ от изолатите са с неустановен NA субтип.

При филогенетичния анализ на H6 гена на 24 от изолатите са се оформили две български групи, едната от които еволюционно по-близка до секвенции на вируси, изолирани в Западна Европа. Един от вируси, изолиран в регион Стара Загора, не се групира с останалите, но е сестрински таксон с H6N2 вирус от зеленоглава патица, изолирана в Чехия през 2009 г. (NCBI GenBank). По отношение на HA гена няма явно еволюционно разделение, бележещо различни прародители, на вирусите, изолирани в регион Пловдив - Пазарджик от тези, изолирани в Стара Загора - Хасково.

При филогенетичния анализ на H4 гена на 8 секвенции от български вируси, 6 от изолирани в регион Хасково през 2008 и 2010 г., и 2 - изолирани през 2010 г. в регион Пловдив, се установява че пет

от вирусите от Хасково попадат в обща група, която в еволюционно отношение е на голяма дистанция от всички останали вируси във филогенетичното дърво, като най-близо групата стои до вируси, изолирани в Хонг Конг, Тайван и Монголия (NCBI GenBank). В рамките на тази група в еволюционно отношение има разлики между вирусите, изолирани през 2008 г. и тези, изолирани през 2010 г. Един от шестте изолата H4 от Хасковски регион (2008 г.) не попада в обща група с останалите вируси от този регион и с вирусите, изолирани в Пловдив. Той е близък във филогенетично отношение до H4 вируси от дъждосвирец от Швеция и зеленоглави патици от Холандия и Чехия, изолирани в периода 2005-2007 г. (NCBI GenBank). Двата вируса, изолирани в Пловдивски регион, са сестрински таксони, близки във филогенетично отношение до H4 вируси от Югоизточна Азия (NCBI GenBank). Българските вируси субтип H4 са с 89% идентичност с тези публикувани в NCBI.

Гененетичният анализ на N8 гена включва 10 български щама, изолирани през 2010 г.- седем от ферми от Пловдивски регион, две от Пазарджишки и една от Старозагорски. Всички изолати попадат в обща голяма група, но в отделни подгрупи с голяма дистанция във филогенетично отношение.

Филогенетичното дърво на N2 гена съдържа 30 секвенции на български вируси, които оформят общо 4 групи. Шест, изолирани от ферми в Хасковски регион попадат в обща група, но много отдалечени в еволюционно отношение от останалите български N2 вируси. Четири от 6-те изолата в тази група произхождат от една и съща ферма, изолирани в 2 поредни месеца което обяснява общото им групиране. Те попадат и в обща група по отношение на NP гена. Останалите 3 групи съдържат вируси от регионите Пловдив, Стара Загора и Хасково.

При анализа на NP гена се разграничават 5 големи разклонения (nodes), в които участват таксони, представляващи

секвенции на български изолати. В четири от тези разклонения освен български изолати се включват и такива, изолирани в Западна Европа и Азия. Едно от основните разклонения съдържа като таксони само български вируси от всички 4 региона на страната (Пловдив, Пазарджик, Стара Загора и Хасково). Това разклонение, както и всички останали български вируси, се намират на значителна дистанция в еволюционно отношение от вирусите от други държави. При филогенетичния анализ на М гена, се оформят разклонения, с характеристики на типично български вируси и други с изцяло „чужди— вируси. Оформени са две групи вируси –едната от изолирани в регионите Пловдив и Пазарджик, и друга, която в еволюционно отношение е на голяма дистанция, и включва както от изолираните в други държави вируси, така и от вирусите, изолирани в Стара Загора и Хасково.

При NS гена се наблюдава също разграничение между секвенциите на българските изолати от регионите Стара Загора и Хасково и на тези на изолирани в Пловдив и Пазарджик вируси. Групата изолати от Пловдив и Пазарджик са в по-близки родствени отношения с вируси от Холандия и Швеция от 2006 и 2003 г. (NCBI GenBank). NS генът на един от изолатите H4N6 от мюлар от регион Пловдив попадна в общ кластер с вируси, изолирани в Тува и Шанхай през периода 2009-2010 г. (NCBI GenBank), географски регион, от където идва и прародителят на изолирания от нас вирус H5N1 от мишелов през 2010 г. Това вероятно означава, че все пак по миграционните пътища от този регион на света до България има пренос на инфлуенца вируси с дивите птици.

При филогенетичният анализ на PB1 гена се оформят 7 големи разклонения, като български вируси има във всички групи, с изключение на една. По-голямата част от вирусите от мюлари, изолирани от региона на Пловдив и Пазарджик отново оформят отделна „българска група“, отдалечена еволюционно от всички останали български и чужди вируси.

При анализа на PB2 гена се установява, че изолираните вируси от мюлари от регионите Пловдив и Пазарджик носат различни във филогенетично отношение PB2 гени от тези на вирусите от регионите Стара Загора и Хасково. PB2 генът на H4N6

вируса от регион Пловдив, който е споменат по-горе при NS гена, е много отдалечен в еволюционно отношение от всички останали вируси, включително и от изолатите от Монголия 2009-2010 г. (NCBI GenBank). Това предполага различен произход на PB2 гена на H4N6 вируса в сравнение с всички 48 останали български изолати от мюлари.

Тълкуването на групирането на вирусите в отделни кластери въз основа на различните географски региони в които са изолирани и голямата дистанция помежду им може да се направи по два начина: Възможно е в отделните региони предшествениците на вирусите да са различни и пътищата на навлизането им да са съвсем отделни. Другият вариант е да има едно навлизане на вируси преди дълъгпериод от време, след което те са били пренесени на други места, като в различните локации вирусите са претърпяли паралелни, но съвсем различни мутации. Липсата на данни за инфлуенцата при мюларите от създаването на това птицевъдство в нашата страна до края на 2008 г. е причина да не може със сигурност да се определи кой вариант е довел до формирането на кластери с български изолати, във вида, в който ги установихме чрез филогенетичния анализ. По-честото групиране на вирусите от Пловдив с тези от Пазарджик, както и на тези от Хасково с Стара Загора, най-вероятно е резултат от пренос на вируси чрез движения на хора и птици в тези региони поради малките разстояния.

Филогенетичният анализ на всички гени на изолираните български LPAI вируси показва, че те най-вероятно са попаднали в българските стада мюлари от диви птици, но много отдавна (вероятно още в първите години от развитието на този вид животновъдство в България). Предпоставка за това е технологията на отглеждане на мюларите, която изисква през светлата част на деня птиците да са на открито. Вирусите са еволюирали съхранявали и развивали в тора, постелята, водата, които са служели като резервоар на инфекцията, предавайки се от една възрастова група на друга.

3.2. Силнопатогенни и слабопатогенни вируси субтип H5 и H7, изолорани в България

А. Слабопатогенни вируси субтип H5 и H7

През 2008г. е изолиран LPAI субтип H7N7 при зеленоглави патици, с. Хан Крум, обл. Монтана. При секвенирането на генома се установи, че съдържа мотив PEIPKGR*GLF на мястото на разцепването на хемаглутинина, което го определя като слабопатогенен вирус.

H7N7 е особено характерен за Италия и Швеция (Wallensten et al., 2007). За първи път H7N7 е изолиран от домашни кокошеви птици в Холандия през 1927г., а при зеленоглави патици през 1999г. в щата Минесота, САЩ.

Субтип H7N7 може да инфектира хора, птици, свине, тюлени и коне. ***Ето защо всяко изолиране на такъв вирус потенциално представлява заплаха особено ако се касае за HPAI.*** Има две родословия европейско и северно-американско. За вирусите от първото родословие е характерно свързване с рецептори с окончание SA*a*2,3Gal, докато тези от второто имат афинитет към SA*a*2,6Gal, характерен за епителните клетки на горния респираторен тракт при хората (Belser et al., 2008). Най-вероятно местният изолат субтип H7N7 принадлежи към европейските вируси.

През 2011 г. при патици мюлари от ферми в с. Шишманци, с. Пъдарско и гр. Раковски е изолиран LPAI субтип **H5N2**.

По същото време в регион Хасково е установен LPAI субтип **H5N8**, отново при патици мюлари.

Изолираните слабопатогенни щамове на Инфлуенца А вируси от патици мюлари не са предизвиквали никакви клинични симптоми. Докладваната смъртност е била в рамките на допустимия технологичен отпад (1-2%) при младите патици.

Известно е, че огнища на HPAI вирус могат да възникнат след огнище на LPAI. Пример за това е избухването на LPAI при пилета в Пенсилвания през 1983 г. Избухването започва през април 1983 г. с LPAI вирус, които предизвикват само ограничена смъртност. През октомври същата година вируса се трансформира

в HPAI, причинявайки повече от 80% смъртност. По същият начин избухването на HPAI H7N1 през декември 1999 г. в Италия е в следствие на LPAI H7N1 появил се през април същата година.

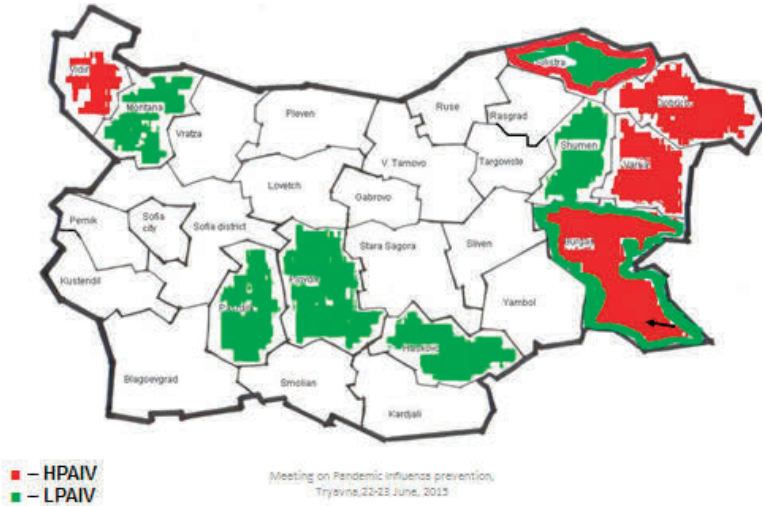
До скоро инфекциите с H5N2 и H5N8 бяха основно LPAI, но през 2014-2015 станахме свидетели на тежка пандемия в световен мащаб от HPAI причинена от същите тези субтипове.

Б. Високопатогенни вируси субтип H5

Птичите H5N1 вируси продължават да се разпространяват, и да заразяват животни и хора, както и да се развиват и мутират. Въпреки това, се смята че гените на идентифицирания през 1996 г. A/goose/Guangdong/1996 H5N1 присъстват във всички изолати. A/Goose/Guangdong/1/96 е изолат от гъска от първото огнище на HPAI H5N1 в провинция Гуангдонг, Китай, когато 40% от гъските във засегната ферма са умрели. Формирането на класификацията на H5, се използва като база именно този вирус. При създаването й през 2008 година, вирусите са групирани в 20 клейда "clades". До 2014г. са описани 24 клейда 0, 1, 2, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.3.1, 2.1.3.2, 2.2, 2.2.1, 2.2.1.1, 2.3.1, 2.3.2.1, 2.3.3, 2.3.4, 2.4, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, 2012) . От тях основно са циркулирали вируси от клейдве 1, 2.1.3, 2.2, 2.2.1, 2.3.2, 2.3.4 и 7. Има 13 клейда, обаче които от 2008г. не са се появявали до момента -0, 2.1.1, 2.1.2, 2.3.1, 2.3.3, 2.4, 2.6, 3, 4, 5, 6, 8, 9. Появилите се нови вируси през 2015 H5N8 в Източна Азия и Европа, H5N8 и H5N2 в Северна Америка, и H5N6 в Източна и Югоисточна Азия, налагат промяна в класификацията и почвата на нов клейд - **clade 2.3.4.4.**

В България през 2006 г. е изолиран за първи път **H5N1** щам на вируса на инфлуенца А по птиците. След направения секвентен анализ на H5 на четирите изолата от лебеди H5N1, се установи, че съдържат един и същ мотив, а именно PQGERRRKKR*GLF, т.е се касае за HPAI. Тогава на територията на Р. България вирусът бе изолиран от единични прелетни птици (4 броя лебеди и една зеленоглава патица) без да се допусне засягане на домашни или промишлено отглеждани птици на територията на страната.

Генетичните изследвания показаха, че се касае за генетичен подтип 2.2 и гено-група (клайд) 2.2.1. (Фиг. 7)



Фиг. 7. Изопиране на HPAI H5N1 (от 4 лебеда и една зеленоглава патица - Видин, Добрич,Силистра Варна и Бургас) и слабо патогенни Инфлуенца А вируси (LPAI) с различна антигенна характеристика на ХА –H4, H6, H7, H10)

При филогенетичният анализ се установява близко родство с H5N1 изолираните по време на епизоотията вируси от Европа, Средния Изток и Африка. Тези вируси принадлежат към генотип „Z" на високопатогенната инфлуенца субтип H5N1 или т.н. "Asian lineage HPAI A(H5N1)" (Азиатско родословие), **clade 2.2.** Той от своя страна се дели на 3 основни родови линии (Clade). Първата е образувана от вируси изолирани във Виетнам, Тайланд, Камбоджа, Лаос и Малайзия. Clade 2 включва изолати от Китай, Индонезия, Япония, Южна Корея, Середен Изток, Европа и Африка. Вирусите от тази родова линия са разделени на 3 подлиния (subclade). Subclade

1 включва изолати главно при хора от Индонезия. Subclade 2 е т.н. EMA (образуван от първите букви на англииските имена на Европа, среден Изток и Африка). Тази подлиния се характеризира с най – голямо разнообразие на вирусите, поради тази причина е разделена на още по-малки подгрупи. При хората се срещат 5 подлинии на Subclade 2: 1,2.1, 2.2,2.3 и 7. Subclade 3 включва изолати от Китай и Лаос. Към Clade 1' и 3 се отнасят вирусите изолирани от птици в Хонк Конг през периода 1996-2003. Вирусите от клоновете 1, 1' и 3 са свързани и с фаталните случаи при хора в Азия.

През пролетта на 2010 г. е изолиран за първи път в България HPAI H5N1 от различен клейд - 2.3.2.1c в обикновен мишелов (Buteo buteo). HA гена е близко родствен с A/great crested grebe/Qinghai/1/2009 и A/grebe/Tyva/3/2009 с припокриване съответно 100 и 98% и максимална идентичност 99% за двата вируса. От молекулярната характеристика на вируса се установява, че мястото на разцепване на хемаглутинина има струпване на основни аминокиселини - PQRERRRKRGLF, което е характерно за HPAI, както и делеция на позиция K329 (при H5 номериране) в същото място. Мястото, в което HA1 свързва рецепторите на гостоприемниковите клетки съдържа аминокиселинни остатъци Glu 186 (E), Gln 222 (Q) и Gly 224 (G), които предимно се свързват с α-2,3-NeuAcGal рецептори.

H5N1 вирусът, изолиран от мишелов, притежава характерен молекулярен маркер за висока патогенност при кокошеви птици, но няма мутации, които да обуславят свързването му с човешки тип рецептори в респираторния епител.

Филогенетичният анализ показа, че в еволюционно отношение HA на A/ Common buzzard/Bulgaria/ 38WB/ 2010 е най-близък до тези на H5N1 вируси, изолирани от пойни лебеди в Монголия през 2010 и 2009 г., както и до вирус, изолиран от гмурец през 2009 г. в граничещата с Монголия Руска Република Тува. Групата 2.3.2.1 вируси, в които е и българският вирус, са изолирани само от диви мигриращи водоплаващи и крайбрежни птици в периода 2009- 2010 г. Вероятно, именно поддържането на тази група вируси в популациите на дивите птици е в основата на широкото й географско разпространение в Азия, а именно в Китай,

Хонг Конг, Корея, Виетнам, Лао, Бангладеш, Непал, Монголия, Тува (WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, 2012).

При филогенетичния анализ на протеинът N1 на A/ Common buzzard/ Bulgaria/ 38WB/ 2010е установено, че попада в обща група с NA на останалите H5N1 2.3.2.1 вируси, но за разлика от HA той е по-близо във филогенетично отношение до вирусите, изолирани от пойни лебеди в Монголия през 2009 г., отколкото до тези от 2010г (NCBI GenBank). NA на българския вирус е отдалечена в еволюционно отношение дори и от най-близката до нея невраминидазна секвенция. По отношение на полимеразните гени (PB1, PB2, PA) българският вирус е близък във филогенетично отношение до едни и същи вируси от Монголия и Тува от 2009 и 2010 г. Същото е положението и при NP и NS гените. Най- общо казано, всички гени, с изключение на матриксния ген на A/Common buzzard/Bulgaria/38WB/2010 са близки във филогенетично отношение до 2.3.2.1 H5N1 вируси от пойни лебеди и гмурци, изолирани в Монголия и Тува. Резултатите от филогенетичния анализ на M-гена на A/Common buzzard/Bulgaria/38WB/2010 показавата, че той попада в голяма група с H5N1 вируси, принадлежащи към генетична група 2.3.4, изолирани от домашни птици в Китай. В най-близкородствени отношения M-генът на българския изолат е с вируси от пиле и патица от провинции Guangxi (2006) и вирус от патица от провинция Hunan (2005). Това показва, че M генът на A/ Common buzzard/ Bulgaria/ 38WB/ 2010 е придобит чрез реасортация и негов предшественик е вирусът от подгрупа 2.3.4. Това може да обясни наличието на аминокиселина валин (V)28 в M2 протеина, която е характерна за човешки изолати на инфлуенца A вируси (Shaw и съавт., 2002). Известно е, че след разпространението на субтип H5N1 през 2005 г., в Азия има доста хора, заразени с този вирус.

Близкородствените отношения на A/Common buzzard/ Bulgaria/38WB/2010 с вируси, изолирани от диви птици в Тува и Монголия през 2009 и 2010 г. (NCBI GenBank) поставят въпроса: Как вирусът е стигнал до България? По същото време в село Летея, област Тулча, Румъния (около 250 км североизточно от Варна) има регистрирано огнище на H5N1 при кокошки от 6 задни двора. Селото е разположено на малък остров в делтата на р. Дунав, където

домашните птици са в постоянен контакт с дивите водоплаващи. Следва и второ огнище при домашни кокошеви в с. Плауру от същата област, на 55 км източно от Летея. Изолираният вирусът е 99.9% сходен с този, A/Common buzzard/Bulgaria/38WB/2010 и 99.3% сходен с H5N1 2.3.2 вирус, изолиран малко преди това в Непал, Азия. Филогенетичното дърво на всички известни H5N1 инфлуенца вирусни изолати, публикувано във връзка с новата H5N1 класификация показва, че всички изолирани 2.3.2.1 H5N1 вируси от Монголия, Тува, Румъния, България и Непал попадат в общ кластер (WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, 2012). Българският вирус от мишелов и трите румънски изолата от пилета оформят самостоятелна група, която е близкородствена до изолати от пойни лебеди от Монголия от 2009 и 2010 г., както и гмурци от Тува от 2009 и 2010 г. Вирусите от Непал оформят самостоятелна подгрупа на този кластер и са по-близки във филогенетично 79 отношение до други изолати от водоплаващи птици от Монголия и Тива от 2009 и 2010 г. Начинът на разположение на таксоните в 2.3.2.1 кластера показва, че най-вероятно вирусите, изолирани в Румъния и България нямат пряка връзка с тези от Непал.

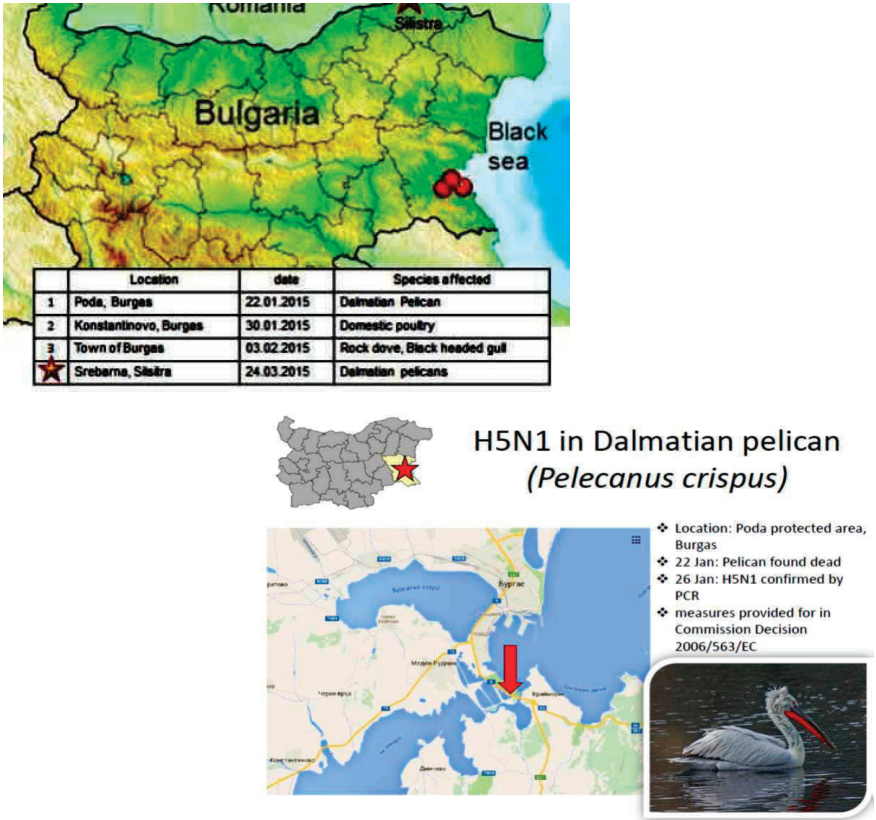
Известно е, че в този период на годината (март-април) през територията на България и Румъния по миграционното трасе Via Pontica се осъществява прелет на диви водоплаващи птици от юг на север. Установената висока патогенност на вируса за кокошеви птици обяснява възникването на огнищата в Румъния - чрез трансмисия от дивите птици на кокошките. Въпросът е как се е заразил мишеловът в България? Той е граблива птица от семейство Ястребови (Accipitridae) и в литературата има описани случаи на смъртоносна инфекция на грабливи птици с H5N1 инфлуенца вируси (Magnino и съавт., 2000; Manvell и съавт., 2000; Van Borm и съавт., 2005). Въпреки че не са водолюбиви птици, в ролята си на хищници и птици, които често се хранят с мърша, те са изложени на риск от заразяване с ВПИП чрез директен контакт и по алиментарен път, като нападат по-дребни видове, мъртви или болни птици. Обикновеният мишелов (Buteo buteo) е считан за вид, който не мигрира на дълги разстояния. При проучвания проведени в България в периода 1979 - 2005 г. (Костадинова и Граматиков, 2007)

е установено, че по Западночерноморския миграционен път Via Pontica има значителни по численост есенни и пролетни миграции на обикновени мишелови (до 42 100 птици) (Костадинова и Граматиков, 2007). Това е обстоятелство, което предполага, че тези птици са възможен преносител на патогени на дълги разстояния. Едната верочтност е обикновения мишелов, от който е изолиран A/ Common buzzard/ Bulgaria/ 38WB/ 2010, да се е хранил с инфектирана с вируса птица - болна или мъртва. Тази птица е възможно да е била водоплаваща, мигрираща птица, от ято, което е отседнало за почивка около някое от езерата по северното Българско Черноморие, а после е отлетяло в делтата на Дунав в Румъния, където други инфектирани със същия вирус птици са го предали на местни кокошки от задни дворове, с които са били в контакт. Другият възможен сценарий е мишеловът, който при промяна на времето и при търсене на храна извършва миграции на близки разстояния, да е мигрирал за кратко в Румъния, където е нападнал инфектирана водоплаваща птица или директно заразена вече кокошка, след което се е върнал в България, където много скоро след заразяването е намерен мъртъв (за това говори липсата на каквито и да е лезии във вътрешните органи, т.е. много бърза смърт). Сходството между българския и румънските изолати във филогенетично отношение помага при изясняването на картината относно разпространението на вируса в двете държави. По-трудно е обаче да се изгради точна и вярна представа относно пренасянето на вируса от Тува, Монголия и Непал до България и Румъния. Възможно е случаите в България и 81 Непал да са в резултат на различни пътища на разпространение на вируса от Тува и Монголия, а генетичното им сходство да е резултат от паралелно протичащи случайни мутации в генома на вирусите. Трудно е да се каже по кой точно миграционен път диви водоплаващи птици са се придвижили от Непал до нашата страна, тъй като такава директна миграция реално няма. От картата на миграционните трасета в света става ясно, че на много места отделните пътища се препокриват и там се събират птици, които гнездят и зимуват на различни места. Данни, получени от FAO и други организации, относно глобалната миграция на птиците и програмата за екология на ВПИП от 2005 до 2010 г., показват миграционните трасета на 24 вида птици в 11

държави от Азия и Африка. Тези трасета са очертани чрез сателитни предаватели, поставени у птиците, с които са били проследявани движенията им. Птици, на които предаватели са били поставени в Нигерия мигрират на север през Средиземно Море, нашето Черноморие, Румъния и отлитат в Украина и Западна Русия. Птици от Египет стигат на север до Сибир, а такива от Индия, Непал, Монголия, Казахстан и Шанхай в Китай, в общи линии се струпват в Индия и на север от нея. Най-вероятно точно от там е тръгнал H5N1 вирусът, изолиран от мишелова. След това е възможно по трасето Източна Африка- Западна Азия да е достигнал до Африка и от там с оглед на сезона, в който е изолиран (март-април), с диви гъски или патици, а защо не и с дъждосвирци, които мигрират на север през Средиземноморието и начето Черноморие да е бил пренесен до България и Румъния. Колко пъти вирусът се е трансферирал от една птица в друга и изобщо от един вид в друг не е ясно и ние няма как да разберем.

През януари 2015г. след като цяла Европа е „пламнала“ от огнища с H5N8, Америка с H5N2, а Близкият Изток с H5N1 clade 2.2.1.2, в България се изолира отново H5N1, clade 2.3.2.1.c. Този път гостоприемникът е кадроглав пеликан (Pelecanus crispus). Мястото на което е открита птицата е ЗМ Пода, област Бургас, с GPS координати: 42.449780; 27.464885. Шест дена по-късно, на 30.01.2015г. е докладвано първото огнище при домашни птици в България, в частен двор в Бургаска област. Умират всичките налични 22 кокошки. При аутопсията са наблюдавани характерни патоморфологични признаци за високопатогенната инфлуенца по птиците (точковидни кръвоизливи по вътрешните органи и от вътрешната страна на коремната кухина, тъмно сини менгуши и гребен). След няколко дена на 04.02.2015 се доказа високопатогенна инфлуенца и при две синантропни птици – речна чайка(Larus ridibundus) и скален гълъб(Columbia livia). Двете птици са били намерени в гр. Бургас (Фиг.8).

Изолираният вирус бе от щам H5N1 на HPAI и при генетичен анализ на хемаглутининовия му ген (H) в Референтната лаборатория на ЕС се установи, че той е от същия генетичен подтип – клейд 2.3.2.1.c, циркулиращ в момента в Югоизточна Азия, Южен Китай и Виетнам и Индия.



Фиг. 8. Епизоотични огнища на HPAI от щам H5N1 в България 2015 г.

На 25 март комптентните ветерианрни власти на Румъния съобщиха, че в района на защитените територии на резервата Тулча,на границата с окръг Констанца са установени 64 умрели пеликани от вида Далматински пеликан и от тях е изолиран HPAI H5N1 от същия генетичен клайд 2.2.3.1c.

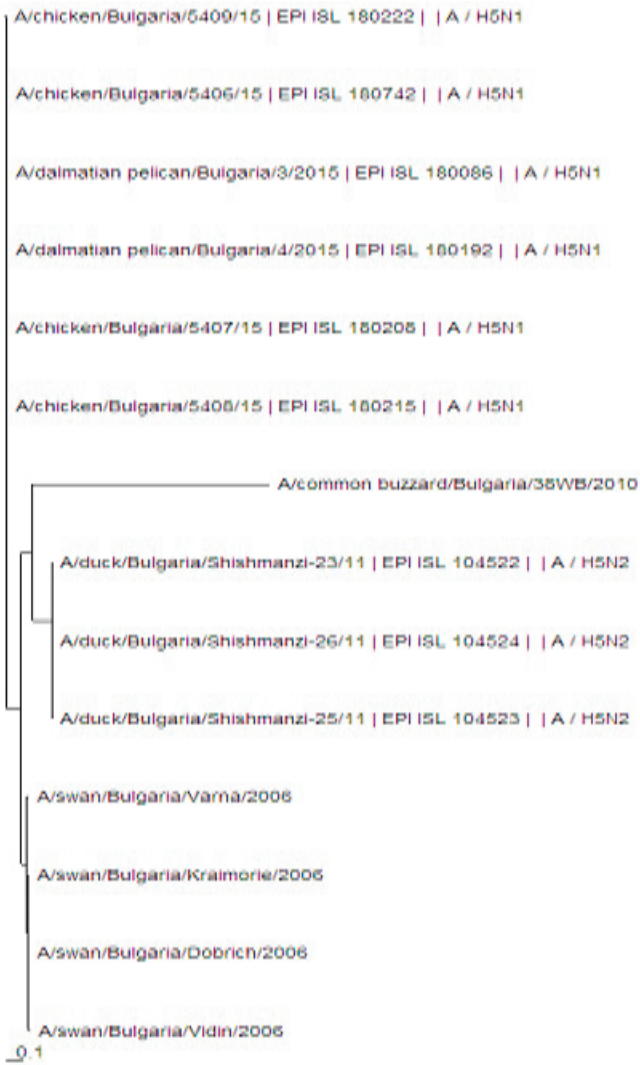
След едномесечно „затишие“ на 22.03.2015г. H5N1 отново напомня за себе си. В биосферен резерват Сребърна се наблюдава необичайна липса на движение на пеликаните на острова, който обитават. Това предизвиква спешна акция на служителите на

резервата. При нея се установени 21 мъртви пеликани, от общо 130 възрастни екземпляра. В резервата към този момент е имало 65 двойки кълдроглави пеликани. Труповете са били видимо кахектични, в недобро състояние, теглото им било едва 5 кг. при норма 9-9,5 кг.

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

В рамките на няколко седмици постепенно намалява интензитета на заболелите и умрелите птици и в България и в Румъния. Общо в България са умрели 29 пеликана.

При секвенирането на вирусите от езерото Пода и домашните кокошки в България, извършено в CRL, VLA Weybridge, UK, се установява следният мотив на мястото на разцепване на хемаглутинина PQRERRRKRGLF. Последвалият филогенетичен анализ го поставя в един клъстер с Виетнамските H5N1, изолирани през 2012г. и 2013г., принадлежащи към clade 2.3.2.1c (Фиг.9).



Фиг. 9. Филогенетично дърво на всички български изолати субтип H5.

Нуклеотидната секвенция на вирусите /dalmatian pelican/ Poda/Bulgaria/2015 и A/chicken/Bulgaria/2015 показват най-близка генетична близост с вируса от мишелова -A/common buzzard/Bulgaria/2010, което е логично.

Фиг.10. Филогенетично дърво на изолати субтип H5 клейд 2.3.2.1.

При сравняването на вирусите A/dalmatian pelican/Poda/Bulgaria/2015 и A/chicken/Bulgaria/2015 (H5N1) генетична близост е

99,9%, а с A/dalmatian pelican/Romania/12449/2015 - 99% A/environment/Huzhou/C291-7/2013 (H5) - 98.8%, A/Alberta/01/2014 (H5N1) - 98.6%, A/tiger/Jiangsu/01/2013 (H5N1) 98.3%. Изолатът от кокошки сравнен с същите вируси, показва леки различия.

Как и защо се появи този вирус? Защо именно пеликаните го донесоха? Този и още много въпроси остават неизяснени. Ето, защо трябва да започнем с видът пеликан и неговите местообитания и миграции.

Пеликаните са гнездещо-прелетен, преминаващ и отчасти зимуващ вид. В миналото гнездови колонии е имало по Дунавското и Черноморското крайбрежие и в Стралджанското блато. От средата на XX в. гнезди само в езерото Сребърна, в т.н. „Пеликанска локва“, разположена в северния тръстиков масив (средно 67 двойки). По време на миграцията и през зимата се среща по Черноморското крайбрежие и по-рядко във вътрешността на страната. Освен в Сребърна пеликани в Европа гнездят още само на 3 места - по Волга, делтата на Дунав и в Гърция. Общата численост в района на Черно море и Средиземноморието е 2300–3200 индивида. След гнездовия период част от птиците се задържат по поречието на река Дунав. През зимните месеци до 500 птици остават да зимуват в България – основно в Бургаските езера, района на язовир Овчарица и по-малко по Дунав, а в някои случаи и в други язовири в Южна България (яз. Студен кладенец) (НБОИ, 2012). По тази причина относително трудно се разграничават птиците, които само преминават през България по време на миграция, от тези които се задържат продължително в определени райони на страната. Може да се приеме, че между 600 и 1800 кълроглави пеликани прелитат по време на есенна миграция през България. Основната част от тях преминават през Северна България между Острово в Лудогорието и Добрич в Добруджа, най-интензивен е в района на Суха река. Отделни ята и птици летят и през централната и източна част на Добруджа, включително в близост до морския бряг. В Южна България кълроглавите пеликани прелитат основно в района на Бургас като най-интензивен е прелетът им в района на Ветрен и Атанасовско езеро. В централната и западна Дунавска равнина също са регистрирани мигриращи кълроглави пеликани, вероятно част от тези, придържащи се към поречието на

река Дунав. В Южна България фронтът на пролетната миграция на вида е концентриран в района на Бургас между Суходол и Ветрен, като най-интензивна миграция на кълроглави пеликани е отчетена при Ветрен. В Добруджа пролетна миграция на кълроглави пеликани е отчетена между Провадия и Пленимир, най-интензивна отново по протежение на Суха река. Кълроглавият пеликан по време на есенната миграция прелита през България от началото на август до последната седмица на октомври.

Пролетта миграцията на кълроглавия пеликан започва около средата на март и продължава приблизително до средата на май. Въпреки това, някои данни сочат и случаи на по-ранно придвижване на вида (през февруари и дори края на януари), към гнездовището в резерват Сребърна в години с по-меки зими (Ир. Матеева, П. Янков. 2013). В районите с влажни зони се наблюдава отклоняване от основната посока на движение на птиците.

На базата на тази информация можем да изградим една първична хипотеза, че пеликанът, който е открит пръв в Пода, е дошъл по-ранно, останал е на мястото за почивка и след това е трябвало да се насочи към гнездовището в резерват Сребърна. Вероятно той не е бил единствената болна и умряла птица. Някоя от тях е пренесла заразата до задният двор и е заразила кокошките.

По принцип основното направление на прелитащите пеликани над територията на България е север – юг или юг – север в зависимост от направлението на миграцията (есенна, пролетна) като предвижванията са основно от делтата на река Дунав към Босфора и Средиземно море и респективно обратно. Вероятно така е достигнал вирусът до Румъния.

Защо основно пеликаните бяха заразени? Трудно е да се даде точен отговор, но поне може да се предположи защо точно тези пеликани са умрели. При аутопсията им се установи силна кахексия, те тежаха около 5 кг, при норма до 9 кг. Отделно се установи силно опаразитяване с аскари. Това не е типично състояние за дивите птици. Предполага се, че поради липсата на достатъчно храна в водоемите те се хранят с кухненски отпадъци или друга нетипична храна за тях. По този начин са се заразили с паразити, и от там са станали по-чувствителни към инфекции.

Защо имаше заразени чайка и гълъб? Най-вероятно са консумирали храна (вътрешности) от заразени диви птици. Като доказателство за това е намереният остък от птичи кост в мускулестия стомах на чайката.

Остава въпросът, как вирусът е дошъл от Виетнам до Бургас? Произходът и истинският вектор на заразата при настоящето нахлуване не е установен. Пеликаните са късо мигриращи птици и по-скоро са жертви („victims“) или индикаторни (сентинелни) птици, отколкото вектори, донесли вируса от Азия!

Изводи и препоръки:

1.Установяването на HPAI H5N1 през 2015 г., принадлежащ към генетичен клейд 2.3.2.1, циркулиращ в Югоизточна Азия за трети път след 2006г. в Европа и Африка показва, че т***ози вирус все още притежава потенциал за транс-континентално разпространение и способност да предизвиква не само епизоотични взривове, но и панзоотии.*** Фактът, че от него има инфектирани хора в Азия, той представлява особено предизвикателство за здравните власти по отношение на възникване и зараждане на нов кандидат пандемичен щам на Инфлуенца А вируса.

2.**За първи път в България през 2015г.** се установява появата на инфекция от Високопатогенния щам на Инфлуенца А вирус H5N1 при **домашни птици от кокошия вид** (Galus Galus) във ферма от т.н. „заден двор“.

3.При появата си през 2006 и 2010г. HPAI от щам H5N1 засегна само диви прелетни птици (лебеди и гъска) и една синатропна птица (обикновен мишелов), без да бъдат засегнати домашни птици.

4.Произходът и истинският вектор на заразата при настоящето нахлуване на HPAI H5N1 в България през 2015г. не е установен. Пеликаните са късо мигриращи птици и по-скоро са жертви („victims“), отколкото вектори, донесли вируса от Азия.

5.До 2015 г. HPAI H5N1 вируси, принадлежащи само към генетични клейдове 2.2 и 2.3.2.1 и циркулиращи в Югоизточна Азия са навлизали в България от Евразия и Азия по миграционните пътища Via Pontica и Via Aristoteles през 2006 и 2010г. Директният или индиректен контакт с инфектирани с HPAI от щам H5N1 диви прелетни и потвържденията им чрез изолирането на тези вируси в Азия, Казахстан, Русия (АР Тува-Алтай, Сибир, Астрахан) и Турция по миграционните пътища между Азия и Европа през 2015г., насочва към възможността за трансконтинентален пренос на заразата чрез Евроазиатските миграционни пътища (от Югоизточна Азия към Европа).

6. Не е известно обаче как феноменът на трансконтинентална трансмисия ще повлияе върху тяхното по-нататъшно трайно поддържане в популациите от чувствителни птици и възможностите им за устойчива екологична циркулация и активност, в определени нови региони на Света (екологични ниши), по подобие на HPAI щам H5N1 от Clade 2.2., установил се в Египет и Северна Африка след 2006 г.

7.Геномът на HPAI H5N8, изолиран в Европа показва, че този щам е със свойства на предимно птичи вирус без специфично повишен афинитет към човека. Тясната генетична хомоложност между вирусните гени на щамовете H5N8, установени в Англия, Холандия и Германия показват, че те съвместяват един общ предшественик на HPAI H5N8, изолиран от дива патица през 2014 г. в Япония и циркулиращ понастоящем в няколко страни на Далечния Изток (Китай, Япония, Корея).

8.Способността на циркулиращите в момента реасортантни на H5N8 вирус да се реплицират успешно в дихателния и чревния тракт, без да убиват заразените патици им позволява да циркулират по-ускорено в рамките на популацията и увеличава възможността им за предаване между птицефермите.

9.Огнищата на HPAI (H5N8 и H5N2) в Северна Америка и Канада през 2015г., тяхното пространствено разпределение и времево проявление насочват за най-вероятни източници на заразата дивите мигриращи водоплаващи и водолюбиви птици чрез прекръстосване на Азиатските и Тихоокеанските миграционни пътища, насочващо към възможността за трансконтинентален пренос на заразата от Азия.

10.Появата за първи път на HPAI H5N1 в САЩ през 2015г. като резултат на феномените генетична еволюция и реасортация от местния LPAI H5N1 още веднъж подчертава изключителното значение и необходимостта да не се подценява изолацията на слабопатогенните AIV и да се отчита тяхната роля като „градивен“ материал при появата на нови епидемични щамове с високопатогенна

антигенна характеристика.

11.Препоръчва се извършването на пълен геномен секвентен анализ на H5 вирусите от всяко ново огнище на HPAI, за може да се проследяват еволюционните промени на HA, евентуалният произход и пътищата за проникване и разпространение на вирусите на дадена територия, както и да се прави оценка на заплахата от тези мутации за здравеопазването на животните и хората и за появата на т.н. „пандемични“ щамове.

12.Бързото географско разпространение на високопатогенната инфлуенца А по птиците и постоянно изменящата се епизоотична обстановка в региона на Балканите, Европа и Света изискват необходимост от постоянна актуализация на Националната програма за надзор на AIV, своевременно информиране на компетентните органи и постоянни мерки за биосигурност на фермите и производствените единици в сектора птицевъдство в България.

13. Установяването на HPAI вируси с хемаглутинин H5 при диви птици сравнително трудно. Инфекцията с тях се характеризира с къс виремичен период и не всякога с ясно изразена клинична симптоматика, ето защо за да се установят вирусоносители следва да се вземат проби от по-голямо количество диви птици (активен надзор!).

14.Установяването произходът на дивите прелетни птици, от които са изолирани щамове HPAI следва да бъде основна задача на програмите за активен вирусологичен надзор, изпълнявани от Компетентния орган, съвместно с еколози и природоащитници. Националната Референтна лаборатория по Инфлуенца А по птиците следва бързо да се даде отговор на въпроса за произхода на вирусите на основата на секвентен анализ на хемаглутининовите гени (HA) или след извършване на пълен секвентен геномен анализ на изолатите.

Литературни източници

1. Атанаска Маринова Петкова. 2012. Дисертация: Проучвания върху екологичната циркулация и молекулярната еппизоотология на инфлуенца А вирусите по домашните и дивите водоплаващи птици в България.
2. Габриела Върбанова Гужгулова. 2010. Дисертация: Етиологични и молекулярно епизоотични проучвания на вируси на инфлуенца А по домашни и диви птици, изолирани в България.
3. проф. Г. Георгиев и проф. Б. Ликов - ЦОР при БАБХ. Оценка на риска от разпространение на Инфлуенца А вируса от Високо патогенния щам H5N1 в България, след установяването му в Бургаска област на 22.01.2015. rhttp://www.babh.government.bg/userfiles/files/COR/2015/February/15-048/0147-0187.pdf
4. Ирина Матеева, Петър Янков. 2013. Характер на миграцията на 42 вида птици от българската орнитофауна според нивото на съвременните познания. http://natura2000.moew.government.bg/PublicDownloads/Auto/OtherDoc/276296/276296_Birds_120.pdf
5. Adams S, Sandrock C. Avian influenza: update. Med Princ Pract. 2010;19(6):421-32.
6. CDC, 2013. http://www.cdc.gov/
7. Chen Y, Mao HY, Li Z, Xu CP, Gao J, Feng Y, Wang XY, Yan JY, Zhang YJ, Lu YY. 2013.
8. Belser JA, Blixt O, Chen LM, Pappas C, Maines TR, Van Hoeven N, Donis R, Busch J, McBride R, Paulson JC, Katz JM, Tumpey TM. 2008. Contemporary North American influenza H7 viruses possess human receptor specificity: Implications for virus transmissibility. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(21):7558-63.
9. FAO, http://www.fao.org/home/en/
10. Genomic sequences of human infection of avian-origin influenza A(H7N9)virus in Zhejiang province. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 34(6):604-8.
11. Gu H, Zhang W, Xu H, Li P, Wu L, Guo P, Hao Y, Lu J, Zhang D. 2015. Predicating risk area of human infection with avian influenza A (H7N9) virus by using early warning model in China. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.36(5):470-5.
12. EID Weekly Updates, 2004. http://www.paho.org/hq/
13. Gubareva LV, Robinson MJ, Bethell RC, Webster RG. 1997. Catalytic and framework mutations in the neuraminidase active site of influenza viruses

that are resistant to 4-guanidino-Neu5Ac2en. J Virol. 71(5):3385-90.
14. Faix DJ, Hawksworth AW, Myers CA, Hansen CJ, Ortiguerra RG, Halpin R, Wentworth D, Pacha LA, Schwartz EG, Garcia SM, Eick-Cost AA, Clagett CD, Khurana S, Golding H, Blair PJ. 2012. Decreased serologic response in vaccinated military recruits during 2011 corresponds to genetic drift in concurrent circulating pandemic A/H1N1 viruses. PLoS One. 7(4):e34581.
15. Hu M, Li X, Ni X, Wu J, Gao R, Xia W, Wang D, He F, Chen S, Liu Y, Guo S, Li H, Shu Y, Bethel JW, Liu M, Moore JB, Chen H. Coexistence of Avian Influenza Virus H10 and H9 Subtypes among Chickens in Live Poultry Markets during an Outbreak of Human Infection with Novel H10N8 Virus in Nanchang, China.
16. Hyun-Mi Kang, Eun-Kyoung Lee, Byung-Min Song, Jipseol Jeong, Jun-Gu Choi, Joojin Jeong, Oun-Kyong Moon, Hachung Yoon, Youngmi Cho, Young-Myong Kang, Hee-Soo Lee, and Youn-Jeong Lee. Novel Reassortant Influenza A(H5N8) Viruses among Inoculated Domestic and Wild Ducks, South Korea, 2014. 2015. Emerging Infectious diseases. Volume 21, Number 2.
17. Ilaria Capua and Dennis J. Alexander. 2004. Avian influenza: recent developments. Avian Pathology. 33(4), 393-404
18. Karunakaran D, Hinshaw V, Poss P, Newman J, Halvorson D. 1983. Influenza A outbreaks in Minnesota turkeys due to subtype H10N7 and possible transmission by waterfowl. Avian Dis. 27(2):357-66.
19. Keawcharoen J., D. van Riel, G. van Amerongen, T. Bestebroer, W. E. Beyer, R. van Lavieren, A. D.M.E. Osterhaus, R. A.M. Fouchier, and T. Kuiken. Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). Emerg Infect Dis. 2008 April; 14(4): 600–607.
20. Kostadinova, I., M. Gramatikov (eds.) Important bird areas in Bulgaria and Natura 2000. Bulgarian Society for the Protection of Birds, Conservation Series, Book 11. Sofia, BSPB, p.13, p. 532. 2007.
21. Lamb RA, Takeda M. 2001. Death by influenza virus protein.Nat Med. 7(12):1286-8.
22. Li Y, Du L, Qiu H, Zhao G, Wang L, Zhou Y, Jiang S, Gao J. 2013. A recombinant protein containing highly conserved hemagglutinin residues 81-122 of influenza H5N1 induces strong humoral and mucosal immune responses. Biosci Trends. 7(3):129-37.
23. Maohong Hu, Xiaodan Li, Xiansheng Ni, Jingwen Wu , Rongbao Gao, Wen Xia, Dayan Wang, Fenglan He, Shengen Chen, Yangqing Liu, Shuangli Guo, Hui Li, Yuelong Shu, Jeffrey W. Bethel, Mingbin Liu, Justin B. Moore, and Haiying Chen. 2014. Coexistence of avian influenza virus H10 and H9 subtypes among chickens in live poultry markets during an outbreak of human

infection with Novel H10N8 virus in Nanchang, China. Japanese Journal of Infectious Diseases. 1-19.
24. Magnino S, Fabbi M, Moreno A, Sala G, Lavazza A, Ghelfi E, Gandolfi L, Pirovano G, Gasperi E. 2000. Avian influenza virus (H7 serotype) in a saker falcon in Italy. Vet Rec. 146(25):740.
25. Manvell RJ, McKinney P, Wernery U, Frost K. 2000. Isolation of a highly pathogenic influenza A virus of subtype H7N3 from a peregrine falcon (Falco peregrinus). Avian Pathol. 29(6):635-7.
26. McKimm-Breschkin JL, Barrett S, Pudjiatmoko, Azhar M, Wong FY, Selleck P, Mohr PG, McGrane J, Kim M. 2013. Neuraminidase mutations further reduce oseltamivir susceptibility of Indonesian Clade 2.1 highly pathogenic Avian Influenza A(H5N1) viruses. PLoS One. 11;8(6):e66105
27. NCBI GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov
28. OIE, 2015. http://www.oie.int/
29. Spackman E, Stallknecht DE, Slemons RD, Winker K, Suarez DL, Scott M, Swayne DE. 2005. Phylogenetic analyses of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation. Virus Res. 114(1-2):89-100.
30. Serena Beato M, Terregino C, Cattoli G, Capua I. 2006. Isolation and characterization of an H10N7 avian influenza virus from poultry carcasses smuggled from China into Italy. Avian Pathol. 35(5):400-3.
31. Scientific report of EFSA (European Food Safety Authority), EFSA Journal 2014;12(12):
http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3941.pdf
32. Shi J, Xie J, He Z, Hu Y, He Y, Huang Q, Leng B, He W, Sheng Y, Li F, Song Y, Bai C, Gu Y, Jie Z. 2013. A detailed epidemiological and clinical description of 6 human cases of avian-origin influenza A (H7N9) virus infection in Shanghai. PLoS One. 8(10):e77651.
33. Shope RE. 1939. Serological studies of swine influenza viruses. J Exp Med. 69(6):847-56
34. Suxiang Tong, Xueyong Zhu, Yan Li, Mang Shi, Jing Zhang, Melissa Bourgeois, Hua Yang, Xianfeng Chen,Sergio Recuenco, Jorge Gomez, Li-Mei Chen, Adam Johnson, Ying Tao,1 Cyrille Dreyfus, Wenli Yu, Ryan McBride, Paul J. Carney, Amy T. Gilbert, Jessie Chang, Zhu Guo, Charles T. Davis, James C. Paulson, James Stevens, Charles E. Rupprecht, Edward C. Holmes, Ian A. Wilson, and Ruben O. Donis. 2013. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. PLoS Pathog. 9(10): e1003657.
35. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature. 437(7060):889-93.

36. Tang Y, Wu P, Peng D, Wang X, Wan H, Zhang P. 2009. Characterization of duck H5N1 influenza viruses with differing pathogenicity in mallard (Anas platyrhynchos) ducks. Avian Pathol. 38:457–67.
37. UNIPROT, Taxonomy. http://www.uniprot.org/taxonomy/11320
38. Van Borm S, Thomas I, Hanquet G, Lambrecht B, Boschmans M, Dupont G, Decaestecker M, Snacken R, van den Berg T. 2005. Highly pathogenic H5N1 influenza virus in smuggled Thai eagles, Belgium. Emerg Infect Dis. 11(5):702-5.
39. Wallensten A, Munster VJ, Latorre-Margalef N, Brytting M, Elmberg J, Fouchier RA, Fransson T, Haemig PD, Karlsson M, Lundkvist A, Osterhaus AD, Stervander M, Waldenström J, Björn O. Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in Northern Europe Emerg Infect Dis. 2007 Mar;13(3):404-11.
40. WHO, http://www.who.int/en/
41. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/h5_nomenclature_clade2344/en/
42. Yang S, Chen G, Sun J, Li F, Hua HC. 2015. Sequence and phylogenetic analyses of five low pathogenic avian influenza H5N2 viruses isolated in China. Acta Virol. 59(2):140-7.
43. Zarkov I, Bochev I, Manvell R, Shell W. 2006. The first isolation of Avian Influenza virus in Bulgaria. Jornal of Veterinary Record.158; 3; 106-107.

EFSA ФОКАЛЕН ЦЕНТЪР
БЪЛГАРИЯ

Български фокален център,
Център за оценка на риска
EFSAfocalpoint@nvms.government.bg
http://focalpointbg.com

Дизайн и предпечат: В.Евтимова, V_Evtimova@bfsa.bg