



Генотиповото разнообразие, пространственото разпределение и генетичната структура на вирусите на Инфлуенца А при птиците в България за периода 2023 – 2025 г.



Вирусите на Инфлуенца А представляват едни от най-значимите патогени с ветеринарномедицинско и обществено здравно значение, поради тяхната висока изменчивост, широк спектър от гостоприемници и способност за бързо географско разпространение. Те циркулират естествено сред дивите водолюбивы птици, които се считат за основен резервоар, като периодично се предават към домашни птици, причинявайки значими икономически загуби и риск за общественото здраве (Webster et al., 1992; WHO, 2023).



Фигура 1. Огнища на Инфлуенца А по птиците в България (2023 – 2026)

През последните години се наблюдава увеличаване на честотата и мащаба на огнищата на високопатогенна птича инфлуенца (HPAI) в Европа, включително и в България, което се свързва с фактори като миграционните маршрути на птиците, климатичните промени и интензификацията на птицевъдството (EFSA, 2024). Генетичната изменчивост на вируса,

обусловена от процеси като антигенен дрифт и реасортация, води до появата на нови генотипове с различна патогенност и епидемиологични характеристики (Lycett et al., 2019).

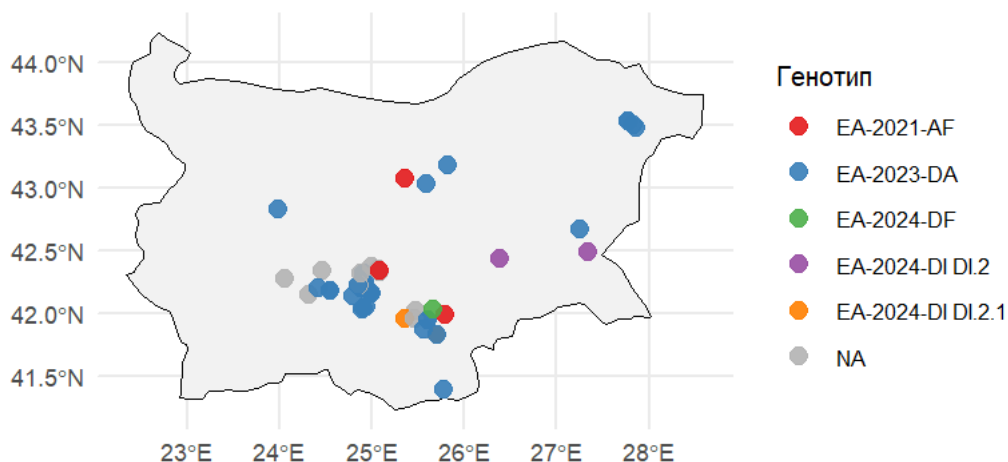
В този контекст, анализът на генетичната принадлежност на вирусите на Инфлуенца А има ключово значение за разбирането на механизмите на тяхното разпространение и еволюция. Комбинирането на молекулярно-генетични данни с пространствени и статистически методи позволява идентифициране на епидемиологични връзки между огнищата, откриване на „горещи точки“ и прогнозиране на бъдещи рискове (Diggle et al., 2013).

Настоящото изследване има за цел да анализира генотиповото разнообразие, пространственото разпределение и генетичната структура на вирусите на Инфлуенца А при птиците в България за периода 2023 – 2025 г., като използва съвременни методи за пространствен анализ и визуализация. Чрез този подход се цели да се допринесе за по-доброто разбиране на епидемиологията на заболяването и подпомагане на стратегиите за контрол и превенция. Използвайки пространствени и генетични данни, бяха извършени следните анализи:

1. Генотипово разнообразие

През периода 2023 – 2025 г. в България се наблюдава значително генотипово разнообразие на вирусите на Инфлуенца А както при диви, така и при домашни птици. Идентифицирани са няколко доминиращи генотипа, сред които EA-2023-DA и EA-2024-DI, както и по-рядко срещани варианти като EA-2021-AF и EA-2024-DF. Генотипът EA-2024-DF представлява реасортантен вариант на високопатогенния вирус H5N1 (clade 2.3.4.4b), възникнал в Европа през 2024 г. Този генотип е резултат от генетична реасортация между EA-2024-DA и EA-2024-AF, като запазва седем от осемте генни сегмента идентични с EA-2024-DA, докато сегментът NP (нуклеопротеин) произхожда от EA-2024-AF. NP сегментът е ключов за репликацията на вируса и играе важна роля в адаптацията към различни гостоприемници и в еволюционната динамика на вируса. Наличието на реасортантен генотип като EA-2024-DF подчертава високата генетична пластичност на H5N1 и необходимостта от непрекъснато геномно наблюдение на циркулиращите вируси при диви и домашни птици.

Географско разпределение на генотиповете на Инфлуенца А вируса по птиците в България (2023–2025)



Фигура 2. Географско разпределение на генотиповете на вируса на Инфлуенца А на територията на България

Таблица 1. Най-разпространените генотипове на Инфлуенца А по птиците в Европа за периода 2023 - 2025 г.

Генотип	Произход на сегментите	Особености	Географско разпространение	Забележки
EA-2023-DA	Всички сегменти стандартни EA*	Доминиращ в домашни птици	България, Чехия	Не е открит при диви птици; локална циркулация
EA-2024-DI	Всички сегменти EA-2024-DA	Доминиращ генотип 2025–2026	Европа (25 държави), включително България	Подгенотипи: DI.2, DI.2.1; масова циркулация
EA-2024-DI.2.1	Всички сегменти като DI, малки мутации	Най-разпространен подгенотип	Европа: Исландия–Финландия на север, Португалия–България на юг, включително Грузия	Свързан с масови смъртни случаи при големи водоплаващи птици и жерави
EA-2024-DF	7 сегмента от EA-2024-DA, NP от EA-2024-AF	Реасортантен вариант	България и други части на Европа	NP сегментът е ключов за адаптацията и репликацията
EA-2024-DT	Всички сегменти EA	Морски птици	Испания, Португалия	Продължава циркулацията сред Laridae
EA-2022-BB	Всички сегменти EA	Морски птици	Белгия, Норвегия, Великобритания	Локална циркулация в морски екосистеми
EA-2021-AF	Всички сегменти EA	По-рядко срещан	Европа	Циркулирал в близкото минало, по-рядко срещан
EA-2021-I	Всички сегменти EA	По-рядко срещан	Европа	Остатъчен от предишни епидемични вълни

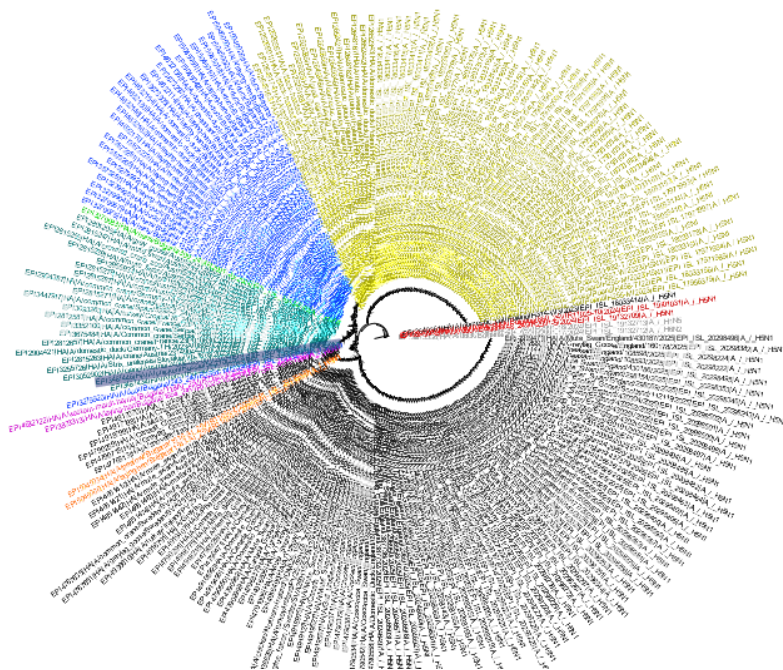
*EA показва географския и еволюционен произход на вируса – Евразия

Друг важен генотип EA-2024-DI, се откроява като доминиращ в Европа през 2025 – 2026 г., като повече от 90% от секвенираните вируси принадлежат към подгенотип EA-2024-DI.2.1. Този генотип е разпространен както при диви птици (предимно *Anseriformes*), така и при домашни птици в 25 европейски държави, включително България, достигайки северно до Исландия и Финландия и южно до Португалия и Република Грузия. EA-2024-DI.2.1 е свързан с масови смъртни случаи при видове като голямата белочела гъска (*Anser albifrons*) и сив жерав (*Grus grus*), което предполага, че един вирусен внос в популацията на тези видове е последван от ефективна вътре видова и междупопулационна трансмисия. В България имаше две прониквания на този субтип през есента на 2024 г. и пролетта на 2025 г., както беше

отбелязано в предишния доклад. През ноември вирусът отново се появи в област Хасково, вече като подгенотип EA-2024-DI.2.1., във ферма за кокошки носачки и в стопанско с пауни отглеждани в плен (Фигури 2 и 3).

Други генотипове, като EA-2024-DI.2, EA-2024-DT, EA-2022-BB, EA-2023-DA и EA-2021-I, се срещат по-рядко и в ограничени географски райони. Например, EA-2024-DI.2 е открит в западна Европа (Великобритания, Испания, Португалия), докато EA-2024-DT и EA-2022-BB продължават да циркулират сред *Laridae* и други морски птици в отделни региони. Генотипът EA-2023-DA се наблюдава изключително при домашни птици в България и Чехия и не е откриван при диви птици в Европа през 2024 – 2026 г., като отделните вирусни проби формират отделни клъстери в филогенетичните дървета, което предполага продължаваща локална циркулация в специфични екологични или домашни ниши (WHO, 2023; EFSA, 2026).

Подобна генетична вариабилност е характерна за вирусите на Инфлуенца А поради честите процеси на генетична реасортация и мутация (Webster et al., 1992; Lycett et al., 2019). Пространствената визуализация показва ясно диференцирани зони на разпространение, което позволява да се проследят епидемиологични връзки между отделни огнища и подпомага стратегиите за контрол и превенция.

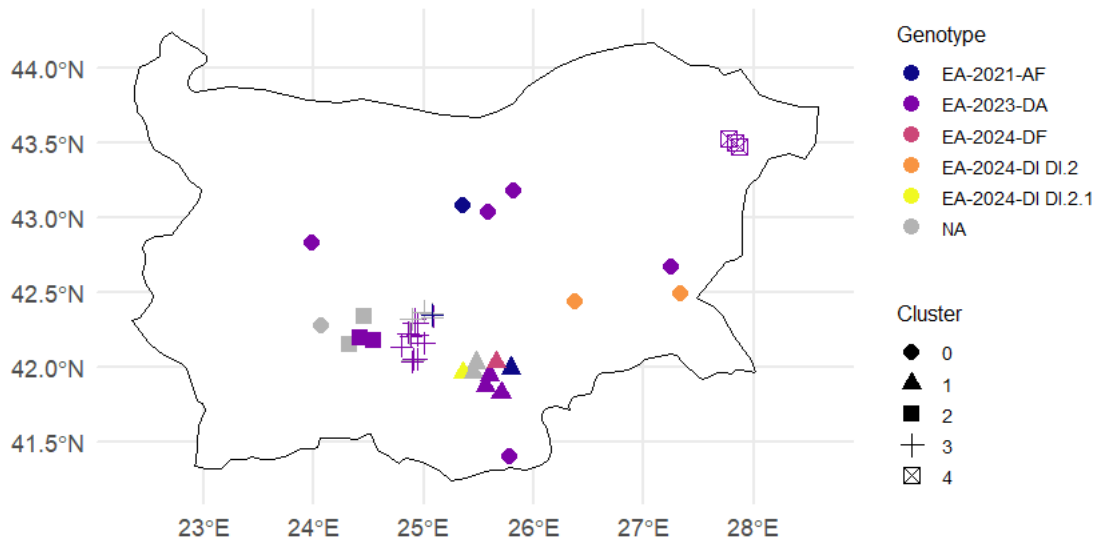


Фигура 3. Филогенетично дърво на изолатите от България 2023 - 2025 г., като в синьо са отбелязани субтип EA-2023-DA, в червено - EA-2021-AF, в зелено - EA-2024-DF, в оранжево - EA-2024-DI.2.1, в лилаво - EA-2024-DI.2, в светло сиво – два LPAI, в тъмно зелено са диви птици в Европа субтип EA-2024-DA, в жълто-зелено са изолати от Полша (птици и бозайници) субтип EA-2023-DA, в черно са EA-2024-DI.2.1.

2. Пространствено разпределение и огнища

Чрез прилагане на DBSCAN клъстеризация са идентифицирани области с висока концентрация на случаи („горещи точки“), което съответства на известни епидемиологични модели на разпространение при високопатогенни щамове (Ester et al., 1996).

Разпределение на НРАИ генотипи и клъстери в България

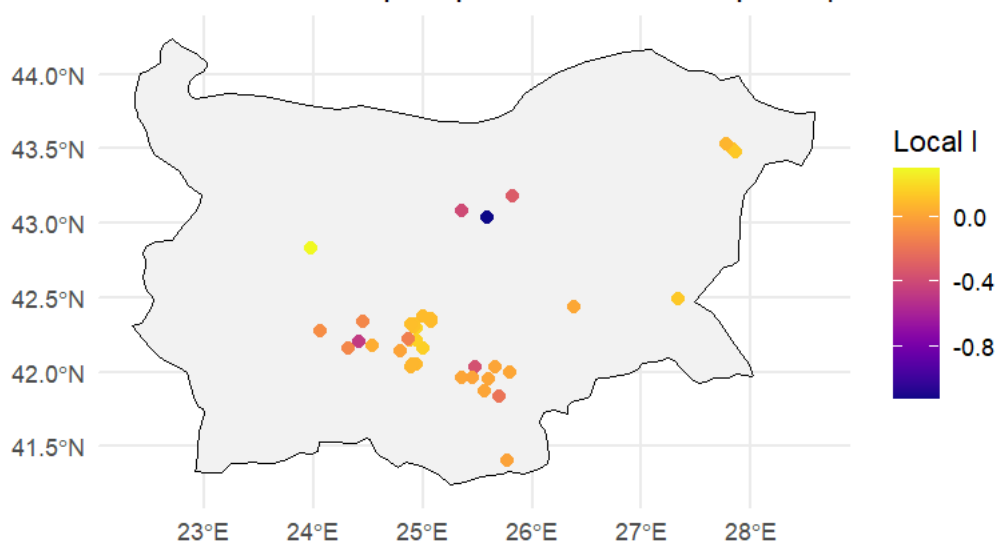


Фигура 3. DBSCAN клъстеризация

Допълнително, статистическите тестове като локалния Moran's I показват, че наличието на заразени птици в едно място увеличава вероятността да има заразени и в околните места, което означава клъстерно (групово) разпространение, а не случайно разпръскване (Anselin, 1995).

В България „горещите точки“ съвпадат основно с райони с висока концентрация на домашни птици и в близост до водни басейни, важни за миграционните маршрути на дивите птици. Това е в съответствие с наблюденията при огнища на птичи грип в Европа, където географската близост и миграционните маршрути играят ключова роля (EFSA, 2024).

Local Moran's I – пространствена автокорелация на огнища

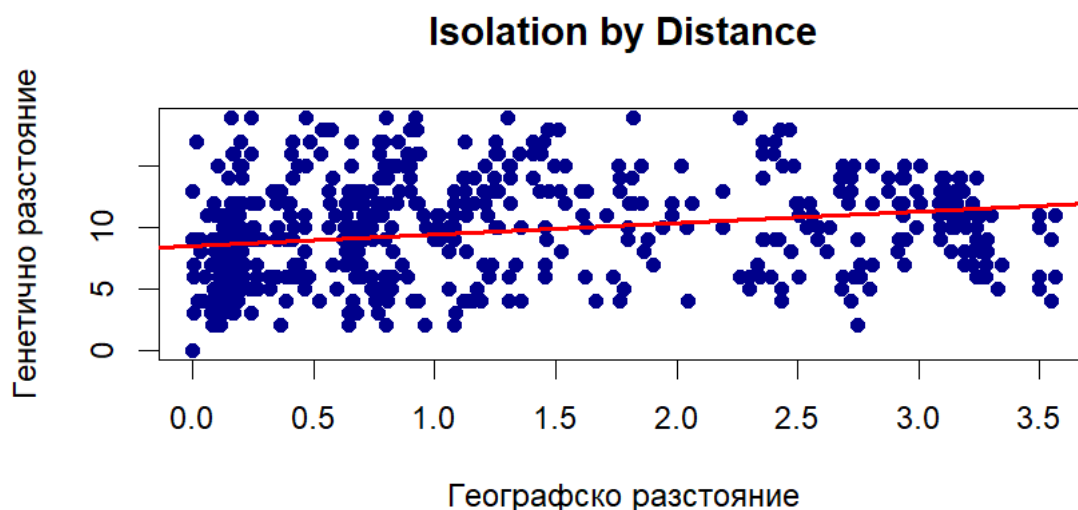


Фигура 4. Local Moran's I (индикатор за локална пространствена автокорелация) – пространствена автокорелация на огнища в България

На картата всяка точка представлява едно огнище, а цветът ѝ отразява това колко силно то е част от локален клъстер. Тъмносиньо или лилаво – показват отрицателна пространствена автокорелация. Това означава, че огнищата са „отделени“ и не са част от локален клъстер – те се намират сред съседства с малко случаи. Жълто и червено – показват положителна автокорелация, тоест огнищата са в „горещи точки“. Това означава, че в района около дадена точка има също много случаи и се формира локален клъстер от огнища, както е в случая с огнищата в България.

3. Isolation by distance (IBD)

Анализът на зависимостта между генетичното и географското разстояние показва умерена положителна корелация ($r \approx 0.22$). Това предполага, че пространствено близките огнища имат по-висока вероятност да бъдат генетично сходни, което подкрепя концепцията за „isolation by distance“ (Wright, 1943). „Isolation by Distance“ (Изоляция по разстояние), е класически анализ в епидемиологията и популационната генетика, който показва връзката между географското разстояние и генетичното разстояние между изолатите. Подобни резултати са докладвани и при други изследвания на разпространението на Инфлуенца А, където локалната трансмисия допринася за генетичната структура на популациите на вируса (Lam et al., 2015).

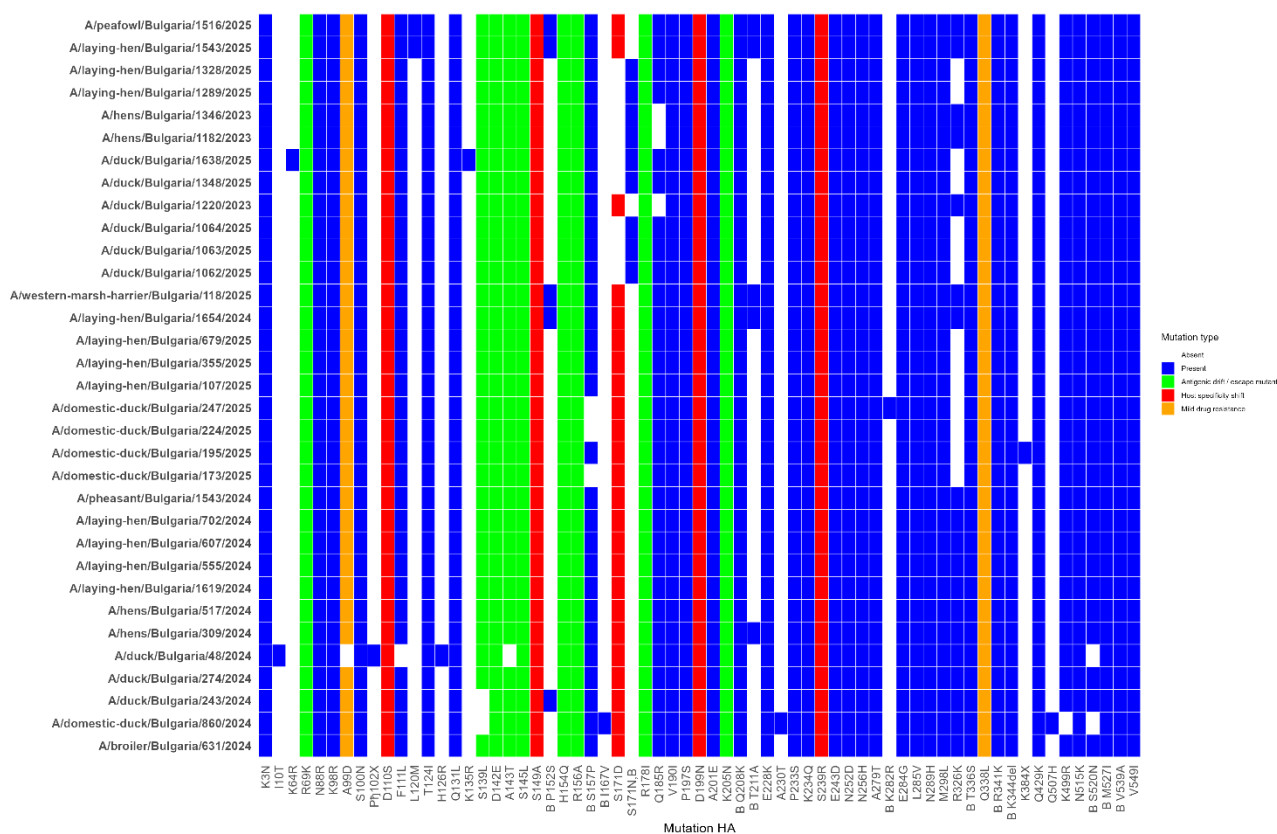


Фигура 4. Изоляция по разстояние, където X-оста е географско разстояние – изчислено от координатите на огнищата (coords_phylo) чрез Евклидово разстояние; Y-оста е генетично разстояние – изчислено като cophenetic distance от филогенетичното дърво (това представлява „колко различни“ са два щама генетично); точки - всяка точка представлява двойка проби – комбинация от две огнища, за които имаме географско и генетично разстояние; червена линия: линейна регресия (lm) – показва тенденцията: дали генетичните различия се увеличават с географската дистанция.

Видно е, че генетичното разстояние леко се увеличава с географската дистанция, но точките са доста разпръснати и регресионната линия има само лек наклон нагоре. Това показва, че огнищата, които са по-близо едно до друго географски, не са значително по-сходни генетично от тези на по-голямо разстояние. С други думи, ефектът на изолация по разстояние не е силно изразен, което предполага, че други фактори, като отделни единични прониквания на вируса чрез диви птици или човешки дейности, оказват по-голямо влияние върху генетичните различия между огнищата.

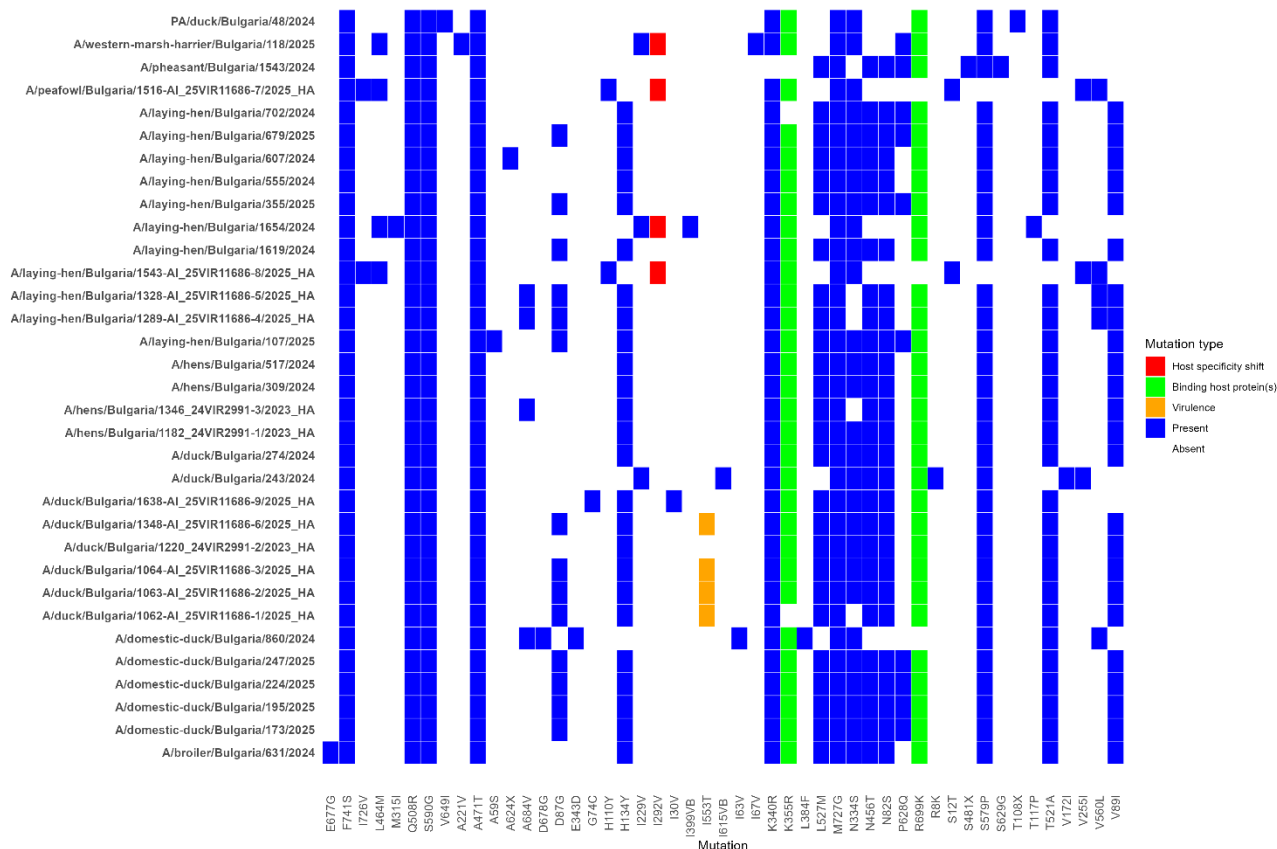
4. Оценка на молекулярните маркери, идентифицирани във вируси на птичия грип, изолирани в България

В допълнение към описателния анализ на молекулярните маркери, беше извършена визуализация чрез heatmap на протеините хемаглутинин (НА) и полимеразен базов протеин 2 (PB2), с цел по-ясно представяне на честотата, разпределението и съвместната поява на аминокиселинни замествания в българските изолати. Heatmap анализът на НА подчертава ясно изразена клъстеризация на замествания като A143T, S145L и S149A, които са асоциирани с антигенно маскиране и потенциално променено разпознаване от неутрализиращи антитела. Допълнително се наблюдава съвместна поява на по-редки варианти (напр. K205N) с по-често срещани мутации (като D142E и S145L), което предполага възможни епистатични взаимодействия и роля в антигенната еволюция.



Фигура 5. Heatmap на хемаглутинин (НА)

Анализът на PB2 визуализира разпределението на мутации като I292V и I553T, които се срещат при българските изолати субтип EA-2024-DI.2 и EA-2024-DI.2.1. Мутацията I292V е свързана с повишена репликационна ефективност и частично избягване на вродения имунен отговор при бозайници, докато I553T се асоциира с повишена вирулентност. **Важно наблюдение е липсата на класически маркери за адаптация към бозайници (E627K, D701N), което се потвърждава и от тяхното отсъствие в heatmap визуализациите.** Този интегриран подход позволява по-интуитивно проследяване на ко-мутационни модели и подпомага оценката на потенциалното функционално значение на отделните замествания в контекста на вирусната адаптация.



Фигура 6. Heatmap на полимеразен базов протеин 2 (PB2)

Подробният анализ на NA разкрива значително натрупване на аминокиселинни замествания, като F74C, T76A, K78Q, V99I, H100Y, T289M, Q308K, G336S, V338M, P340S, N366S, G382E, R430G, S434N и D460G. Повечето от тези позиции са локализиращи извън каталитичния център, но попадат в региони, участващи в стабилизацията на тетрамерната структура на NA или във взаимодействията с малки молекули и субстрати. Това предполага, че ефектите от тези мутации са по-скоро индиректни – чрез промяна в конформационната стабилност, динамиката на протеина или достъпността на активния център.

Замествания като H155Y и I106V са добре документирани в различни грипни вируси и често се срещат като част от мутационни комбинации, асоциирани с намалена ефективност на инхибиторите на невраминидазата (NAI). T188I е от особен интерес, тъй като е свързано с умерено намаляване на чувствителността към антивирусни средства и може да влияе върху антигенното разпознаване от антитела. Наличието на S369R в изолат 4_AI допълнително подчертава ролята на NA като активен участник в антигенния дрефт, а не само като функционален ензим, подпомагащ вирусното освобождаване. В съвкупност тези данни показват, че NA е подложена на селективен натиск, който може да влияе както върху лекарствената чувствителност, така и върху имунното избягване.

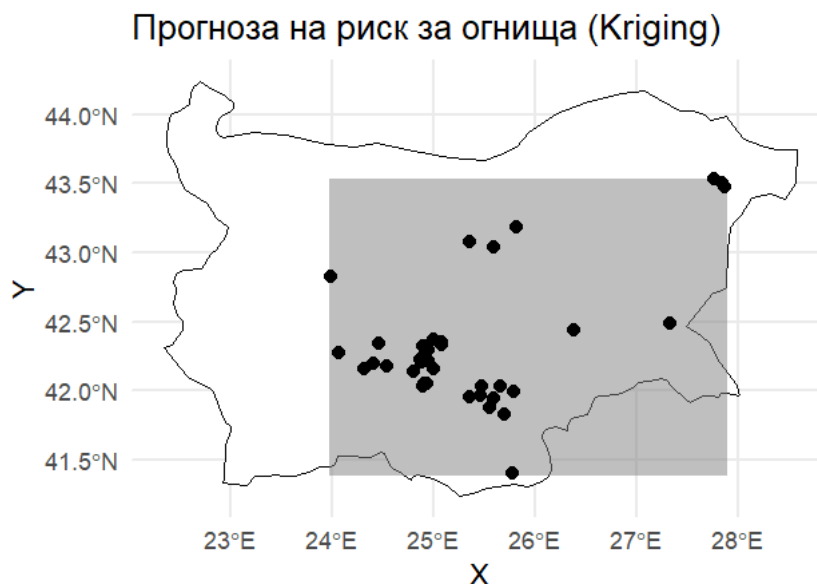
Мутациите, идентифицирани в PA (включително P400S, K228N, I63V и T129I), се наблюдават с относително висока честота и вероятно отразяват адаптивни процеси, насочени към оптимизиране на полимеразната активност и ефективността на вирусната репликация. Част от тези замествания са локализиращи в структурни домейни, участващи във взаимодействията между субединиците на полимеразния комплекс (PB1, PB2 и PA) или във взаимодействията с клетъчни фактори. По-рядко срещаните мутации, като A337V, T357I и V100I, представляват особен интерес, тъй като могат да имат диспропорционално голям ефект, когато се комбинират с други адаптивни изменения. Структурните данни показват, че позиции като I63V, T129I и V100I са разположени в или близо до олигомеризационни интерфейси и

потенциални места за свързване на лиганди, което предполага възможно влияние върху стабилността и функционалната конфигурация на комплекса. Това може да се отрази както на ефективността на транскрипция и репликация, така и на способността на вируса да се адаптира към различни гостоприемници (Goujgoulova et al., 2026).

5. Карта на риска за бъдещи огнища

Чрез използване на геостатистически методи, като kriging, и пространствено-времени модели, беше създадена карта на риска за потенциални бъдещи огнища на Инфлуенца А при птиците. Тези методи позволяват интерполация на данни, като се използват наличните наблюдения за прогнозиране на стойности в неизследвани райони, и оценка на вероятността за възникване на нови инфекции, което е особено важно в райони с ограничено наблюдение (Cressie, 1993).

Пространствено-времените модели комбинират информация за географското разпределение на огнищата и времените тенденции, което позволява не само идентифициране на настоящи горещи точки, но и прогнозиране на потенциалните бъдещи огнища. Такива подходи са широко използвани в епидемиологията на инфекциозните заболявания, тъй като подпомагат управлението на риска, оптимизацията на мониторинговите програми и целенасочените превантивни мерки (Diggle et al., 2013).



Фигура 7. Прогнозна карта. В сивия правоъгълник е зоната с най-голям риск от възникване на огнища.

Получените резултати подчертават, че интегрирането на географски, времеви и генетични данни позволява създаването на точни карти на риска, които могат да бъдат използвани от здравните и ветеринарните служби за ранно предупреждение, приоритизиране на наблюдаваните зони и планиране на превантивни интервенции. Този подход не само увеличава ефективността на мониторинга, но и спомага за ограничаване на разпространението на високопатогенни щамове на H5N1 и минимизиране на икономическите и екологични щети.

6. Изводи:

- Анализът на вирусите на Инфлуенца А в България за периода 2023 – 2026 г. показва значително генетично разнообразие и ясно изразена пространствена структура на огнищата. Комбинирането на генетични данни, пространствени анализи и съвременни визуализационни техники предоставя мощен инструмент за разбиране на динамиката на разпространение на вируса и подпомага разработването на ефективни стратегии за контрол и превенция.

- Анализът на EFSA (2026) показва, че доминиращият генотип EA-2024-DI.2.1 е широко разпространен в Европа, като клъстерите при диви птици (главно *Anseriformes*) и домашни птици съвпадат с основните миграционни маршрути от север (Исландия, Финландия) до юг (Португалия, България) и на изток до Република Грузия. По-рядко срещаните генотипове, като EA-2024-DF и EA-2023-DA, образуват локални огнища в специфични екологични или домашни ниши, което потвърждава, че различните генотипове имат различни модели на пространствено разпространение.
- Наблюденията подчертават важността на географската близост и миграционните маршрути за динамиката на H5N1, както и необходимостта от интегриране на пространствени и генетични данни при оценка на риска и планиране на мерки за контрол и превенция.
- Въпреки умерената положителна корелация между генетичното и географското разстояние ($r \approx 0.22$), ефектът на изолация по разстояние при вирусите на H5N1 в България през 2023 – 2026 г. е слаб. Това показва, че пространствената близост на огнищата само частично определя генетичната им сходност, като други фактори, като единични прониквания на вируса чрез диви птици или човешка дейност, вероятно оказват по-голямо влияние върху генетичната структура на популациите на вируса.
- Приложението на геостатистически методи като kriging и пространствено-времени модели позволява създаването на карти на риска за потенциални бъдещи огнища. Тези методи осигуряват интерполация на данни и оценка на вероятността за възникване на нови инфекции в неизследвани райони, което е ключово за ранното предупреждение, целенасочения мониторинг и управлението на риска (Cressie, 1993; Diggle et al., 2013).
- Цялостният анализ подчертава необходимостта от комплексен подход, който комбинира молекулярна епидемиология, пространствено моделиране и мониторинг на диви и домашни птици. Това позволява по-добро разбиране на динамиката на H5N1 и подпомага планирането на ефективни стратегии за контрол и превенция на Инфлуенца А в България и Европа.
- Комбинираният анализ на HA, NA и полимеразните субединици (PB2 и PA), разкрива комплексна картина на вирусна еволюция при българските изолати. Наблюдаваните мутации не действат изолирано, а формират координирани мутационни профили, които отразяват едновременно антигенен дрифт, адаптацията към специфични гостоприемници и потенциални промени в чувствителността към антивирусни средства.
- Персистирането на определени генотипове и повтарящи се мутационни комбинации, особено в домашни птици, подкрепя хипотезата за локализирана, „скрита“ циркулация на вируса. Липсата на ключови мутации за адаптация към бозайници не изключва напълно зоонозен риск, тъй като натрупването на по-фини адаптивни изменения (напр. в PB2 или PA) може да създаде предпоставки за бъдеща еволюция. Тези резултати подчертават необходимостта от продължаващо геномно наблюдение, комбинирано с функционални и антигенни анализи, за по-добра оценка на риска и ефективността на контролните мерки.

Използвана литература

1. Anselin, L. (1995). *Local Indicators of Spatial Association—LISA*. *Geographical Analysis*, 27(2), 93–115.
2. Cressie, N. A. C. (1993). *Statistics for Spatial Data*. New York: Wiley.
3. Diggle, P. J. (2013). *Statistical Analysis of Spatial and Spatio-Temporal Point Patterns* (3rd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.

4. European Food Safety Authority (EFSA). (2024, 2025, 2026). *Avian influenza overview in Europe*. EFSA Journal.
5. Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., & Xu, X. (1996). *A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise*. Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (KDD-96), 226–231.
6. Goujgoulova G, Stoimenov G, Koev K. *Molecular Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viruses Circulating in Bulgaria During 2024-2025: Evidence for Hidden Circulation and Zoonotic Risk Markers*. Int J Mol Sci. 2026 Feb 10;27(4):1711. doi: 10.3390/ijms27041711. PMID: 41751847; PMCID: PMC12940615.
7. Lam, T. T. Y., Wang, J., Shen, Y., Zhou, B., Duan, L., Cheung, C.-L., Ma, C., Lycett, S. J., Leung, C.-H., Chen, X., Li, L., Guan, Y., & Peiris, J. S. M. (2015). *The genesis and source of influenza viruses*. Nature, 502, 241–244.
8. Lycett, S. J., Pohlmann, A., Staubach, C., Caliendo, V., Woolhouse, M. E. J., Beer, M., Kuiken, T., & Harder, T. (2019). *Role for migratory wild birds in the spread of avian influenza*. Science.
9. Sievert, C. (2020). *Interactive Web-Based Data Visualization with R, plotly, and shiny*. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC.
10. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiological Reviews, 56(1), 152–179.
11. World Health Organization (WHO). (2023). *Influenza A global surveillance report*. Geneva: WHO.
12. Wright, S. (1943). *Isolation by distance*. Genetics, 28(2), 114–138.



Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига:

<http://corhv.government.bg/>

<http://corhv.government.bg/?cat=27>

<http://corhv.government.bg/?cat=71>

[НАУЧЕН АНАЛИЗ Генетична принадлежност на НРАI вирусите в България](#)

[Епидемиологичен анализ на инфлуенца А по птиците за периода септември – ноември 2025 г.](#)

ИЗГОТВИЛ:

Доц. Габриела Гужгулова

Дирекция „Оценка на риска по хранителната верига“, ЦОРХВ

27.03.2026 г.