



Основан 1881 Founded

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Надя Миткова Иванова-Александрова

ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ЗНАЧЕНИЕТО НА ПТИЦИТЕ ЗА ТРАНСМИСИОННАТА ДИНАМИКА НА ЛАЙМСКАТА БОЛЕСТ В БЪЛГАРИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен "Доктор"**

Област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление 7.1. Медицина

Докторска програма: Епидемиология

Научен ръководител:

Професор д-р Ива Стефанова Христова, дмн

София, 2023 г.

Дисертационният труд е представен на разширен колегиум на отдел „Епидемиология“ на 02.06.2023 г. и е насочен за защита пред научно жури. Дисертационният труд съдържа 128 страници, 27 фигури, 18 таблици и 3 снимки. Литературната справка включва 235 източника.

Материалите във връзка със защитата са публикувани на интернет страницата на НЦЗПБ и се намират на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, гр. София.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на.....2023 г. от.....ч. в аулата на НЦЗПБ, бул. Янко Сакъзов № 26, гр. София, на открито заседание на научното жури, назначено със заповед № 242/08.06.2023 г. на Директора на НЦЗПБ, съгласно ППЗРАСРБ на НЦЗПБ и ЗРАСРБ.

Надя Миткова Иванова-Александрова

**ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ЗНАЧЕНИЕТО НА ПТИЦИТЕ
ЗА ТРАНСМИСИОННАТА ДИНАМИКА НА
ЛАЙМСКАТА БОЛЕСТ В БЪЛГАРИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен "Доктор"**

Област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление 7.1. Медицина

Докторска програма: Епидемиология

Научен ръководител:

Професор д-р Ива Стефанова Христова, дмн

Официални рецензенти:

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн

Проф. д-р Ани Кеворк Кеворкян – Сариян, дм

София, 2023 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ.....	1
ВЪВЕДЕНИЕ.....	2
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	4
МАТЕРИАЛИ, МЕТОДИ	5
МАТЕРИАЛИ.....	5
МЕТОДИ.....	7
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	12
1. Проучване върху паразитирането на <i>I. ricinus</i> по диви птици в две области на България – София (столица) и Силистренска.....	12
1.1. Индекс на доминиране на <i>I. ricinus</i> сред видовете кърлежи паразитиращи по птици.....	12
1.2. Индекс на срещаемост на <i>I. ricinus</i> по птиците.....	14
1.3. Интензитет на опаразитяване на <i>I. ricinus</i> по птиците.....	16
2. Проучване върху разпространението на <i>B. burgdorferi</i> s.l. сред кърлежите <i>I. ricinus</i> паразитиращи по птици.....	22
3. Проучване на разпространението на <i>B. burgdorferi</i> s.l. сред гладни кърлежи <i>I. ricinus</i> от София (столица) и Силистренска област.....	31
4. Проучване на разпространението на <i>B. burgdorferi</i> s.l. сред диви птици чрез изследване на кръвни проби.....	33
4.1.Изследване с <i>ELISA</i> метод.....	33
4.2. Изследване с <i>PCR</i> метод.....	37
5. Проучване на разпространението на вируса Западен Нил сред диви птици чрез изследване на кръвни проби.....	38
5.1. Изследване с <i>ELISA</i> метод.....	38
5.2. Изследване с <i>PCR</i> метод.....	43
ИЗВОДИ.....	45
ПРИНОСИ.....	46
СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ.....	47
БЛАГОДАРНОСТИ.....	49
ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА.....	51
ABSTRACT.....	55

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ЗНТ	Западнонилска треска
ИБЕИ – БАН	Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при Българска академия на науките
ЛБ	Лаймска болест
НЦЗПБ	Национален център по заразни и паразитни болести
РНК	Рибонуклеинова киселина

На латиница

B. burgdorferi s.l.	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
B. burgdorferi s.s.	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
EDTA	Етилендиаминтетраоцетна киселина (Ethylene diamine tetra acetic acid)
ELISA	Ензим-свързан имуносорбентен анализ (Enzyme-linked immunosorbent assay)
IgG	Имуноглобулин Г (Immunoglobulin G)
PCR	Полимеразна верижна реакция (Polymerase chain reaction)
Real time RT-PCR	Полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция в реално време (Real time Reverse transcription PCR)
WNV	Вирус Западен Нил (West Nile Virus)

Единици

nm	Нанометър
μL	Микролитър

ВЪВЕДЕНИЕ

Векторно-предаваните заболявания заемат над 17% от инфекциозните болести при човека и причиняват над 700 000 смъртни случая годишно по света. Сред кърлежово-предаваните инфекции, Лаймската болест (ЛБ) понастоящем е най-разпространената в умерените ширини на Северното полукълбо. В Европа приблизителният брой на случаите възлиза на 85 000 годишно [1], а сред най-засегнатите страни са Германия, Австрия, Словения и Швеция. България е ендемичен регион за ЛБ, където диагнозата е потвърдена лабораторно при болни от всички области на страната.

Лаймската болест е природноогнищна трансмисивна зооноза, причинявана от спирохети *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Засяга хора и някои домашни животни. В Европа резервоари на борелии, макар и не всички патогенни за човека, са дребни и средни по размери гризачи, насекомоядни бозайници, птици и гущери. Основните вектори, които се заразяват от тях и разпространяват инфекцията помежду си и към гръбначни животни, са кръвосмучещи кърлежи от род *Ixodes*. Човек се явява случаен гостоприемник, при който болестта се предава при ухапване от заразен кърлеж. Навременната диагностика и адекватната антибиотична терапия са от първостепенно значение за успешното лечение на пациентите. Нелекуваната инфекция може да прогресира и да доведе до мултисистемни прояви и увреждания на ставите, сърцето и нервната система. В Европа най-честата проява на дисеминираната ЛБ е невроборелиозата, следвана от Лайм артрит и борелиен лимфоцитом. Въпреки напредъка в диагностицирането и лечението, здравната осведоменост на населението, мерките за редуциране на кърлежовите местообитания в населените места и провеждането на дезакаризации, рискът от разпространението на инфекцията е трудно да се ограничи. Понастоящем ваксина срещу болестта не се използва при хората.

Провеждането на надзор на гладните инфектирани кърлежи и резервоарните гостоприемници на *B. burgdorferi s.l.*, е основна част от надзора на ЛБ. Преценка на потенциалния риск може да се направи след установяване вида на причинителите във векторите и резервоарите, и честотата на инфекцията в техните популации. Анализ от 2017 г. за 23 европейски страни показва, че в гладните кърлежи най-често срещаните видове са *B. afzelii* и *B. garinii* [2]. Проучвания от България също показват доминиране на *B. afzelii* сред кърлежите, последвано от *B. burgdorferi s.s.* и *B. garinii* [3]. Подобно на други векторно-предавани заболявания, при ЛБ е трудно да се определи ролята на резервоарите за разпространението на патогените в ендемичните области. В литературата преобладават данни за участието на гризачите в поддържането на

инфекцията, и по-конкретно на *B. afzelii* и *B. burgdorferi* s.s. По-малко се знае и много по-предпазливи са съобщенията за намесата на други гръбначни животни в циркулацията на спирохетите. Подвижността на птиците например е от особено значение, тъй като при своите придвижвания те пренасят кърлежи далеч от своите гнездови територии и това е фактор, който не може да се контролира. Едновременно с пренасянето на кърлежи, някои видове птици могат да са и източник за тяхното заразяване. Откриването на инфекцията сред кърлежови ларви свалени от птици, дава основание да се предположи, че ларвите най-вероятно са се заразили от птиците, тъй като борелиите рядко се предават трансвариално. По-директните доказателства за резервоарната роля на птиците са свързани с изолирането на борелии от кръвта им и при биопсии от органи. Най-често асоциирането е с *B. garinii*, причиняваща Лаймска невроборелиоза. Резервоарната компетенция на птиците за ЛБ е вродена способност, която подлежи на доизясняване в отделните географски региони. Едни и същи видове птици могат да участват с различна ефективност в циркулацията на болестта в различни региони. Данни от молекулярно-генетични изследвания за откриване на борелии в кърлежи от птици, или от изследвания на кръв, не открихме в литературата.

Освен с борелии, дивите птици са свързани и с разпространението на грипни вируси, салмонелози, вируси пренасяни чрез членестоноги [4]. С нарастващо епидемиологично и ветеринарно-медицинско значение в Европа е разпространението на вируса на Западен Нил (WNV), причинител на инфекцията Западнонилска треска (ЗНТ). Вирусът е отговорен за болести при птици, коне и хора. Познанията върху видовете птици, които участват в ефективната поддръжка на WNV в даден район, са важен елемент от разбирането за епидемиологията на ЗНТ. У нас първите случаи на ЗНТ при хора са открити и доказани през 2015 г. [5], а най-много заболяли са регистрирани през 2018 г. [6]. Национално проучване от 2015 г. показва стойност на серопреваленция сред населението 1,5%, с най-високи нива в Софийска област и области граничещи с река Дунав [7]. В допълнение на това, молекулярното откриване на WNV в клинични материали на пациенти от Софийско и в комари *Culex pipiens* от дунавските региони, определя тези части от страната като рискови [8]. Целенасочени и системни проучвания върху резервоарните видове птици биха допринесли за прогнозата и адекватния контрол на заболяването.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основна **ЦЕЛ** на настоящия дисертационен труд е да се проучи 1) ролята на местни и мигриращи видове диви птици за разпространението на Лаймската болест в България.

Като допълнителна **ЦЕЛ** си поставихме да оценим 2) ролята на местни и мигриращи видове диви птици за разпространението на Западнонилска треска в България.

За постигане на целите определихме следните **ЗАДАЧИ**:

1. Да се проучи паразитирането на *I. ricinus* по диви птици в две области на България – София (столица) и Силистренска чрез определяне на:
 - 1.1. Индекс на доминиране на *I. ricinus* сред видовете кърлежи паразитиращи по птици.
 - 1.2. Индекс на срещаемост на *I. ricinus* по птиците.
 - 1.3. Интензитет на опаразитяване на *I. ricinus* по птиците.
2. Да се проучи разпространението на *B. burgdorferi* s.l. сред кърлежите *I. ricinus* паразитиращи по птици.
3. Да се проучи разпространението на *B. burgdorferi* s.l. сред гладни кърлежи *I. ricinus* събрани от местата на улов на птиците.
4. Да се проучи разпространението на *B. burgdorferi* s.l. сред диви птици чрез изследване на кръвни проби:
 - 4.1. Изследване с ELISA метод.
 - 4.2. Изследване с PCR метод.
5. Да се проучи разпространението на вируса Западен Нил сред диви птици чрез изследване на кръвни проби:
 - 5.1. Изследване с ELISA метод.
 - 5.2. Изследване с PCR метод.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛИ

1. Кърлежи събрани от птици.
2. Кръвни проби от птици.
3. Кърлежи събрани от природни биотопи.
4. Материали за събиране, съхранение и транспортиране на биологичния материал до лабораториите.
5. Готови търговски китове.
 - 5.1. За екстракция на ДНК от кърлежи и кръв на птици.
 - 5.2. За екстракция на РНК от кръв на птици.
 - 5.3. За размножаване на ДНК и РНК.
 - 5.4. ELISA китове за откриване на антитела срещу причинителя на ЛБ.
 - 5.5. ELISA китове за откриване на антитела срещу причинителя на ЗНТ.
6. Химикали за агарозна електрофореза.

МЕСТА НА ИЗСЛЕДВАНЕ

В град София (42°40'36.4"N, 23°20'51.2"E) уловът на птици и събирането на кърлежи беше проведено между 2020 – 2022 г. на територията на парк „Борисова градина“.

В област Силистра теренната работа беше извършена при Биологична експериментална база „Калимок“ (44°00'42.4"N, 26°26'17.1"E) през пролетта на 2010 г. и след това между 2019 – 2022 г. Базата е разположена на 2 км от река Дунав и функционира към ИБЕИ – БАН. Прилежащата ѝ територия е част от Защитена зона „Калимок-Бръшлен“ към Натура 2000. През 1989 г. програмата BirdLife International обявява територията за Орнитологично важно място [9].

Уловът на птиците беше осъществен с водещото участие на орнитолози от ИБЕИ – БАН и след издаване на разрешителни от Министерството на околната среда и водите. Използвани бяха стандартни вертикални орнитологични мрежи (*Снимка 1*).



Сн. 1. Едно от местата на улов на птиците – канала при БЕБ „Калимок“

Всички птици бяха маркирани с метален пръстен с индивидуален номер, определени до вид, със снети морфометрични показатели, претеглени на тегло и при възможност определени до възраст и пол.

Кръвните проби бяха взети от брахиалната вена. В зависимост от теглото на птицата, обемът на изтеглената кръв варираше между 30 μL и 50 μL . Кръвта беше събрана с хепаринизирани капилярки и разпределяна в две епруветки: за молекулярно-генетично и за серологично изследване. В епруветките за молекулярния тест предварително беше налят 20 μL буфер EDTA. Четири от тези проби бяха събрани с капилярки без хепарин. По време на теренната работа всички проби бяха съхранявани в стереопорна кутия с охладители, след което пробите за молекулярно изследване бяха поставени на -80°C , а серологичните проби на 4°C до момента на изследването. В случаите на повторно хванати птици, кръв беше взимана, когато периода между двата улова беше над 10 дни.

Откритите по тялото на птиците кърлежи бяха отстранявани с пинсета. Веднага след изследването птиците бяха освобождавани в същите местообитания.

Гладните кърлежи бяха събрани с бял памучен флаг от тревни площи и храсти в районите на улов на птиците. Всички кърлежи бяха определени до вид, пол и стадий на развитие въз основа на морфологични белези. Идентификацията беше извършена в лаборатория „Медицинска арахноентомология и зоология с дезинсекция и дератизация“ при НЦЗПБ.

За кърлежите, намерени по птици, бяха изчислени следните показатели:

1. Индекс на доминиране – процентно съотношение на броя кърлежи от даден вид към общия брой кърлежи от всички видове.
2. Индекс на срещаемост (Степен на опарзитяване при птиците) – процентно съотношение на броя опарзитени птици към общия брой уловени птици.
 - 2.1. Индекс на срещаемост на *I. ricinus* – процентно съотношение на броя опарзитени с *I. ricinus* птици към общия брой уловени птици.

За отделните видове птици носещи *I. ricinus*, степента на опарзитеност за целия изследван период беше изчислена в проценти за видовете представени с 20 или повече индивиди. Изчисленията на същия показател в рамките на една година, бяха извършени за видовете птици с 10 или повече индивиди.

3. Интензитет на опарзитяване – среден брой кърлежи на отделен индивид птица.
 - 3.1. Относителният интензитет беше изчислен като общият брой кърлежи от всички видове беше разделен на общия брой уловени птици от всички видове.
 - 3.2. Средният интензитет беше изчислен като общият брой кърлежи от всички видове беше разделен на общия брой опарзитени птици от всички видове.

За *I. ricinus* интензитетът беше изчислен поотделно за всеки вид птица с уловени 20 или повече индивиди.

До молекулярно-генетичното изследване кърлежите бяха съхранявани при 4⁰С.

МЕТОДИ

Молекулярно-генетичните и серологични изследвания върху диагностиката на ЛБ и ЗНТ бяха извършени в Национална референтна лаборатория „Кърлежово/векторно преносими инфекции, листерии и лептоспири“ при НЦЗПБ.

ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ОТКРИВАНЕ НА *V. BURGDORFERI* S.L.

1. Екстракция на ДНК

1.1. Екстракция на ДНК от кърлежи. За екстракцията на ДНК беше използван готов кит DNeasy blood & tissue (каталожен номер 69506, QIAGEN) и бяха следвани указанията на производителя.

При кърлежите от птици, всички ларви от една птица бяха поставяни в един пул, а всички нимфи от същата птица в друг пул. При PCR метода беше отчетена минималната заразненост (ако само една ларва или една нимфа в пул е положителна). При изследването на гладните кърлежи, една част бяха изследвани самостоятелно, а друга част в пулове

съдържащи от 2 до 5 кърлежа. При пуловете с над 1 кърлеж беше отчетена минималната заразеност.

1.2. Екстракция на ДНК от кръвни птичи проби. Използван беше търговски кит DNeasy blood & tissue (каталожен номер 69506, QIAGEN) и бяха следвани описаните от производителя стъпки.

2. Полимеразна верижна реакция (PCR)

2.1. Nested PCR е модифициран, високо чувствителен и високо специфичен метод, при който се използват два чифта праймери за една и съща целева секвенция в две последователни серии. Участието на две двойки олигонуклеотиди позволява да се направят голям брой цикли, което повишава чувствителността на изследването. Другото предимство е повишената специфичност, която се дължи на това, че втория чифт праймери се свързва само към нуклеотидна последователност открита в продуктите от първата серия. По този начин се намалява вероятността от неспецифично свързване.

За откриване на ДНК на *B. burgdorferi* s.l. в кърлежи и в птича кръв беше проведен nested PCR за намножаване на интергенен спейсърен регион между 5S и 23S rRNA гени. В двете серии беше използван готов 2x концентриран мастер микс PrimeSTAR® HS (Premix), (кат. номер R040A, Takara bio), съдържащ ензим ДНК-полимераза, дезоксинуклеотид трифосфати и реакционен буфер. Реакциите бяха проведени в обем от 50 µL, като всяка реакция съдържаше:

Първа серия: 2x мастер микс – 25 µL, вода – 18 µL, „Forward“ (23SN1) праймер – 1 µL, „Reverse“ (23SC1) праймер – 1 µL, ДНК последователност – 5 µL.

За втора серия бяха използвани същите реактиви: 2x мастер микс – 25 µL, вода – 22 µL, „Forward“ (23SN2) праймер – 1 µL, „Reverse“ (5SCB) праймер – 1 µL, нуклеотидна последователност от първа серия – 1 µL.

При провеждането на полимеразно-верижните реакции, едновременно с изследваните проби бяха залагани положителни и отрицателни контроли. Положителните контроли бяха пускани с ДНК на *B. burgdorferi* щам В31, а отрицателните само с вода, вместо с нуклеинова киселина.

Полимеразно-верижните реакции бяха проведени в термосайклер (Applied Biosystems 2720). Всички продукти от PCR бяха анализирани електрофоретично в 1,5% агарозен гел в 50 ml 1xTBE буфер (VWR international, 0658). Геловите бяха визуализирани с етидиев бромид (AppliChem, A2273.0005). След полимеризация на агарозата пробите и молекулярните маркери бяха нанасяни на стартовете (8 µl проба + 2

µl 5x лоудинг буфер). Електрофоретичните анализи бяха провеждани за 90 минути при постоянна сила на тока и напрежение 100V. Визуализацията на намножените продукти и молекулярните маркери беше отчитана на UV-трансилюминатор (Compact Digimage System, UVDI series; Major Science, USA).

3. Ензим-свързан имуносорбентен анализ (ELISA)

Серумните проби от птиците бяха тествани за наличие на антитела от клас IgG срещу причинителя на ЛБ. Използвани бяха микроплаки (Euroimmun, Germany) натоварени със специфични антигени от *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* и *B. garinii*, както и рекомбинантен VlsE (Variable major protein-Like Sequence, Expressed). Серумите бяха разредени в съотношение 1:20 и инкубирани за 60 минути при 37⁰ C. Микротитърните плаки бяха промити с Wash buffer (Euroimmun, Germany) и беше добавен 50 µL заешки IgY (IgG) анти-птичи пероксидазен конюгат (Sigma) при крайно разреждане 1:10 000. След извършена втора инкубация при същите условия и повторно промиване на плаките беше добавен 50 µL тетраметил бензидин (Euroimmun, Germany). Плаките бяха инкубирани отново за 15 минути на стайна температура на тъмно, след което реакциите бяха стопирани със стоп разтвор (Euroimmun, Germany). Резултатите бяха измерени чрез ELISA четец/ридер (BioTek ELx800) при 450/620 nm дължина на вълната. За определяне на положителните и отрицателни резултати беше зададена гранична прагова стойност (cut-off). Праговата стойност беше изчислена чрез изследване на панел от 10 серумни проби от здрави птици в една плака, намиране на средната аритметична стойност на техните абсорбции (x) и добавяне на 3 стандартни отклонения (SD), т.е. прагова стойност = $x + 3 SD$.

Серумните проби с абсорбция по-голяма от праговата стойност бяха приети за положителни, пробите с намаляване между $x+3 SD$ и $x+2 SD$ интерпретирани като гранични, а тези с намаляване по-ниско от $x+2 SD$ като отрицателни. За целите на изследването, граничните стойности бяха тълкувани като отрицателни.

ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ОТКРИВАНЕ ВИРУСА НА ЗАПАДЕН НИЛ

1. Екстракция на РНК

1.2. Екстракция на РНК от кръвни птичи проби. Използван беше търговски кит на QIAGEN – QIAamp Viral RNA mini kit (52906), който беше приложен по инструкциите на производителя.

2. Полимеразна верижна реакция с обратна транскрипция в реално време (Real time RT-PCR) беше приложена за откриване на РНК на вируса на ЗНТ. Методът е чувствителен и подходящ за откриване на РНК WNV Lineage 1 и Lineage 2.

Използван беше готов мастер микс qMAX Sen one-step probe RT-qPCR Kit 4x (Cnvaх, E0842). Реакциите бяха проведени в обем от 20 μ L, като всяка реакция съдържаше: мастер микс – 5 μ L, вода – 6 μ L, ензим обратна транскриптаза (RT) – 1 μ L, „Forward“ (ProC-F1) праймер – 1,5 μ L, „Reverse“ (ProC-R) праймер – 1,5 μ L, Taqman probe – 1 μ L, РНК последователности – 4 μ L.

За контролиране на системата бяха заложили положителни контроли съдържащи РНК WNV Lineage 2 и отрицателни контроли без нуклеинова киселина.

3. ELISA метод за вируса на Западния Нил

Серумните проби от птиците бяха тествани за наличие на антитела от клас IgG срещу причинителя на ЗНТ. Използвани бяха микроплаки (Euroimmun, Germany), натоварени със специфичен рекомбинантен гликопротеин Е антиген на вируса на ЗНТ. Серумите бяха разредени в съотношение 1:20 и инкубирани за 60 минути при 37⁰ С. Микротитърните плаки бяха промити с Wash buffer (Euroimmun, Germany) и беше добавен 50 μ L заешки IgY (IgG) анти-птичи пероксидазен конюгат (Sigma) при крайно разреждане 1:10 000. След извършена втора инкубация при същите условия и повторно промиване на плаките беше добавен 50 μ L тетраметил бензидин (Euroimmun, Germany). Плаките бяха инкубирани отново за 15 минути на стайна температура на тъмно, след което реакциите бяха стопирани със стоп разтвор (Euroimmun, Germany). Резултатите бяха измерени чрез ELISA четец/ридер (BioTek ELx800) при 450/620 nm дължина на вълната. За определяне на положителните и отрицателни резултати беше зададена гранична прагова стойност (cut-off). Праговата стойност беше изчислена чрез изследване на панел от 10 серумни проби от здрави птици в една плака и намиране на средната аритметична стойност на техните абсорбции (x) и добавяне на 3 стандартни отклонения (SD), т.е. прагова стойност = x + 3 SD.

Серумните проби с абсорбция по-голяма от праговата стойност бяха считани за положителни, пробите с намаляване между $x+3$ SD и $x+2$ SD приети като гранични, а тези с намаляване по-ниско от $x+2$ SD като отрицателни. За целите на изследването, граничните стойности отнесохме към отрицателните.

СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

С помощта на критерия χ^2 (chi-square test) беше извършена статистическа проверка на хипотеза за значимостта на наблюдаваните разлики при част от получените резултати. Изчисленията бяха направени при степени на свобода $(2-1)*(2-1) = 1$, а за критична стойност на нивото на значимост беше избрано $p\text{-value} < 0,05$. За статистическата обработка беше използвана SPSS софтуерна програма на IBM.

Хипотезата за значимостта на разликата между средните интензитети на ларвите и нимфите беше проверена с Welch t-test (t-тест на неравностойните дисперсии), който е подходящ за сравняване на средните стойности между две независими групи. Welch t-test определя статистиката t по формулата:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

където

\bar{X}_1 е средната стойност на първата проба

s_1 е стандартното отклонение на първата проба

N_1 е размера на първата проба

Стойностите \bar{X}_2 , s_2 и N_2 във формулата се отнасят съответно за втората проба.

При получените степени на свобода над 30 и стандартно нормално разпределение, критичната стойност беше взета от таблица за стандартно нормално разпределение при избрано $p\text{-value} < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

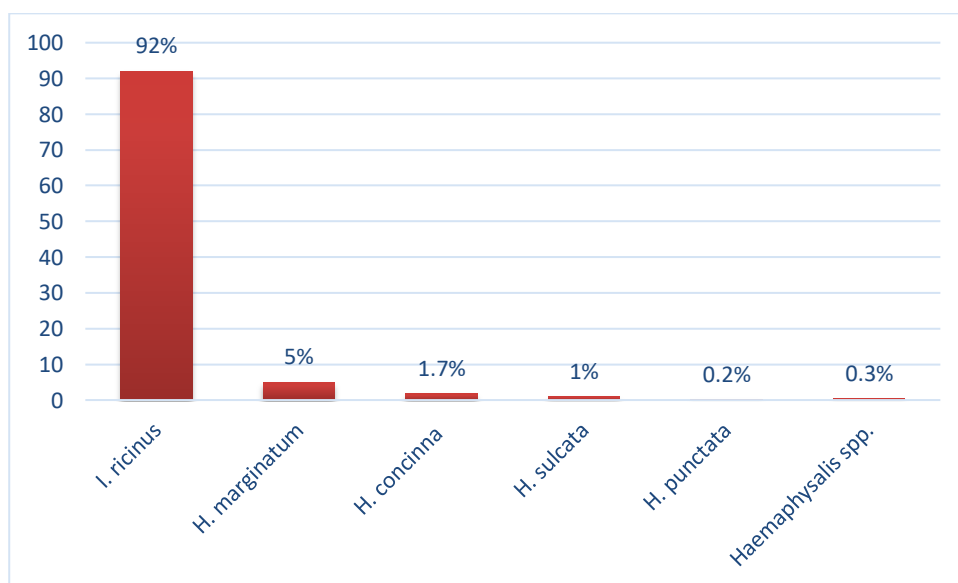
1. Проучване върху паразитирането на *I. ricinus* по диви птици в две области на България – София (столица) и Силистренска.

От двата района бяха изследвани общо 2 727 птици от 9 разряда и 80 вида. Уловът на Калимок включваше 2 537 птици от 75 вида, а в София 190 птици от 15 вида. Шестдесет и два вида (77,5%) принадлежаха към разред Вrabчоподобни.

Открити бяха общо 589 кърлежи при 127 птици на 21 вида (Таблица 1). Идентифицирани бяха следните видове кърлежи: *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844), *Haemaphysalis punctata* (Canestrini and Fanzago, 1878), *Haemaphysalis concinna* (Koch, 1844) и *Haemaphysalis sulcata* (Canestrini and Fanzago, 1877). Два екземпляра от род *Haemaphysalis* не успяхме да определим до вид, поради нарушена цялост на тялото. Всички видове, различни от *I. ricinus*, бяха събрани от птици на Калимок. За целта на дисертационния труд по-подробно ще бъдат представени данните за опаразитяването с *I. ricinus* в двата района.

1.1. Индекс на доминиране на *I. ricinus* сред видовете кърлежи паразитиращи по птици.

Ixodes ricinus беше най-често откриваният вид (92%; 541/589), със значителна разлика спрямо *H. marginatum* (5%; 29/589), p -value <0,0001 (Фиг. 1).

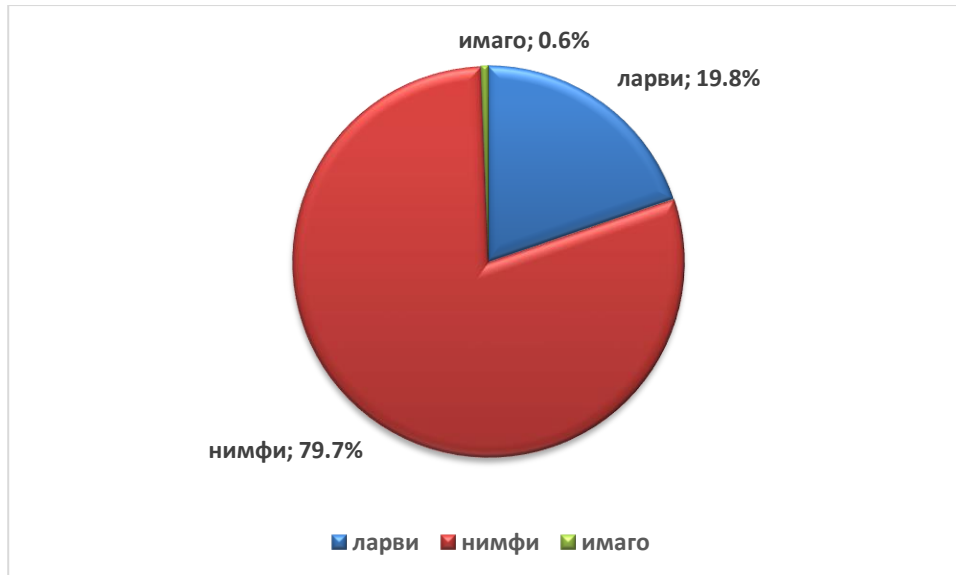


Фиг. 1. Разпределение (%) на видовете кърлежи събрани от птици в двата района

Таблица 1. Видов състав на опаразитените птици и на събраните кърлежи от „Борисова градина“ и на БЕБ „Калимок“.

Вид опаразитена птица	Брой опаразитени/ Брой уловени птици	Вид кърлеж						
		<i>I. ricinus</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. concinna</i>	<i>H. sulcata</i>	<i>H. punctata</i>	<i>Haemaphysalis spp.</i>	
Малък ястреб	1/3	2						
Тръстиково шаварче	3/259	1			1		1	
Мочурно шаварче	3/83	1	2					
Блатно шаварче	1/199						1	
Черешарка	1/11	1						
Червеногръдка	7/74	10				1		
Обикновена чинка	11/91	34						
Тръстиков цвъркач	1/36				3			
Северен славей	3/46	3			1			
Южен славей	6/77	25	24					
Елов певец	1/48	1						
Буков певец	1/2		1					
Градинска червеноопашка	1/5		1					
Голямо белогушо коприварче	1/44		1					
Малко белогушо коприварче	2/123	2						
Орехче	1/7	1						
Кос	62/118	413		4	1			
Голям синигер	13/175	20						
Обикновен скорец	4/28	1		6				
Поен дрозд	3/35	25						
Сойка	1/13	1						
ОБЩО	127/1477	541	29	10	6	1	2	589

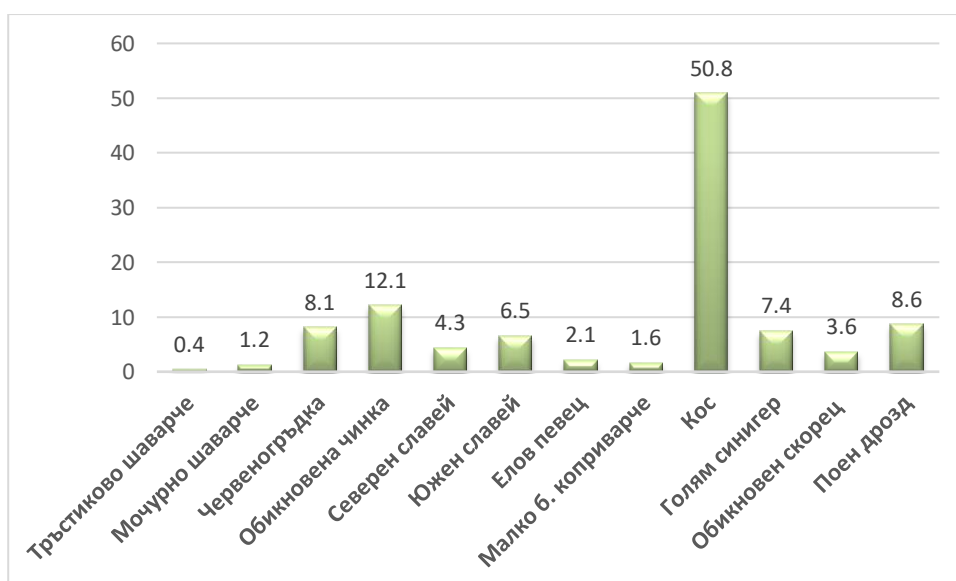
Открити бяха и трите паразитиращи форми на *I. ricinus* с преобладаване на предимагиналните, а сред тях нимфите имаха голям превес спрямо ларвите ($p\text{-value} < 0,0001$) (Фиг. 2).



Фиг. 2. Разпределение (%) на възрастовите стадии на *I. ricinus*

1.2. Индекс на срещаемост на *I. ricinus* по птиците.

Общо 110 (4%) птици от 16 вида носеха *I. ricinus* (Таблица 2). Най-често опаразитен беше коса (*Turdus merula*) (Фиг. 3), значително повече спрямо обикновената чинка, която беше на второ място ($p\text{-value} < 0,0001$).

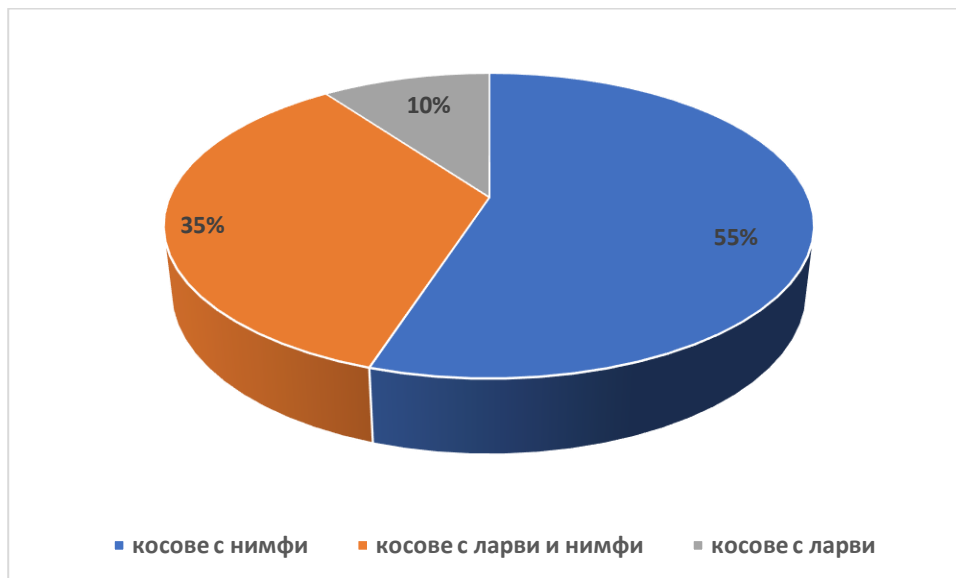


Фиг. 3. Степен на опаразитеност (%) при по-често улавяните видове птици в двата района

Таблица 2. Видов състав на опаразитените с *I. ricinus* птици в „Борисова градина“ и на БЕБ „Калимок“.

Вид опаразитена птица	Брой опаразитени/ Брой уловени птици	Брой кърлежи				Интензитет	
		Ларви	Нимфи	Имаго	ОБЩО	Относителен	Среден
Малък ястреб	1/3	–	1	1 ♀	2	–	–
Тръстиково шаварче	1/259	–	1	–	1	0,004	1
Мочурно шаварче	1/83	–	1	–	1	0,01	1
Черешарка	1/11	–	1	–	1	–	–
Червеногръдка	6/74	4	6	–	10	0,1	1,6
Обикновена чинка	11/91	12	22	–	34	0,4	3,1
Северен славей	2/46	–	1	2 ♀	3	0,06	1,5
Южен славей	5/77	2	23	–	25	0,3	5
Елов певец	1/48	–	1	–	1	0,02	1
Малко б. коприварче	2/123	–	2	–	2	0,01	1
Орехче	1/7	–	1	–	1		
Кос	60/118	76	337	–	413	3,5	6,9
Голям синигер	13/175	12	8	–	20	0,1	1,5
Обикновен скорец	1/28	–	1	–	1	0,03	1
Поен дрозд	3/35	1	24	–	25	0,7	8,3
Сойка	1/13	–	1	–	1	–	–
ОБЩО	110/1191	107	431	3	541		

Тъй като, за да участва даден вид гостоприемник в динамиката на *B. burgdorferi*, той трябва да има контакт с нимфи, за нас беше важно да установим преобладаващия модел на опаразитяване при най-често опаразитения вид птица. Най-много косове носеха само нимфи, на второ място ларви и нимфи и най-малко единствено ларви (Фиг. 4). Процентните изчисления на графиката са направени въз основа на 60 опаразитени коса.



Фиг. 4. Разпределение (%) на индивидите *T. merula* според инфекцията на предимагиналните стадии

Между първите два модела на паразитиране на *I. ricinus* при косовете, съществуваше значима разлика, ($p\text{-value} < 0,05$).

1.3. Интензитет на опаразитяване на *I. ricinus* по птиците.

Общият относителен интензитет за двата района беше 0,2 кърлежа на уловена птица (541/2 727), а средният – 5 кърлежа на опаразитена птица (541/110).

При коса бяха открити 76,3% (413/541) от всички кърлежи *I. ricinus* (Таблица 2). Стойностите на относителния и средния интензитет бяха съответно 3,5 и 6,9. И докато относителният интензитет дава само условна представа за изобилието от кърлежи върху даден вид гостоприемник, то стойностите на средния интензитет са показателни за резервоарната му функция. Колкото повече нимфи паразитират върху гостоприемника, толкова по-голяма е вероятността той да се зарази с *B. burgdorferi*, и колкото повече ларви паразитират, толкова повече от тях могат да добият инфекцията. Средният интензитет от 6,2 нимфи при *T. merula* (337 нимфи/54 коса опаразитени с нимфи) беше значително по-изразен от този при ларвите – 2,8 (76 ларви/27 коса опаразитени с ларви),

(p -value $< 0,0001$). Това определи, че има вероятност косовете в изследваните райони да се заразяват и да участват в трансмисията на ЛБ.

При обикновената чинка, южният славей и пойният дрозд, относителният интензитет беше под 1, а средният между 3,1 и 8,3 кърлежа (Таблица 2).

ОБСЪЖДАНЕ

Ixodes ricinus беше доминиращият вид кърлеж, а косът – най-често и интензивно опаразитяваният вид птица в двата района. За поддържането и разпространението на кърлежовите популации, според нашите данни допринасят още обикновената чинка, пойният дрозд и южният славей, тъй като и при тях наблюдавахме едновременно често опаразитяване и висок среден интензитет. Макар и в различна степен, четирите вида прекарват част от времето си близо до земната повърхност и до храсти в търсене на храна, и строеж на гнезда [10]. В допълнение, тези гостоприемници са широко разпространени видове, обитаващи гори, паркове и градини, често в близост до хората. Това дава възможност за разширяване на ареала на кърлежовите популации, а в някои случаи и на *B. burgdorferi*. С участието на птиците би могло да се обясни до голяма степен откриването на заразени гладни кърлежи в различни региони на България [3].

Много по-често по птиците открихме нимфи *I. ricinus*, отколкото ларви. Това потвърди резултатите на други автори [11,12], особено за семейство Turdidae [11], чийто представител е коса. При нас това разпределение може да се обясни и с факта, че по-голямата част от птиците бяха уловени през пролетта, когато ларвите все още не са активни [13]. От епидемиологична гледна точка, значителният превес на нимфите е важен за резервоарния статус на *T. merula* [14]. Обикновено се смята, че нимфите са отговорни за заразяването на птиците по време на кръвното хранене, а впоследствие и за заразяването на ларвите.

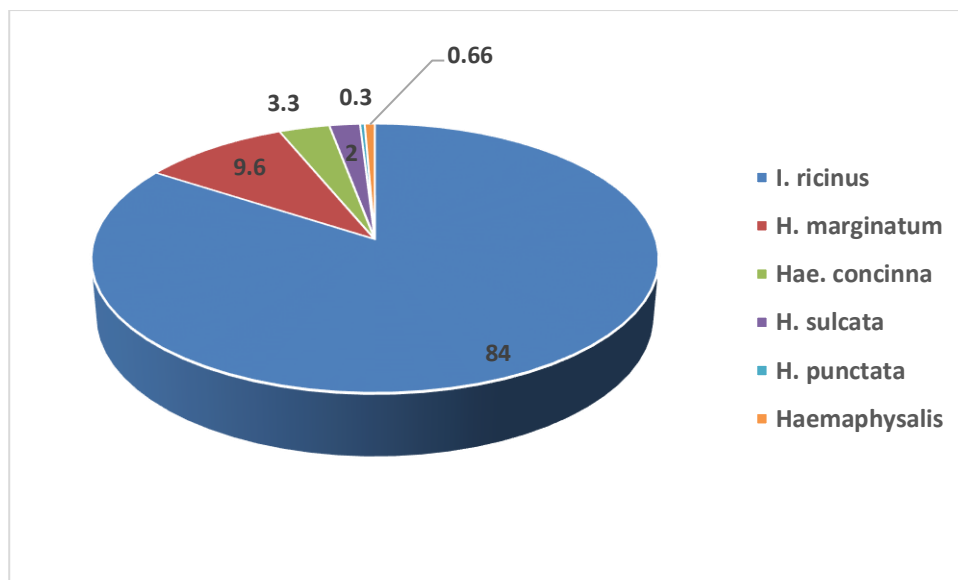
Силистренска област

Индекс на доминиране. На Калимок бяха събрани общо 253 кърлежи *I. ricinus*, (Таблица 3).

Таблица 3. Видов състав на опаразитените с *I. ricinus* птици на БЕБ „Калимок“.

Вид опаразитена птица	Бр опаразитени/ Бр. уловени птици (%)	Брой кърлежи				Интензитет	
		Ларви	Нимфи	Имаго	Общо	Относителен	Среден
Малък ястреб	1/3	–	1	1 ♀	2	–	–
Тръстиково шаварче	1/259 (0,4)	–	1	–	1	0,004	1
Мочурно шаварче	1/83 (1,2)	–	1	–	1	0,01	1
Черешарка	1/11	–	1	–	1	–	–
Червеногръдка	4/56 (7,1)	1	5	–	6	0,1	1,5
Обикновена чинка	10/87 (11,5)	12	21	–	33	0,4	3,3
Северен славей	2/46 (4,3)	–	1	2 ♀	3	0,1	1,5
Южен славей	5/77 (6,5)	2	23	–	25	0,3	5
Елов певец	1/48 (2,1)	–	1	–	1	0,02	1
Малко белогушо коприварче	2/123 (1,6)	–	2	–	2	0,01	1
Орехче	1/7	–	1	–	1	–	–
Кос	27/77 (35,1)	23	149	–	172	2,2	6,4
Голям синигер	4/93 (4,3)	3	1	–	4	0,04	1
Обикновен скорец	1/24 (4,2)	–	1	–	1	0,04	1
ОБЩО	61/994	41	209	3	253		

Доминирането на *I. ricinus* спрямо *H. marginatum* беше значително, p -value $<0,0001$ (Фиг. 5).



Фиг. 5. Разпределение (%) на видовете кърлежи събрани от птици на Калимок

Индекс на срещаемост. *Ixodes ricinus* беше открит при 2,4% (61/2537) от птиците, принадлежащи към 14 вида (Таблица 3). Между първите два най-инфестирани, кос и обикновена чинка, беше наблюдавана съществена разлика, p -value $<0,00001$

Интензитет на опаразитяване. Индексите на интензитет на *I. ricinus* бяха 0,1 кърлежа на уловена птица (253/2537) и 4,1 кърлежа на опаразитена птица (253/61). Косът беше с най-интензивно опаразитяване: 2,2 броя на уловена птица и 6,4 на опаразитена птица. За отделните стадии отчетохме среден интензитет 6,2 за нимфите (149/24) и 3,3 (23/7) за ларвите. При другите видове птици относителният интензитет беше под 1, а средният по-висок при обикновена чинка и южен славей.

ОБСЪЖДАНЕ

На Калимок опаразитяването с *I. ricinus* беше слабо. Вероятно това беше свързано със специфичния ландшафт, видовия състав на изследваните птици, тяхната екология и поведение. Наличието на влажна зона, прави мястото подходящо обитание за различните видове шаварчета например, които преобладаваха в улова. Предпочитаните от тях територии не съвпадат с типичните биотопи на *I. ricinus* [15]. За друг често представен

вид, селска лястовица, също не е обичайно да се храни и/или гнезди на места, където биха се открили кърлежи [10]. Въпреки, че естествената среда на коприварчетата е нерядко сред храсталаци [10] и включва местообитания на *I. ricinus*, кърлежи при голямо черноглаво коприварче изобщо не открихме, а при малко белогушо коприварче изключително рядко. Подобни резултати се съобщават и при други проучвания, където опаразитеността при коприварчетата е около 1% [16]. Така, за доминиращи видове птици в района, които успяхме да уловим, установихме че нямат значение като разпространители на вектора на ЛБ.

По-честа и интензивна опаразитеност наблюдавахме при кос, обикновена чинка и южен славей. Техните основни обитания [10] до голяма степен се припокриват с места подходящи за развитие на *I. ricinus* – широколистни, смесени гори и подлес. Тъй като на Калимок горите заемат ограничена площ, тези видове птици по-рядко присъстваха в сбора.

Област София (столица)

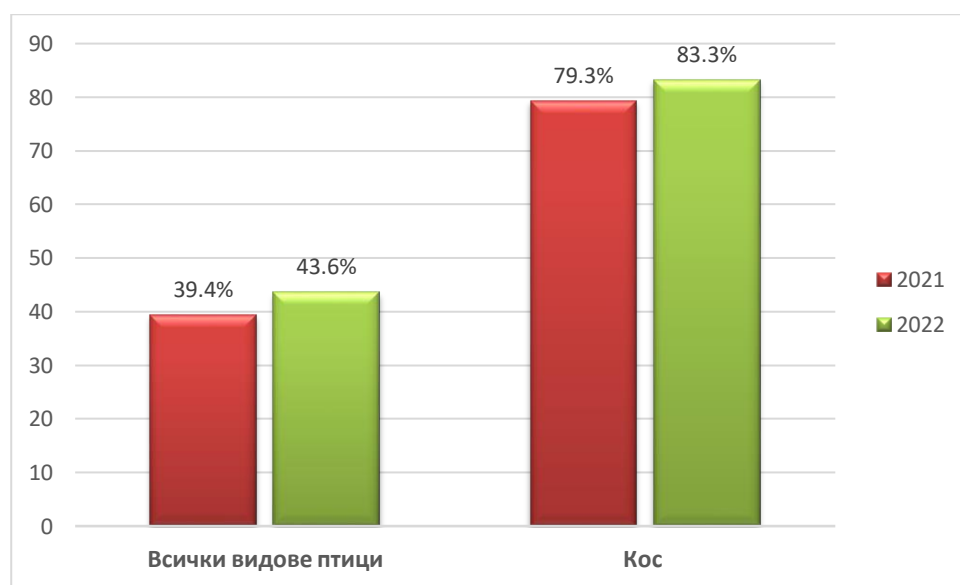
Индекс на доминиране. На територията на „Борисова градина“ бяха събрани 288 кърлежи, единствено от вида *I. ricinus* (Таблица 4). Така неговият индекс на доминиране по птиците в района и за конкретния изследван период беше 100%.

Таблица 4. Видов състав на опаразитените с *I. ricinus* птици в „Борисова градина“.

Вид опаразитена птица	Бр. опаразитени/ Бр. уловени птици (%)	Брой кърлежи			Интензитет	
		Ларви	Нимфи	Общо	Относителен	Среден
Червеногръдка	2/18	3	1	4	–	–
Обикновена чинка	1/4		1	1	–	–
Кос	33/41 (80,5)	53	188	241	5,9	7,3
Голям синигер	9/82 (11)	9	7	16	0,2	1,8
Поен дрозд	3/4	1	24	25	–	–
Сойка	1/7		1	1	–	–
ОБЩО	49/156	66	222	288		

Индекс на срещаемост. Кърлежи *I. ricinus* имаше при 25,8% (49/190) от птиците, представители на 6 вида (Таблица 4). Най-често опаразитени бяха кос и голям синигер, които бяха и най-преобладаващи в сбора – 123 (64,7%) индивиди от общо 190. Косът беше значително по-склонен към опаразитяване – 80,5% (33/41) спрямо синигера – 11 % (9/82), (p-value < 0,0001).

В две поредни години, уловът на птиците през пролетно-летния сезон, беше проведен при еднакво разположение на орнитологичните мрежи, на едни и същи места в Борисовата градина, което позволи да сравним данните за опаразитеност. Статистическите изчисления не показаха значима разлика в опаразитеността през двете години. През 2021 г. кърлежи открихме при 39,4% (28/71) птици, а през 2022 г. при 43,6% (17/39), (p-value = 0,10) (Фиг. 6). Конкретно при коса, през 2021 г. бяха опаразитени 79,3% (23/29) птици, а на следващата година 83,3% (10/12), което също не беше значимо различаване, p-value > 0,1.



Фиг. 6. Сравнение на степента на опаразитеност (%) през 2021/2022 г. при птици в „Борисова градина“

Интензитет на опаразитяване. За София, относителният и среден интензитет бяха съответно 1,5 (288/190) и 5,9 (288/49) кърлежа. Този показател беше най-изразен при коса – 5,9 и 7,3 кърлежа на уловена/опаразитена птица, с по-високи стойности при нимфите (Таблица 4). Пойният дрозд беше сред по-рядко улавяните видове. За целия период на проучване имаме едва 4 птици, но 3 от тях бяха опаразитени и то с общо 25 кърлежа, което предполага често и интензивно опаразитяване.

ОБСЪЖДАНЕ

Големият синигер и косът бяха доминиращите видове в София. Тяхното присъствие в градове, градски паркове и градини се определя като обичайно [17]. Според нашите резултати, косът се открие и като вид приютяващ кърлежи. Тук наблюдавахме типичния модел на опаразитяване, когато средата предоставя подходящи условия едновременно и за гостоприемника, и за вектора. Сравнението за двете поредни години показва устойчивост в степента на опаразитяване при *T. merula* и изглежда, че за София този вид е важен за поддържане на кърлежовата популация. Високи стойности на опаразитеност, близки до нашите, са получените при изследвания в гористи области от североизточна Полша, където 88,5% от косовете носят кърлежи [11]. За Чехия и Словакия се съобщава обща опаразитеност 83,9%, отново в гористи райони [12]. Големият синигер също може да допринесе за локалното разпространение на *I. ricinus*, но с по-ниска ефективност от коса. Допълнителни проучвания са необходими за изясняване на ролята на пойнния дрозд и червеногръдката. Данните към момента дават индикация, че са намесени в пасивното движение на кърлежите.

2. Проучване върху разпространението на *B. burgdorferi* s.l. сред кърлежите *I. ricinus* паразитиращи по птици.

Изследвани бяха 345 кърлежи *I. ricinus*, събрани от 75 птици (10 вида) при общо прегледани 1602 (68 вида) през 2020 – 2022 г., в двата района. Резултатите показаха средна минимална заразеност с *B. burgdorferi* 8,1% (28/345) при 27% (28/102) положителни пулове (Таблица 5). При отделните предимагинални стадии разпространението на инфекцията беше следното:

При ларвите – 10,9% (11/101); положителни пулове – 26% (11/43);

При нимфите – 7% (17/244); положителни пулове – 29% (17/59).

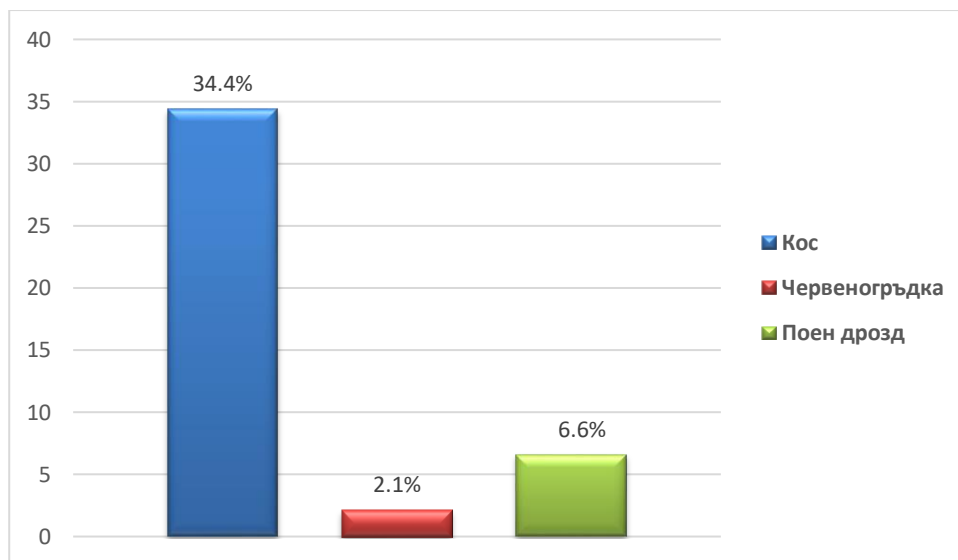
Таблица 5. Резултати от PCR изследването на кърлежи *I. ricinus* събрани от птици в двата района, 2020 – 2022 г.

Вид опаразитена птица	Бр. опаразитени/ Бр. уловени птици	Брой птици с инфектирани кърлежи	Брой изследвани кърлежи	Заразеност с <i>B. burgdorferi</i>		
				Ларви	Нимфи	Общо кърлежи
Тръстиково шаварче	1/134		1		1/1/0	1/1/0
Червеногръдка	4/48	1	6	4/2/1 1/2	2/2/0	6/4/1 1/4
Обикновена чинка	6/49		13	9/2/0	4/4/0	13/6/0
Южен славей	1/40		1		1/1/0	1/1/0
Голям синигер	13/133		20	12/10/0	8/5/0	20/15/0
Обикновен скорец	1/27		1		1/1/0	1/1/0
Малко белогушо коприварче	1/71		1		1/1/0	1/1/0
Кос	44/64	22	276	75/28/10 (13,3) 10/28 (36)	201/40/16 (8) 16/40 (40)	276/68/26 (9,4) 26/68 (38)
Поен дрозд	3/15	1	25	1/1/0	24/3/1 (4,2) 1/3	25/4/1 (4) 1/4
Сойка	1/7		1		1/1/0	1/1/0
ОБЩО	75/588	24	345	*101/43/11 (10,9) **11/43 (26)	244/59/17 (7) 17/59 (29)	345/102/28 (8,1) 28/102 (27)

*Брой кърлежи /брой изследвани пулове/брой положителни пулове (минимална заразеност на кърлежите в %)

** Положителни пулове (%)

Заразени кърлежи имаше при 1,5% (24/1602) птици от видовете кос, поен дрозд и червеногръдка. Косът беше най-честият им гостоприемник – 22 от общо 64 индивида носеха инфектирани кърлежи (Фиг. 7).



Фиг. 7. Относителен дял на птиците с инфектирани кърлежи

Заразени ларви имаше при 10 коса – два от Калимок и осем от София. Четири птици носеха едновременно заразени ларви и нимфи, други четири едновременно заразени ларви и незаразени нимфи и две птици носеха само заразени ларви.

При червеногръдките само един индивид от Калимок носеше инфектирана ларва. Други кърлежи върху тялото на птицата не бяха намерени. При пойния дрозд имаше само инфектирани нимфи открити при една птица от софийския сбор.

ОБСЪЖДАНЕ

Наред с установената роля на птиците като гостоприемници, транспортирането на заразени *I. ricinus* от някои видове врабчоподобни, е очевиден механизъм за разпространението на ЛБ. Спрямо други страни от Европа, делът на инфектираните кърлежи у нас беше почти двойно по-висок от този в Естония – 4,4% [18], но по-нисък от установения в Норвегия – 12,3% [19] и Централна Европа – Швейцария (19,5%), Чехия (27,4%) и Словакия (46%) [20,21,22].

Трите вида птици, при които открихме заразени кърлежи са представители на едно и също систематично семейство (Turdidae) и една от общите им характеристики е, че са наземнохранещи се. Наличието на най-много инфектирани кърлежи при коса, включително и на ларви, не беше изненадващо. Този вид беше най-често изложен на

ухапвания и толерираше изхранването и на двата предимагинални стадия. Степента на разпространение на *B. burgdorferi*, която отчетохме при кърлежите от *T. merula* (9,4%), беше съразмерима с регистрираната в Полша (9,8%) например [23].

Наличието на 13,3% инфектирани ларви при косовете показва, че те най-вероятно участват и в самото заразяване на кърлежите, освен в разпространението. Тук имаме предвид, че трансвариалният механизъм на предаване на борелии се случва рядко [24]. Тъй като в някои от случаите бяха инфектирани едновременно и ларвите, и нимфите от една и съща птица, ние не можем категорично да изключим възможността, че ларвите са се заразили от нимфите при съвместно хранене. В случаите обаче, когато при кърлежите от една и съща птица имахме положителни ларви и отрицателни нимфи или само положителни ларви, без наличие на нимфи, имаме сериозно основание да предположим, че косовете са източник на инфекция.

При пойния дрозд открихме само положителни нимфи и поради това не можем да направим по-категорично заключение за инфекциозната му способност към вектори. Позовавайки се обаче на други автори [11,12], които съобщават и за заразени ларви считаме, че този вид заслужава повече внимание в бъдещи изследвания. Недостатъчният брой тествани ларви от червеногръдка не позволява да дадем предположения за реалния риск, който този вид носи. В Швейцария установената инфекция при ларви от червеногръдки е 17,8% [25], но резултатите за други страни не са достатъчно показателни. В Норвегия инфекция е била открита само при нимфи [26], а в Италия малкият размер на извадката от птици не позволява на авторите да направят заключения [27].

Силистренска област

Минималната средна инфекция сред *I. ricinus* по птиците на Калимок беше 8,8% (5/57) при 16,6% (5/30) положителни пулове. Всички заразени кърлежи бяха от сбора през 2022 г.: 2 пула с ларви от кос, 2 пула с нимфи от кос и 1 пул с ларва от червеногръдка. При отделните стадии, преобладаването на *B. burgdorferi* беше, както следва:

При ларвите – 8,6% (3/35); положителни пулове 23% (3/13);

При нимфите – 9,1% (2/22); положителни пулове 11,8% (2/17).

При коса средната заразеност беше 11,4% (4/35) с 27% положителни пулове; при ларвите – 9,1% (2/22), 28,5% положителни пулове и при нимфите – 15,4% (2/13) с 25% положителни пулове. При червеногръдката положителна беше единствената намерена ларва при този вид птици на Калимок.

ОБСЪЖДАНЕ

В условията на среда, която не е най-характерната нито за гостоприемника, нито за вектора, откриването на инфектирани *I. ricinus* при *T. merula* засилва още повече значението на този вид птица за динамиката на ЛБ.

За обикновената чинка, вторият по опаразитеност вид на Калимок, не установихме потенциал да инфектира кърлежи. Тези наши резултати се различават от докладваните за скандинавските страни например, където върху чинки са откривани заразени ларви и нимфи *I. ricinus* [28,16,26]. За сравнение, степента на опаразитеност сред чинките в Швеция и Дания (1,7%) [28] е по-ниска от тази на Калимок (11,1%), а в Норвегия (18,8%) [26], е незначително по-висока, ($p\text{-value} > 0,05$). Това потвърждава, че е един и същ вид гостоприемник, в зависимост от географското място, може да има различна ефективност за ензоотичния цикъл на ЛБ.

Област София (столица)

Изследвани бяха всички 288 кърлежи, а средната минимална заразеност сред тях беше 8% (23/288). От 72 пула на 288 кърлежи, 23 (32%) пула бяха положителни – 8 при ларвите и 15 при нимфите (*Таблица б*). Заразени нимфи носеха кос и поен дрозд, а заразени ларви само кос.

Средната инфектираност при кърлежите от кос беше 9,1% (22/241) с 41,5% положителни пулове. При отделните стадии стойностите на инфекцията бяха, както следва:

При ларвите – 15,1% (8/53); положителни пулове – 38% (8/21);

При нимфите – 7,4% (14/188); положителни пулове – 44% (14/32);

От 41 изследвани коса, 18 (43,9%) носеха заразени кърлежи:

6 индивиди носеха само заразени нимфи;

4 индивиди носеха едновременно заразени нимфи и ларви;

4 индивиди носеха едновременно заразени нимфи и незаразени ларви;

3 индивиди носеха едновременно незаразени нимфи и заразени ларви;

1 индивид носеше само една заразна ларва или общо за 19,5% (8/41) от косовете (индивидите със заразени ларви), можем да предположим резервоарна роля към ларвите чрез развиване на спирохетемия или чрез създаване на условия за заразяване при съвместно хранене.

Таблица 6. Резултати от PCR изследването на кърлежи *I. ricinus* събрани от птици в „Борисова градина“, 2020 – 2022 г.

Вид опаразитена птица	Бр. опаразитени/ Бр. уловени птици (%)	Брой птици с инфектирани кърлежи (%)	Брой изследвани кърлежи	Заразеност с <i>B. burgdorferi</i>		
				ларви	нимфи	Общо кърлежи
Червеногръдка	2/18		4	3/1/0	1/1/0	4/2/0
Обикновена чинка	1/4		1		1/1/0	1/1/0
Кос	33/41 (80,5)	18 (43,9)	241	53/21/8 (15,1) 8/21 (38)	188/32/14 (7,4) 14/32 (44)	241/53/22 (9,1) 22/53 (41,5)
Голям синигер	9/82 (11)		16	9/7/0	7/4/0	16/11/0
Поен дрозд	3/4	1	25	1/1/0	24/3/1 (4,2) 1/3	25/4/1 (4) 1/4
Сойка	1/7		1		1/1/0	1/1/0
ОБЩО	49/156	19	288	*66/30/8 (12,1) **8/30 (26,6)	222/42/15 (6,8) 15/42 (35,7)	288/72/23 (8) 23/72 (32)

*Брой кърлежи /брой изследвани пулове/брой положителни пулове (минимална заразеност на кърлежите в %)

**Положителни пулове (%)

Сравнението на инфекцията при ларвите от кос между май – юли на 2021 и май – юли на 2022 г. показва значителна разлика. През първата година бяха заразени 7,7% (3/39) от ларвите и всички бяха открити върху птици с положителни нимфи. През втората година бяха заразени 35,7% (5/14), което беше значително по-високо, $p\text{-value} < 0,05$. Три от положителните ларви през 2022 г. бяха от птици с отрицателни нимфи, една от птица с положителни нимфи и една положителна ларва беше единствен кърлеж върху изследваната птица. В същото време между инфекцията при нимфите през двете години нямаше значителна разлика: 8,9% (11/124) през 2021 и 4,7% (3/64) през 2022 г., $p\text{-value} = 0,301$.

На Таблица 7 са представени данните от 2020 – 2022 г., които имат отношение към резервоарния статус на *T. merula* в двата района. Процентните изчисления за птиците с инфектирани кърлежи в София и на Калимок са направени спрямо броя опаразитени индивиди. Статистически сравнения между отделните показатели в двата района не бяха правени, поради различния начин и време на улов на птиците. Целта беше да се оцени потенциала на *T. merula* само в рамките на отделните райони.

Таблица 7. Епидемиологични показатели свързани с резервоарната функция на *T. merula*

Място на изследване	Опаразитени птици	Среден интензитет	Птици с инфектирани кърлежи	Птици с инфектирани нимфи	Птици с инфектирани ларви
София	80,5 % (33/41)	7,3 (241/33)	54,5% (18/33)	42,4% (14/33)	24,2% (8/33)
Калимок	47,8% (11/23)	3,2 (35/11)	36,4% (4/11)	18,2% (2/11)	18,2% (2/11)

ОБСЪЖДАНЕ

С оглед на това, че София е урбанизирана територия, ролята на птиците като гостоприемници на кърлежи и преносители на патогени, може да представлява съществен риск за общественото здраве. Градските паркове освен това, не са обичайно място за голямо разнообразие от диви бозайници, които биха могли да конкурират птиците в качеството им на гостоприемници. Според скорошно изследване големите столични паркове са сред местата, където човек често е изложен на опасност от заразени кърлежи *I. ricinus* [29]. Твърде вероятно е *T. merula* да е един от източниците на

заразяване, базирайки се на установената от нас значително по-висока стойност (15,1%) на инфектираните ларви от кос спрямо тази при гладните ларви, (3,33%), p -value < 0,05, установена при други проучвания в София [3].

В два последователни сезона, в едно и също местообитание, установихме, че заразяването при ларвите може да се променя значително. Причина за това може да бъде разлика в инфекциозността на нимфите, с които са били опаразитени косовете по времето, когато и с ларвите, ако допуснем съвместно заразяване през кръвоносните съдове на кожата. Между инфекцията при нимфите обаче нямаше статистическа разлика, поради което можем да предположим, че съвместното хранене не беше изиграло значение. Освен това през 2022 г. от пет заразени ларви, четири не бяха имали контакт със заразени нимфи при прегледа на птиците. Има вероятност ларвите да са се заразили от нимфи, които са били близко разположени, но вече са се отпуснали от тялото на птицата, а борелиите от тях са се задържали известно време в повърхностните кръвоносни съдове. Другият механизъм, който допускаме, е чрез директно заразяване от косовете чрез системна инфекция, която се е развила при по-ранно ухапване на птиците от инфекциозни нимфи. Експериментални изследвания за род *Turdus* показват, че спирохетемията продължава поне три седмици [14]. В изследваните от нас кръвни проби обаче, не успяхме да открием активна инфекция при нито един от косовете. При анализа върху вариацията на заразените ларви отчитаме факта, че и трансвариално предаване може да е различно застъпено през годините и това също да влияе върху разпространението на *B. burgdorferi* [3].

Стойностите на епидемиологичните показатели определиха резервоарния принос на коса в София като силно изразен. При високите опаразитеност и среден интензитет, които установихме, една голяма част от птиците носеха инфектирани нимфи (Таблица 7). Това потвърди, че при коса се наблюдава условието за резервоарен гръбначен гостоприемник – да бъде опаразитяван от заразни нимфи, които да поддържат инфекциозното му състояние и да го правят способен да заразява ларви. Резултатите от изследвания период показаха, че модел, при който малко над 40% от опаразитените косове имат контакт с инфектирани нимфи, може да осигури резервоарна компетентност на над 20% от опаразитените косове или да създаде условия за заразяване на ларви от нимфи при съвместно хранене. Подобно съотношение е сравнимо с данните от гористи местности в Централна Европа, където косовете с инфектирани нимфи са 76,9%, а тези с инфектирани ларви 50% [12].

В София заразените ларви и нимфи от кос бяха събрани през май – юли, когато е размножителния период на птиците. Размножаващите се у нас косове, тук и зимуват, т.е това са местни птици [10]. Затова предполагаме, че изчисленията ни към по-горния модел се отнасят за популация от местни индивиди, които биват постоянно, или поне често, опаразитявани в изследваното местообитание през активния сезон на кърлежите. Честият контакт със заразни вектори е необходимо условие за подсилване и поддържане на спирохетемията при гръбначните животни. Освен това в годините с по-меки зимни климатични условия, не е изключено възможностите за контакт да бъдат удължени във времето.

Към характеристиката на резервоарната функция е необходимо да се добавят и данните за плътността на конкретния гостоприемник в местообитанията на кърлежите, което е важен показател за оценката на реалния риск. Към момента на нашето изследване не разполагаме с актуални данни за плътността на *T. merula* в София. Според последни сведения, през 80-те години на миналия век при територия 181 km², популацията е възлижала на 2000 двойки [30]. Ако вземем предвид този брой и нашите данни, според които на 41 птици се падат 22 инфектирани кърлежи (Таблица № 6), то цялата популация на *T. merula* би могла да разнесе локално над 2000 напитки и заразни ларви и нимфи *I. ricinus*. На свой ред, след линееето, една неопределена част от тях ще се развият в гладни и заразни нимфи и имаго, склонни да се хранят от нови гостоприемници, включително и хора.

Това, че на Калимок открихме по-малък брой косове с инфектирани кърлежи (Таблица 7), се дължи на по-малкото изследвани индивиди и по-ниската опаразитеност при тях, в сравнение със София. Липсата на достатъчно широколистни гори, осигуряващи влажност на земната повърхност чрез листната маса, прави мястото на Калимок по-малко подходящо за развитие на *I. ricinus* от градския парк в София. Като площ горските екосистеми на Калимок се нареждат след обработваемите земи и крайбрежната растителност [31], а в Борисовата градина над 70% от залесената площ е представена от широколистни високостеблени гори [32]. Допълнително, за задържане на влажността в столичния парк допринасят почвопокривни видове като обикновен бръшлян (*Hedera helix*, L.) и винка (*Vinca major*, L.). По-малкото гори на Калимок са сред причините да хванем и по-малко косове. Така данните от това проучване ясно показаха, че взаимоотношенията в системата *T. merula* – *I. ricinus* – *B. burgdorferi*, пряко се влияят от условията на околната среда.

След коса, пойният дрозд беше другият вид, който даде сигурен признак, че може да разпространява инфектирани кърлежи в София. Слабото му опаразитяване с ларви обаче, не позволи да установим дали може да ги заразява.

3. Проучване на разпространението на *B. burgdorferi* s.l. сред гладни кърлежи *I. ricinus* от София (столица) и Силистренска област.

За да установим до каква степен заразеността при кърлежите от птици допринася към заразеността на гладните кърлежи, съпоставихме размера на инфекцията при кърлежите от кос и гладните кърлежи събрани от и около местата на улов на птиците. Изследвани за заразеност бяха 274 гладни кърлежи *I. ricinus* (Таблица 8).

Таблица 8. Брой (%) кърлежи заразени с *B. burgdorferi* s.l.

Място на изследване	Женски	Мъжки	Имаго	Нимфи	Общо кърлежи
София	1/18 (5,5)	2/12 (16,7)	3/30 (10)	10/95 (10,5)	13/125 (10,4)
Калимок	4/22 (18,2)	0/14	4/36 (11,1)	12/113 (10,6)	16/149 (10,7)
ОБЩО	5/40 (12,5)	2/26 (7,7)	7/66 (10,6)	22/208 (10,6)	29/274 (10,6)

Общо в двата района, разпространението на инфекцията при кърлежите от кос (9,4%) и гладните кърлежи (10,6%), не се различаваше съществено, $p\text{-value} > 0,05$. Сравнението между отделните стадии според протичането на метаморфозата показва, че при напитите ларви инфекцията (13,3%) беше по-висока от при гладните нимфи (10,6%), а при напитите нимфи инфекцията (8%) беше незначително по-ниска от тази при гладните имаго (10,6%), $p\text{-value} > 0,05$.

ОБСЪЖДАНЕ

Това, че процентът на инфекцията при кърлежите (ларви и нимфи) от кос беше близък или по-висок от този при гладните кърлежи (нимфи и имаго), подчертава епидемиологичната роля на *T. merula*. Установено е, че при линееенето на заразените напитки ларви, броят на борелиите в червото им драстично намалява [33]. При храненето обаче на излюпените от тях млади нимфи върху следващ гостоприемник, борелиите усещат благоприятни физикохимични стимули за размножаване и броят им експоненциално нараства. Така веднъж заразени, ларвите имат способността да предават трансстадиално инфекцията и да поддържат трансмисията ѝ в природата. Според нашите

резултати, птиците явно допринасят за заразяването на ларвите, а чрез тях и на гладните нимфи, които от своя страна са склонни да паразитират върху широк кръг гостоприемници. Допълнително значение на коса към разпространението на ЛБ е това, че заразеността при напитите нимфи представляваше повече от половината от инфекцията при гладните имаго. Счита се, че след нимфите, имагото са втори по значение за предаването на болестта към хората [34].

Силистренска област

От района на Калимок и селата Бръшлен, Нова Черна, Дунавец и Старо село, бяха изследвани 149 кърлежи *I. ricinus* (Таблица 8). Част от тях бяха доставени до лаборатория МАЗДД чрез съдействието на Регионална здравна инспекция – Силистра.

Средната инфекция при кърлежите от кос (11,4%) беше по-висока от при гладните кърлежи (10,7%). Заразените напитки ларви (9,1%) бяха незначително по-малко от гладните нимфи (10,6%), (p -value > 0,05), а заразените напитки нимфи (15,4%) бяха повече от заразеното гладно имаго (11,1%).

ОБСЪЖДАНЕ

Анализът на резултатите показва, че въпреки по-ниското ниво на опаразитеност сред косовите на Калимок, носителството на *B. burgdorferi* при напитите от тях кърлежи представлява рисков фактор. Според стойностите на заразеност при напитите ларви и гладните нимфи – от една страна, и при напитите нимфи и гладните имаго – от друга, инфектирането на нови гръбначни видове в района може да се дължи до голяма степен на кърлежи, паразитирали по *T. merula*. Относно засягането при хората, по данни на РЗИ Силистра, в областта се регистрират годишно по 5 случая на заболели от ЛБ [35].

София (столица)

В Борисовата градина, около местата на орнитологичните мрежи, бяха събрани 125 кърлежи *I. ricinus* (Таблица 8).

Проверката за статистическа разлика между заразеността при кърлежите от кос (9,1%) и гладните кърлежи (10,4%) не посочи значима такава, p -value > 0,05. Съпоставянето на отделните стадии показва, че инфекцията при напитите ларви (15,1%) е по-висока от тази при гладните нимфи (10,5%), а при напитите нимфи (7,4%) е незначително по-ниска от спрямо тази при гладните имаго (10%), p -value > 0,05.

ОБСЪЖДАНЕ

Според нашите данни е напълно възможно наличието на *B. burgdorferi* при гладните нимфи в Борисова градина, да се дължи на ларви инфектирани от косове, освен на ларви инфектирани от гризачи. Изследвания на ларви и/или кръв от гризачи не намерихме в литературата за София, но *B. burgdorferi* е доказана при черен плъх и домашна мишка от съседната Пернишка област, както и антитела срещу причинителя [3]. Това предполага, че двата синантропни вида гризачи имат инфекциозна способност към ларви *I. ricinus*. Независимо от източника на заразяване на ларвите, епидемиологичното значение на гладните нимфи като преносители на ЛБ е съществено и се потвърждава от проучвания за София, обхващащи периода 2016 – 2021 г. [29]. Една значителна част от гладните инфектирани имаго, също може да са се развили от нимфи заразени или само разпространени, от *T. merula*.

Това, че движенията на птиците са извън ветеринарен или друг контрол, дератизациите на открити площи са силно ограничени, и в същото време градските паркове са често посещавани от хора през активния сезон на кърлежите, създава риск за възприемчивото население. От гледна точка на предпазването от ЛБ, провеждането на деакаризации и използването на индивидуални средства за защита, остават най-практичните мерки срещу инфекцията.

4. Проучване на разпространението на *B. burgdorferi* s.l. сред диви птици чрез изследване на кръвни проби

4.1. Резултати от изследване с ELISA метод

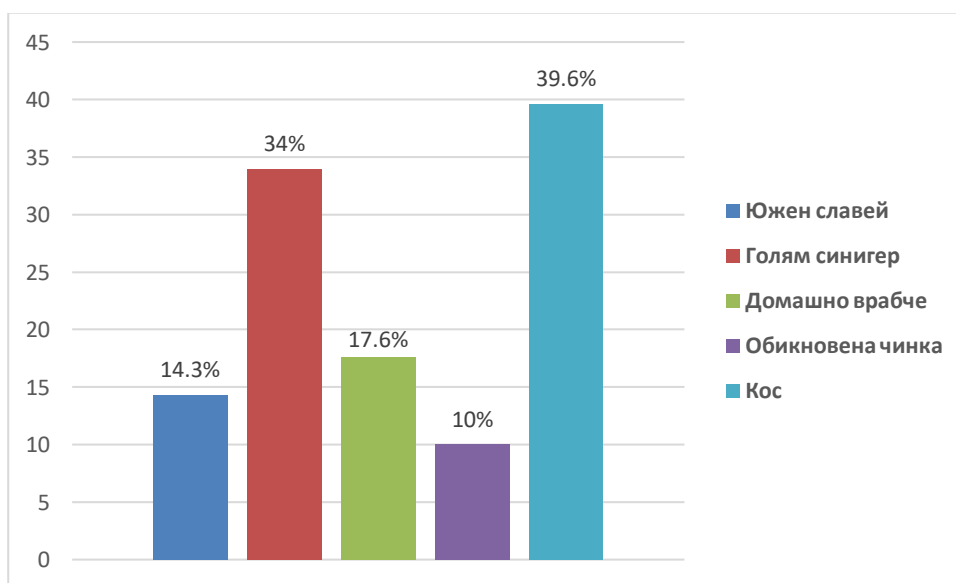
Тествани бяха 383 серумни проби от 34 вида птици. Специфични антитела бяха открити при 22,5% (86/383) проби на 17 вида птици (Таблица 9).

Таблица 9. Видове птици изследвани за IgG антитела срещу *B. burgdorferi*, БЕБ „Калимок“ – Борисова градина, 2021 – 2022 г.

Вид птица	Брой изследвани проби	Брой (+) проби срещу <i>B. burgdorferi</i>
Южен славей	21	3
Голям синигер	94	32
Тръстиково шаварче	7	2
Домашно врабче	34	6
Обикновена чинка	20	2
Авлига	6	2
Червеногърба сврачка	3	1
Черночела сврачка	3	1

Обикновен скорец	19	2
Кос	53	21
Градска лястовица	12	5
Голямо белогушо коприварче	1	
Селска лястовица	3	
Полско врабче	15	
Голям пъстър кълвач	5	
Сива овесарка	1	
Малко белогушо коприварче	3	
Голямо черноглаво коприварче	6	
Испанско врабче	1	
Жълта стърчиопашка	1	
Син синигер	14	2
Зеленика	4	
Среден пъстър кълвач	1	
Щиглец	2	
Домашна червеноопашка	1	1
Тръстикова овесарка	1	
Червеногръдка	26	
Сивогуша завирушка	4	1
Поен дрозд	7	3
Планинска чинка	2	
Горска зидарка	7	1
Сойка	2	1
Зелен кълвач	2	
Горска дърволазка	2	
ОБЩО	383	86 (22,5%)

Процентни изчисления в рамките на вида бяха направени за пет вида с минимум 20 събрани проби. Косът беше с най-висока серопревалентност (39,6%), следван от голям синигер (34%). Разликата между двата вида беше незначителна, $p\text{-value} > 0,05$ (Фиг. 8).



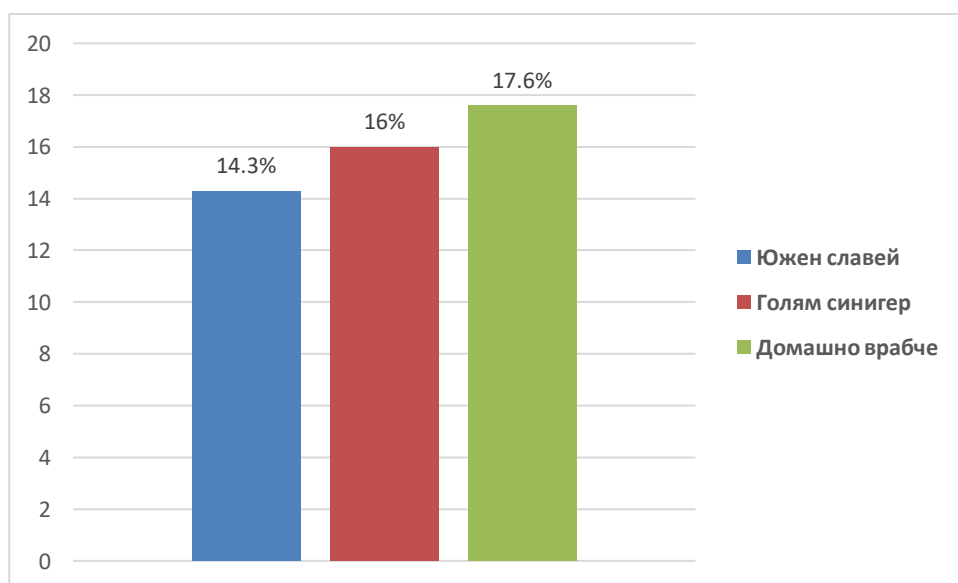
Фиг. 8. Серопревалентност (%) при по-често тестваните видове птици

ОБСЪЖДАНЕ

Серологичното доказване на *B. burgdorferi s.l* се посочва като алтернативен подход за определяне на резервоарната функция на гостоприемниците [36]. От всички видове птици, косът покриваше най-много от критериите за резервоар. Данните показваха, че бива опаразитяван от заразени ларви и нимфи *I. ricinus* и е възможно борелиите да преживяват определено време, съдейки по появата на имунен отговор. Липсата на доказана активна инфекция в кръвта обаче (точка 4.2.), не позволява да изразим сигурно становище относно развитието на спирохетемия и способността на косовете директно да заразяват кърлежите. Серологичните резултати, които получихме за голям синигер, обикновена чинка и южен славей, подсилват вероятността тези видове да участват в разпространението на ЛБ. И при трите беше наблюдавана опаразитеност, макар и без откриване на инфектирани кърлежи. Сравнително високият процент антитела при домашното врабче е основание да се проучи значението на този вид за циркулацията на ЛБ на Калимок, откъдето бяха всички уловени индивиди.

Силистренска област

От общо 228 изследвани проби от 30 вида птици, серологичното присъствие на *B. burgdorferi s.l.* беше потвърдено при 17,1% (39/228) проби на 13 вида птици. С най-висока серопревалентност бяха домашното врабче (*Passer domesticus*) – 17,6% (6/34) и големият синигер – 16% (4/25), без статистическа разлика помежду им, $p\text{-value} > 0,05$ (Фиг. 9).



Фиг. 9. Серопревалентност (%) при по-често тестваните видове птици на Калимок

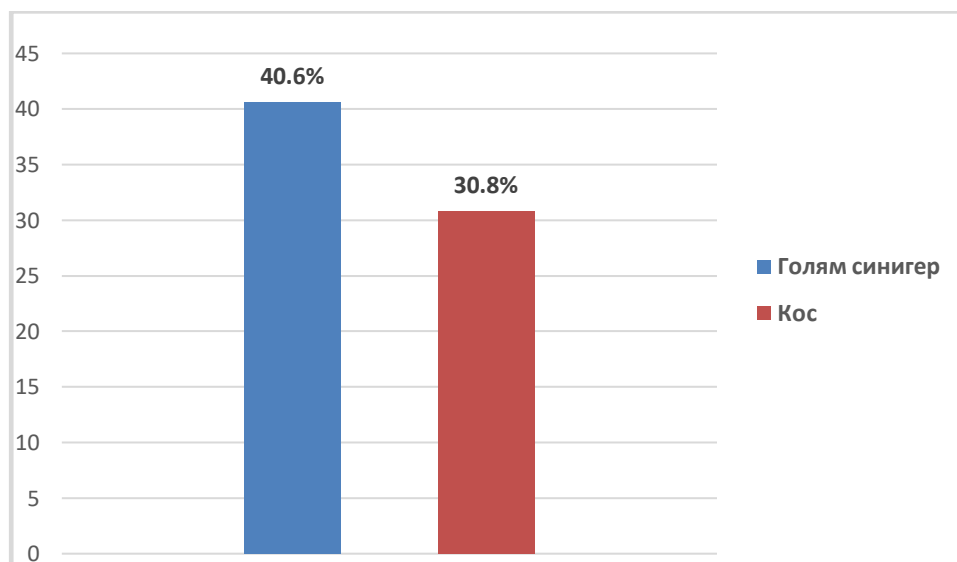
ОБСЪЖДАНЕ

Върху домашното врабче на Калимок не бяха открити кърлежи при нито един индивид от общо прегледаните 132 (2010 г., 2019 – 2022 г.), но вероятно този вид също е гостоприемник на заразени *I. ricinus*, съдейки по положителните серуми. Други автори съобщават за паразитиране на ларви и нимфи *I. ricinus* по домашни врабчета в Нидерландия [37]. Откриването на специфични антитела при южния славей не беше неочаквано. Нашите данни показаха, че бива опаразитяван, а проучвания в Германия доказват *B. burgdorferi s.l.* в кръв и ларви от южен славей [38].

Поради недостатъчния брой проби, косят не беше включен в статистическите изчисления на резултатите от ELISA, но наличието на 9 положителни серума от общо 14 изследвани, и на положителни ларви и нимфи показва, че явно участва в циркулирането на *B. burgdorferi s.l.* в тази част от страната.

София (столица)

От 155 изследвани серума на 12 вида птици, специфични антитела открихме в 30,3% (47/155), събрани от 7 вида птици. На ниво вид, серопревалентността беше най-висока при голям синигер и кос, с незначителна разлика помежду им, $p\text{-value} > 0,05$ (Фиг. 10).



Фиг. 10. Серопревалентност (%) при по-често тестваните видове птици в „Борисова градина“

ОБСЪЖДАНЕ

Двата вида птици, най-уязвими към ухапване от *I. ricinus*, имаха и най-висока серопревалентност към причинителя на ЛБ. Независимо че разликата в стойностите не беше значителна, в случая допускаме, че тя може да се дължи на по-големия брой изследвани проби от голям синигер. Иначе този вид беше значително по-слабо опаразитен от коса и логично беше да има по-малко имунни птици. Възможно е също косът да има по-слаба имунна защита към борелиите от синигера, да се стига до развитие на спирохетемия в кръвта му и точно затова да успява да заразява кърлежи.

4.2. Резултати от изследване с PCR метод

За откриване на ДНК на *B. burgdorferi* s.l. бяха изследвани 299 кръвни проби:

- 105 проби от 22 вида, събрани на Калимок през 2022 г. и
- 194 проби от 15 вида, събрани в София през 2020-2022 г.

Резултатите от всички проби бяха отрицателни.

ОБСЪЖДАНЕ

Важно допълнение към серологичното изследване, е доказването на самия причинител на ЛБ в тъкани от птици. Стандартизиран или готов търговски тест за откриване на *B. burgdorferi* при птици не е наличен.

Счита се, че предпочитано място за *B. garinii*, която е най-често свързвана с птиците, е кожата [39]. Температурата там е по-ниска от тази във вътрешността на тялото и това е благоприятно за развитието на бактериите. *Borrelia garinii* е изолирана и доказана в кожни аспирати и биопсии от кос и поен дрозд [40]. Според португалски автори този вид борелия може да преживее в кръвен серум от *T. merula* без да се унищожава от системата на комплемента на птицата, а *B. afzelii* оцелява в серум от голям синигер [41]. В подкрепа на това са резултатите от проучвания в Полша [42], при които *B. burgdorferi* s.l. е открита с PCR в кръвта на 9 вида птици, включително *T. merula*, и при южен славей в Германия [38].

5. Проучване на разпространението на вируса Западен Нил сред диви птици чрез изследване на кръвни проби

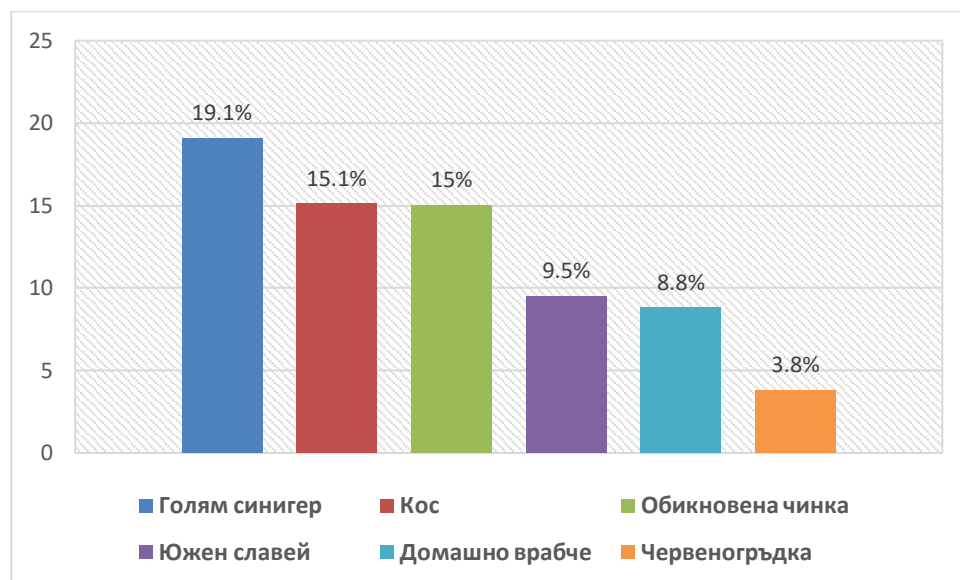
5.1. Резултати от изследване с ELISA метод

Общо 383 серумни проби от 34 вида птици, бяха тествани за наличие на антитела срещу вируса на ЗНТ (Таблица 10). Положителни бяха 54 (14,1%) проби от 19 вида. Така, серопревалентността при птиците за двете инфекции се оказа значително по-висока за ЛБ (22,5%), отколкото за ЗНТ, $p\text{-value} < 0,05$.

Таблица 10. Видове птици изследвани за IgG антитела срещу WNV, БЕБ „Калимок“ – Борисова градина, 2021 – 2022 г.

Вид птица	Брой изследвани проби	Брой (+) проби срещу WNV
Южен славей	21	2
Голям синигер	94	18
Тръстиково шаварче	7	1
Домашно врабче	34	3
Обикновена чинка	20	3
Авлига	6	2
Червеногърба сврачка	3	
Черночела сврачка	3	1
Обикновен скорец	19	1
Кос	53	8
Градска лястовица	12	2
Голямо белогушо коприварче	1	1
Селска лястовица	3	1
Полско врабче	15	4
Голям пъстър кълвач	5	
Сива овесарка	1	
Малко белогушо коприварче	3	
Голямо черноглаво коприварче	6	
Испанско врабче	1	
Жълта стърчиопашка	1	
Син синигер	14	2
Зеленика	4	
Среден пъстър кълвач	1	
Щиглец	2	1
Домашна червеноопашка	1	
Тръстикова овесарка	1	
Червеногърдка	26	1
Сивогуша завирушка	4	1
Поен дрозд	7	1
Планинска чинка	2	
Горска зидарка	7	1
Сойка	2	
Зелен кълвач	2	
Горска дърволазка	2	
ОБЩО	383	54 (14,1%)

От шест вида успяхме да тестваме минимум 20 проби. Най-изразен имуен отговор беше установен при голям синигер (19,1%), кос (15,1%) и обикновена чинка (15%) (Фиг. 11).



Фиг. 11. Серопревалентност (%) за вируса на ЗНТ при по-често тестваните видове птици

От всички 54 положителни проби, 27 (50%) бяха от млади индивиди, а от тях по-голямата част бяха уловени през есента (Таблица 11).

Таблица 11. Серопревалентност за ЗНТ сред млади птици от двата района

Вид птица	Брой млади индивиди с антитела		Брой млади индивиди с антитела уловени през есента	
	София (столица)	Калимок	София (столица)	Калимок
Кос	3			
Голям синигер	11	2	11	2
Син синигер	1	1	1	1
Полско врабче		4		4
Домашно врабче		1		
Обикновена чинка		2		2
Поен дрозд		1		1
Червеногръдка		1		1
ОБЩО	15	12	12	11
	27		23	

ОБСЪЖДАНЕ

Целта на това изследване беше да се установи серологично разпространението на WNV сред дивите птици, като чрез доказване на предишна инфекция при тях се оцени индиректно до каква степен хората са изложени на вируса. С наличието на имуноен отговор при птиците приемаме, че е възможно вирусът да циркулира на територията на страната и съществува реална възможност за заразяване на векторите комари и на хората. Най-често специфични антитела открихме при широко разпространени местни видове (голям синигер и кос) и мигранти на кратки разстояния (обикновена чинка).

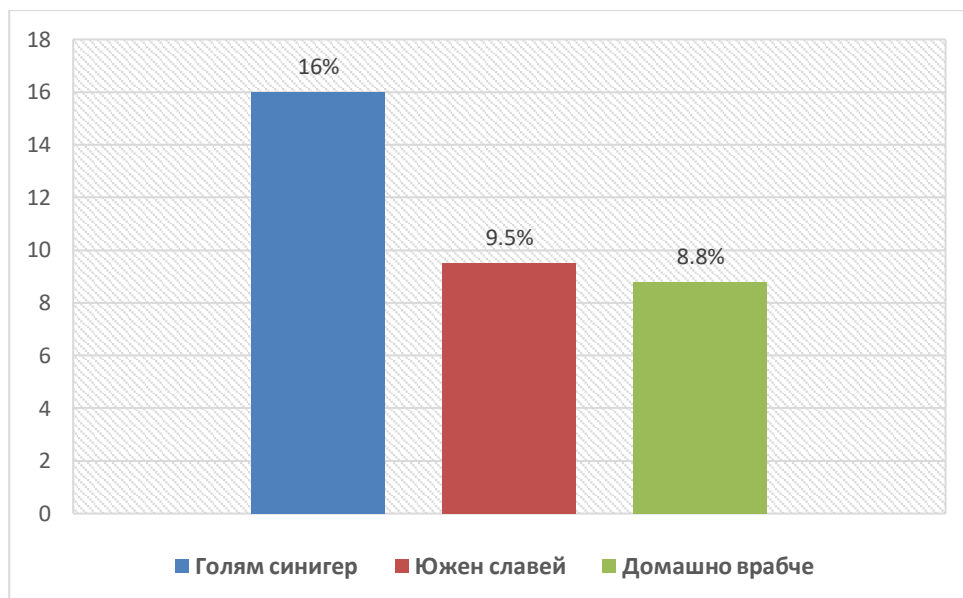
По данни на Европейския център по контрол на заболяванията [43], към ноември на 2022 г. в съседни и близки нам страни са регистрирани най-много случаи – Италия (586), Гърция (284), Румъния (46), а смъртните случаи в тези три страни са общо 73. От страните извън Европейския съюз се съобщава за 226 случая в Сърбия, от които 12 са смъртни. В България след 2018 г., когато бяха регистрирани 15 случая, ежегодният брой на заболелите е малък, а възможна причина за това може да са пропуски в надзора. Многото случаи в съседните страни обаче определят превенцията срещу ЗНТ като приоритет за общественото здраве. В този смисъл, данните за чувствителност при голям синигер, кос и домашно врабче показват, че тези сравнително лесни за улов видове могат да бъдат използвани при сентинелни наблюдения в рискови региони, с цел ранно откриване на WNV и ранно провеждане на превантивни мерки като комуникация с населението, дезинсекции, използване на репеленти.

Антителата, които открихме при млади птици, родени в годината на улова, може да се дължат на прекарана инфекция в същия сезон или да са получени от майката. Известно е обаче, че антителата придобити с раждането, обичайно не престояват повече от няколко седмици в кръвта на птицата [44]. Като се има предвид, че излюпването на птиците е през пролетно-летния сезон, то по-вероятно е серопозитивните птици от есента да са загубили вече вродения имунитет, а наличните антитела да са вследствие на контакт с вируса. Това от своя страна показва, че вероятно в същия сезон инфекцията се е предавала между птиците и комарите. Тъй като обаче серологичните находки са непряко доказателство, нашите резултатите трябва да бъдат тълкувани внимателно относно местната циркулация на WNV.

Силистренска област

Изследвани бяха 228 проби от 30 вида птици. Специфични IgG, установихме при 30 (13,2%) проби от 17 вида.

Най-висока серопревалентност в рамките на вида беше наблюдавана при голям синигер (16%), последван от южен славей и домашно врабче (Фиг. 12).



Фиг. 12. Серопревалентност (%) при по-често тестваните видове птици на Калимок

ОБСЪЖДАНЕ

Получените данни показаха доказателства за минали експозиции с WNV и при местни, и при мигриращи видове птици. Като имаме предвид произхода на инфекцията [45], можем да предположим, че зимуващият в Африка южен славей представлява определен риск за вноса на инфекцията, особено ако поддържа висок и продължителен вiremичен титър. Експериментално американско изследване върху 25 вида птици (южният славей не е в списъка) показва, че трайността на вiremията е от 1,3 до 6 дни [46]. При гугутките (*Streptopelia decaocto*) е установено, че пикът в размножаването на вируса настъпва на втория ден след заразяването на птиците, след което бързо спада и към 4-ти и 5-ти ден вiremията е неоткриваема [47]. Ако приемем, че и при южния славей вiremията е около седмица, а от друга страна е известно, че времето, за което пристига от юг е между 30 – 36 дни [48], то вероятността птиците да дойдат вiremични не е голяма. В случай все пак на контакт между вiremични южни славеи и видове комари, активни на пролет, може да се осъществи предаването на вируса и в по-нататъшното му поддържане да се включат и местни птици.

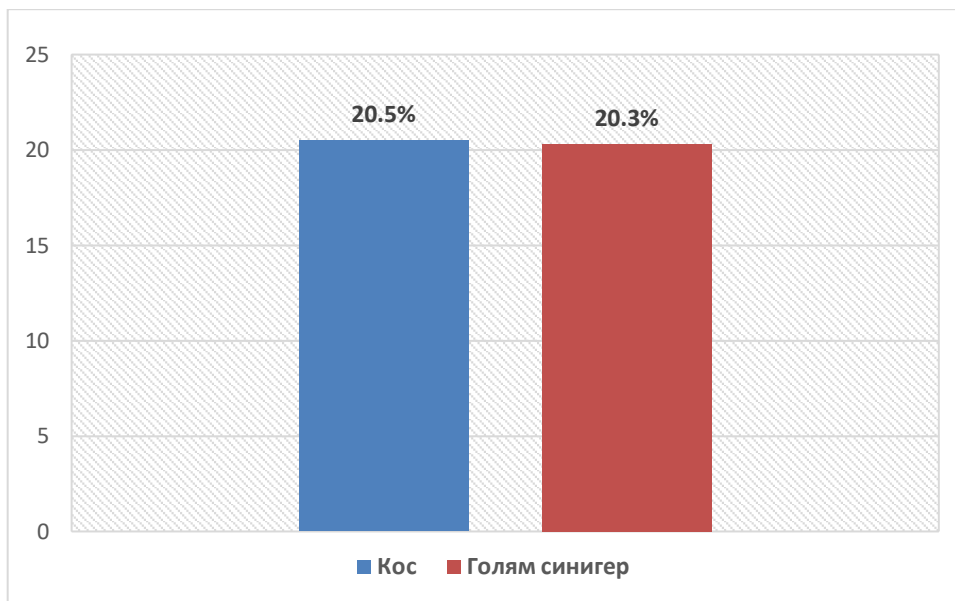
Заразяването на птиците у нас не е изключено да се случва и чрез комари, в чието тяло WNV съществува от предната година. През 2003 г. в САЩ, вирусът е доказан в оплодени презимували женски *Culex pipiens pipiens* L., уловени между януари – март месец. Това са комари, които все още не са са пили кръв и най-вероятно са добили вируса трансвариално [49]. Първото потвърждение, че WNV се запазва в комарите през зимата в Европа, е от Чехия [50], където е доказана РНК на WNV Lineage 2 при *C. pipiens*.

Заразяването на птиците с WNV чрез кърлежи не е добре проучено. За *I. ricinus* е установено експериментално, че може да се заразява с вируса, докато се храни върху инфектирани мишки, но не може да го предава на следващ гостоприемник [51]. Кърлежите *Ornithodoros moubata* могат да запазват вируса поне 132 дни, но за да успеят да заразят пилета са необходими минимум 49 инфектирани кърлежи върху птица. Според авторите това прави кърлежите далеч по-неефективни вектори от комарите.

Откриването на заразени комари в района на Русе [8], на антитела при коне [52] и хора [7] в Силистренско и Русенско, както и нашите резултати за серопозитивни птици предполагат, че WNV циркулира в тази част от страната. Изследвания върху гугутки и скални гълъби показват, че веднъж придобили имунитет, птиците го притежават дългосрочно или за цял живот, което ги прави вече некомпетентни резервоари [47]. Дори тези имунни индивиди се конкурират с младите чувствителни индивиди като източник на храна на комарите и по този начин намаляват вероятността векторите да заразят младите птици и те да станат вiremични. Вероятно видовете имунни птици от нашето изследване също са резервоари само до момента, в който развият антитела. Това до известна степен може да се компенсира с по-широкото им разпространение, особено на големия синигер и домашното врабче, с наличието на неимунни млади индивиди и с влажната зона, подходяща за развитие на векторите-комари.

София (столица)

От 155 изследвани проби на 12 вида птици, положителни резултати бяха открити при 15,5% (24/155) от пробите, събрани от 4 вида. Най-много индивиди с антитела срещу WNV имаше при голям синигер и кос имаше (Фиг. 13).



Фиг. 13. Серопревалентност (%) при по-често тестваните видове птици в „Борисова градина“

ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от нашето изследване свързаха циркулацията на ЗНТ в София с местни видове птици. Серологичните данни за кос и голям синигер биха могли да послужат ефективно при прогнозиране на WNV трансмисията в урбанизиран район, тъй като тези птици отговарят на някои от изискванията за надеждни индикаторни видове: да имат широко разпространение, близка връзка с хората, поведение, което улеснява улавянето им, да изграждат антитела след заразяване, да бъдат немигриращи [53]. Предполагаме, че в годината на излюпването, макар и за кратко, младите косове и синигери играят роля на гостоприемници, в които вирусът се размножава [54]. За София (столица) към момента няма данни за нивото на серопревалентия при хората, но за съседната Софийска област се съобщава за 10% [7].

5.2. Резултати от изследване с PCR метод

Изследвани бяха общо 295 кръвни проби:

- 101 проби от 21 вида птици уловени през юни 2022 г. на Калимок и
- 194 проби от 15 вида птици в София.

При нито една от пробите не успяхме да докажем нуклеиновата киселина на WNV.

ОБСЪЖДАНЕ

Макар да нямаме категорично обяснение за отрицателните резултати от PCR теста, като основни причини считаме данните за кратката виремия при птиците, малките количества кръв при някои от нашите проби и това, че в изследването участваха видимо здрави птици. Вероятно видовете в обсега на нашето проучване изграждат добра имунна защита чрез антителата, които установихме и успяват да преживеят изложението към вируса. Известно е, че WNV рядко причинява заболяване с ясно изявена клиника при птици в Стария свят [55]. В същото време се предполага, че болните или умиращи гостоприемници носят по-висок вирусен товар и при тях е по-вероятно да се открие вируса, отколкото при тези, които оцеляват [56]. Молекулярен анализ на 1902 кръвни проби в Германия (2014 – 2016 г.) също завършва без откриване на WNV, включително и при болни птици [57]. Няколко години по-късно, вирусът е намерен в органични проби от умрели косове и един голям ястреб (*Accipiter gentilis*) [58]. Положителни резултати от полимеразно-верижна реакция има и при тъканни проби от птичи трупове в Израел – РНК на вируса е доказана при жълта чайка, фазан, сови и врани [59].

Въз основа на получените резултати можем да приемем, че настоящият риск от разпространение на ЗНТ у нас не е висок. Въпреки това, дори и при неустановена от нас активна инфекция, не можем да заключим категорично, че предаването на вируса не се е случило по време на проучването, особено поради наличието на антитела при млади птици през есента. Затова, постоянното наблюдение върху определени видове чрез серологични или при подходящи случаи чрез молекулярни изследвания, е препоръчително.

ИЗВОДИ

1. В два географски отдалечени района на България, област Силистра и област София (столица), *Ixodes ricinus* се установи като най-често срещан и доминиращ вид кърлеж (92%) по дивите птици, с висок интензитет на опаразитяване. Разпространението му е по-характерно сред птиците в София (столица) (25,8%). По-рядко по птиците паразитират *Hyalomma marginatum*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis sulcata* и *Haemaphysalis punctata*, и то само в Силистренска област.
2. Нимфите *Ixodes ricinus* (79,7%) се откриват значително по-често по птиците от двата района, в сравнение с ларвите (19,8%).
3. Косът (*Turdus merula*) се открие като най-често и интензивно опаразитяван с *Ixodes ricinus* и в двата района. Други видове гостоприемници, които допринасят за поддържането и разпространението на предимагиналните *Ixodes ricinus* са обикновената чинка (*Fringilla coelebs*), пойният дрозд (*Turdus philomelos*) и южният славей (*Luscinia megarhynchos*).
4. Заразеност с *Borrelia burgdorferi* се среща при кърлежи *Ixodes ricinus* от три вида дроздови птици – кос, поен дрозд и червеногръдка (*Erithacus rubecula*).
5. Установените високи стойности на епидемиологичните показатели (индексите на доминиране, срещаемост и интензитет), както и откриването на заразени ларви *Ixodes ricinus*, определиха *Turdus merula* като евентуален резервоар на Лаймска борелиоза в проучваните райони, особено в София (столица).
6. Напитите и заразени ларви и нимфи, свалени от *Turdus merula*, допринасят за повишаване на числеността на гладните и заразени нимфи и имаго в изследваните райони.
7. Косвено доказателство, подкрепящо участието на *Turdus merula* в трансмисията на Лаймската болест, е и откриването на антитела при птици от двата района.
8. Серологично вирусът на Западнонилска треска се установи в най-голяма степен при кос, голям синигер (*Parus major*) и обикновена чинка. Откриването на имунитет при млади птици, в годината на излюпването им, може да е показателно за съществуваща циркулация на WNV между птиците и комарите през същия сезон.
9. Големият синигер и домашното врабче са подходящи да се ползват като сентинелни видове за ранно откриване на WNV в Силистренска област, а в София (столица) – големият синигер и косът.
10. Антитяло отговорът срещу причинителя на Лаймската болест при птиците беше значително по-често срещан (22,5%), отколкото антитяло отговора срещу вируса на Западен Нил (14,1%).

ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. Проведено е първото в страната целенасочено проучване върху ролята на дивите птици в разпространението на най-често предаваната с кърлежи трансмисивна инфекция в Европа – Лаймска болест.
2. За пръв път у нас векторът на Лаймска болест е доказан като доминантен вид кърлеж по дивите птици.
3. За пръв път у нас е доказана *B. burgdorferi* s.l. при ларви *I. ricinus* паразитиращи по диви птици, с което се разширяват познанията върху способността на птиците да заразяват кърлежите или да служат като среда за заразяването им.
4. Сравнението между степента на заразеност с *B. burgdorferi* s.l. при кърлежите от птици и гладните кърлежи допринася за разбирането на епидемиологията на Лаймската болест на местно ниво.
5. За пръв път у нас е проведено насочено проучване върху над 300 индивида диви птици за установяване на ролята им в разпространението на болестта ЗНТ.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е връзката между степента на опаразитеност при птиците и тяхната екология и поведение.
2. Потвърдено е по-честото паразитиране на нимфите *I. ricinus* при птиците спрямо ларвите.
3. Потвърдена е на локално ниво способността на някои видове дроздови птици да заразяват ларви *I. ricinus*.
4. Потвърдена е серологично циркулацията на WNV сред дивите птици в страната.

Приноси с научно-приложен характер

1. С резултатите от серологичното проучване са определени видове птици подходящи за използване като сентинелни животни при провеждане на надзор на Западнонилска треска в два рискови района от страната.

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. Trifonova I, Christova I, **Ivanova-Aleksandrova N.** *et al.* Survey of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and West Nile fever virus in wild birds in Bulgaria. *Biologia* (2022). **IF 1.653**
2. **Ivanova-Aleksandrova N.** The role of birds in the transmission of Lyme disease. *Probl. Infect. Parasit. Dis.* 2020; 48(3): 36-42.
3. **N. Ivanova-Aleksandrova**, I. Christova I, D. Dimitrov, M.P. Marinov, E. Panayotova, I. Trifonova, E. Taseva, T. Gladnishka, G. Kamenov, M. Ilieva, P. Zehindjiev. Records of ixodid ticks on wild birds in Bulgaria. *Probl. Infect. Parasit. Dis.* 2021; 49(2):35-39.

Участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд

1. **Н. Миткова**, И. Трифонова, И. Христова, Е. Панайотова, Е. Тасева, Т. Гладнишка, В. Иванова, Г. Каменов, Д. Димитров, М.П. Маринов, П. Зехтинджиев. *Лабораторни изследвания върху кръв и кърлежи събрани от птици.* 19-ти Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, 14-16 септември 2021 г., гр. София.
2. И. Трифонова, **Н. Иванова-Александрова**, И. Христова, Т. Гладнишка, В. Иванова, Е. Панайотова, Е. Тасева, Д. Димитров, М. Маринов, М. Илиева, Г. Каменов, П. Зехтинджиев. *Серологично проучване при птици за наличие на IGG (igy) антитела срещу причинителите на Лаймска болест и Западно-нилска треска.* 19-ти Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, 14-16 септември 2021 г., гр. София.
3. **Н. Миткова**, И. Трифонова, И. Христова, Д. Димитров, М. Маринов, Е. Панайотова, Е. Тасева, Т. Гладнишка, В. Иванова, Г. Каменов, П. Зехтинджиев. *Молекулярно – генетични изследвания на кърлежи събрани от птици.* 20-ти Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, 16-18 септември 2022 г., Пловдив.
4. И. Трифонова, **Н. Миткова**, И. Христова, Д. Димитров, М. Маринов, Т. Гладнишка, В. Иванова, Е. Панайотова, Е. Тасева, Г. Каменов, П. Зехтинджиев. *Серопревалиране на Лаймска борелиоза и Западнонилска треска при птици.* 20-ти Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, 16-18 септември 2022 г., Пловдив.
5. **Н. Миткова**, Д. Димитров, И. Христова, М. П. Маринов, И. Трифонова, Е. Панайотова, Е. Тасева, Т. Гладнишка, В. Иванова, Г. Каменов, П. Зехтинджиев. *Видове иксодови*

кърлежи паразитиращи по диви птици в България. IV Национална конференция по епидемиология. 30.09-1.10 2022, гр. Пловдив.

6. Trifonova, N. **Ivanova-Aleksandrova**, T. Gladnishka, V. Ivanova, E. Panayotova, E. Taseva, D. Dimitrov, M. P. Marinov, M. Ilieva, G. Kamenov, P. Zehtindjiev, I. Christova. *Seroepidemiological survey among wild birds in Bulgaria for presence of specific antibodies against B. burgdorferi s.l.* 16th International conference on Lyme borreliosis and other Tick-borne diseases, ICLB 2022, 04-07 September 2022, Amsterdam, Netherlands.
7. I.Trifonova, I. Christova, N. **Ivanova-Aleksandrova**, T. Gladnishka, V.Ivanova, K. Ngok, E. Panayotova, E. Taseva. *Lyme disease seroprevalence and larvae infestation with B. burgdorferi in Bulgarian songbirds.* 15th International Symposium on Ticks and tick-borne Diseases, 29-31 March 2023, Weimar, Mannheim Germany.

БЛАГОДАРНОСТИ

Поднасям най-искрена благодарност на научния ми ръководител, проф. д-р Ива Христова, за подкрепата и доверието, които ми даде още при избора на темата, за ясните и точни напътствия от началото до самия край на работата, за проявеното внимание и за насърчаването, от което имах нужда.

Изказвам благодарност на колегите от Национална референтна лаборатория по „Кърлежово/векторно преносими инфекции, листерии и лептоспири“, НЦЗПБ, за огромната професионална помощ при изследването на биологичния материал, за готовността им да ми съдействат с полезна литература и за техническите съвети, които ми дадоха при оформлението на дисертационния труд.

Благодаря на колегите от ИБЕИ – БАН, с които заедно проведохме теренната част от изследването. Изключително много са ми помогнали с публикации, специфична орнитологична литература и споделени свои знания. Да работя с тях и да научавам за живота на птиците, за мен като биолог, беше богатство.

Признателна съм на всички мои колеги от отдел „Епидемиология“. Имах възможността да си осъществя начинанието в спокойна работна среда и винаги да има при кого да потърся съвет и обективна преценка. Специални благодарности дължа на д-р Галин Каменов, от който съм получила цялостна подкрепа и съдействие за абсолютно всичко, свързано със завършването на този труд!

Благодаря на всички, които по един или друг начин са ми помогнали!

Дисертационният труд е създаден с финансовата подкрепа получена по проекти:

- № КП-06-Н33/16 от 21.12.2019 г. на тема „ Ролята на мигриращи и местни диви птици като резервоари на векторно-предавани инфекции при хората”, КОНКУРС ЗА ФИНАНСИРАНЕ НА ФУНДАМЕНТАЛНИ НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ – 2019 г.”
- ДН 01/6, 16.12.2016 "Мултидисциплинарно изследване на взаимоотношенията паразит – преносител – гостоприемник на кръвните паразити (Haemosporida) във връзка със защитата на птичите популации", финансиран от ФНИ.
- UTF 254.08.08, UTF 332.12.10, UTF 363.43.10, UTF 400.34.11 "Entwicklung eines Geodatenloggers zur Erforschung der Zugrouten von Singvögeln", финансирани от The Swiss Federal Office for Environment

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Schotthoefer AM, Frost HM. Ecology and Epidemiology of Lyme Borreliosis. Clin Lab Med. 2015; 35(4):723–743.
2. Strnad M, V. Hönig, D. Ružek, L. Grubhoffer, R. O. M. Rego. Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing Ixodes ricinus ticks. Appl. Environ. Microbiol. 2017; 83(15):1-16.
3. Христова И. Проучвания върху етиологичната диагностика и разпространението на предаваните с кърлежи и сродни инфекции в България. Автореферат на дис. НЦЗПБ. София. 2012:20.
4. Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME. Human infections associated with wild birds. J Infect. 2008; 56(2):83-98.
5. Панайотова Е. Проучване разпространението на някои буня- и флави вируси в България. Автореферат на дисертация за присъждане на ОНС „Доктор”. НЦЗПБ, София. 2016:19.
6. https://www.ncipd.org/index.php?option=com_k2&view=item&id=84:epidemiologichen-nadzor-enro&Itemid=1337&lang=bg
7. Christova I, Panayotova E, Tchakarova S, Taseva E, Trifonova I, Gladnishka T. A nationwide seroprevalence screening for West Nile virus and Tick-borne encephalitis virus in the population of Bulgaria. J Med Virol. 2017; 89(10):1875-1878.
8. Christova I, Papa A, Trifonova I, Panayotova E, Pappa S, Mikov O. West Nile virus lineage 2 in humans and mosquitoes in Bulgaria, 2018-2019. J Clin Virol. 2020; 127:104365.
9. Костадинова И, Граматиков М. Орнитологично важни места в България и Натура 2000. БДЗП. София. 2007.
10. Спасов С. На среща с птиците в България. БДЗП. Природозащитна поредица, кн. 17. 2012:194.
11. Gryczyńska A, Kowalec M. Different competence as a Lyme borreliosis causative agent reservoir found in two Thrush species: The blackbird (*Turdus merula*) and the song thrush (*Turdus philomelos*). Vector-borne zoonotic dis. 2019; 19(6):450-452.
12. Taragel'ová V, Koci J, Hanincová K, Kurtenbach K, Derdákóvá M, Ogden NH, Literák I, Kocianová E, Labuda M. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. Appl Environ Microbiol. 2008;74(4):1289-1293.
13. Фауна на България. Иксодови кърлежи. Том 32. Академично издателство „Проф. Марин Дринов“. София, 2012:226.
14. Richter D, Spielman A, Komar K, Matuschka FR. Competence of American Robins as Reservoir Hosts for Lyme Disease Spirochetes. Emerg. Infect. Dis. 2000; 6(2):659-662.
15. Braks, MAH, van Wieren SE, Takken W, Sprong H (Eds.). Ecology and prevention of Lyme borreliosis. Ecology and control of vector-borne diseases. Wageningen Academic Publishers. 2016; 4:462.
16. Olsén B, Jaenson TG, Bergström S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61(8):3082-3087.

17. Определител на птиците в България. БДЗП. birds.bg (bspb.org).
18. Geller J, Nazarova L, Katargina O, Leivits A, Järvekülg L, Golovljova I. Tick-borne pathogens in ticks feeding on migratory passerines in western part of Estonia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2013; 13(7):443-448.
19. Hasle G, Bjune G, Edvardsen E, Jakobsen C, Linnehol B, Røer JE, Mehl R, Røed KH, Pedersen J, Leinaas HP. Transport of ticks by migratory passerine birds to Norway. *J Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 2(1):37-43.
20. Lommano E, Dvořák C, Vallotton L, Jenni L, Gern L. Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(6):871-82.
21. Dubska L, Literak I, Kocianova E, Taragelova V, Sychra O. Differential role of passerine birds in distribution of *Borrelia* spirochetes, based on data from ticks collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(3):596-602.
22. Šujanová A, Cužiová Z, Václav R. The Infection Rate of Bird-Feeding *Ixodes ricinus* Ticks with *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* Varies with Host Haemosporidian Infection Status. *Microorganisms.* 2023; 11(1), 60:1-18.
23. Gryczyńska A, Welc-Falęciak R. Long-term study of the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. infection in ticks (*Ixodes ricinus*) feeding on blackbirds (*Turdus merula*) in NE Poland. *Exp Appl Acarol.* 2016; 70(3):381-394.
24. Bellet-Edimo R, Betschart B, Gern L. Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmissions of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks. *Bull. Soc. neuchâtel. sci. nat.* 2005; 128:117-125
25. Humair PF, Turrian N, Aeschlimann A, Gern L. *Ixodes ricinus* immatures on birds in a focus of Lyme borreliosis. *Folia Parasitol. (Praha).* 1993; 40(3):237–242.
26. Pedersen BN, Jenkins A, Kjelland V. Tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in southern Norway. *PLoS One.* 2020; 15(4):e0230579.
27. Mannelli A, Nebbia P, Tramuta C, Grego E, Tomassone L, Ainardi R, Venturini L, De Meneghi D, Meneguz PG. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) feeding on blackbirds in northwestern Italy. *J Med Entomol.* 2005; 42(2):168-75.
28. Comstedt P, Bergström S, Olsen B, Garpmo U, Marjavaara L, Mejlon H, Barbour AG, Bunikis J. Migratory Passerine Birds as Reservoirs of Lyme Borreliosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases.* *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(7):1087-1095.
29. Gladnishka T, Christova I, Trifonova I, Ivanova V, Panayotova E, Taseva E. Study on ticks removed from patients for infection with *Borrelia burgdorferi* and their number depending on temperature and precipitation in 2016-2021. *Probl. Infect. Parasit. Dis.* 2022; 50(1):32-36.
30. Iankov P. *Birds in European Cities*, Sofia, pp. 279-305. 2005.
31. [D:/PU Kalimok Brushlen.pdf](#)
32. “НИС” ЛТУ. Обяснителна записка за инвентаризацията На “Княз Борисова градина” Лесопаркова част отдели 1 до 17; 19 до 42; от 125 до 140; Община Столична. София. 2016; 122.

33. Pospisilova T, Urbanova V, Hes O, Kopacek P, Hajdusek O, Sima R. Tracking of *Borrelia afzelii* Transmission from Infected *Ixodes ricinus* Nymphs to Mice. *Infect Immun*. 2019; 87(6):e00896-18.
34. Wilhelmsson P, Lindblom P, Fryland L. et al. *Ixodes ricinus* ticks removed from humans in Northern Europe: seasonal pattern of infestation, attachment sites and duration of feeding. *Parasit Vectors*. 2013; 6(362):1-11.
35. <http://rzi-silistra.com/RIOKOZ/home.nsf/pages/bg/NT000084F2?OpenDocument>
36. Gern L, Estrada-Pena A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TG, Jongejan F, Kahl O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall PA. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentbl. Bakteriolog*. 1998; 287(3):196-204.
37. Heylen D, Fonville M, Docters van Leeuwen A, Stroo A, Duisterwinkel M, van Wieren S, Diuk-Wasser M, de Bruin A, Sprong H. Pathogen communities of songbird-derived ticks in Europe's low countries. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):497.
38. Kaiser A, Seitz A, Strub O. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the nightingale (*Luscinia megarhynchos*) and other passerine birds. *Int J Med Microbiol*. 2002; 291 Suppl 33:75-9.
39. Isogai E, Tanaka S, Braga IS 3rd, Itakura C, Isogai H, Kimura K, Fujii N. Experimental *Borrelia garinii* infection of Japanese quail. *Infect Immun*. 1994; 62(8):3580-2.
40. Humair PF, Postic D, Wallich R, Gern L. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl Bakteriolog*. 1998 May; 287(4):521-538.
41. Sürth V, Lopes de Carvalho I, Nuncio MS, Norte AC, Kraiczy P. Bactericidal activity of avian complement: a contribution to understand avian-host tropism of Lyme borreliae. *Parasites Vectors*. 2021; 14(1):451.
42. Gryczyńska A, Zgódka A, Płoski R, Siemiańkowski M. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in passerine birds from the Mazurian Lake region (Northeastern Poland). *Avian Pathol*. 2004; 33(1):69-75.
43. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc>
44. Komar N. West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 951:58-73.
45. Grisenti M, Arnoldi D, Rizzoli F, Giacobini M, Bertolotti L, Rizzoli A. Lack of identification of Flaviviruses in oral and cloacal swabs from long and short-distance migratory birds in Trentino-Alto Adige (north-eastern Italy). *Viol. J*. 2013; 10:306.
46. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(3):311-22.
47. Panella NA, Young G, Komar N. Experimental infection of Eurasian collared-dove (*Streptopelia decaocto*) with West Nile virus. *J Vector Ecol*. 2013; 38(2):210-4.
48. Hahn S, Emmenegger T, Lisovski S, Amrhein V, Zehtindjiev P, Liechti F. Variable detours in long-distance migration across ecological barriers and their relation to habitat availability at ground. *Ecol Evol*. 2014; 4(21):4150-60.

49. Farajollahi A, Crans WJ, Bryant P, Wolf B, Burkhalter KL, Godsey MS, Aspen SE, Nasci RS. Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. *J Med Entomol.* 2005; 42(3):490-4.
50. Rudolf I, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Straková P, Šebesta O, Mendel J, Bakonyi T, Schaffner F, Nowotny N, Hubálek Z. West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1):452.
51. Lawrie CH, Uzcátegui NY, Gould EA, Nuttall PA. Ixodid and argasid tick species and West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(4):653-7.
52. Tchakarova S., Lazarova L., Georgiev G. Evaluation of the surveillance strategy used to detect WNF infection in sentinel equines during 2016 in Bulgaria. EPIZONE - 11th Annual Meeting, 19-21 September 2017 - ANSES, Paris, France. p.107. (poster).
53. Jourdain E, Toussaint Y, Leblond A, Bicout DJ, Sabatier P, Gauthier-Clerc M. Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7(1):15-33.
54. Hamer GL, Walker ED, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Goldberg TL, Schotthoefer AM, Brown WM, Wheeler E, Kitron UD. Rapid amplification of West Nile virus: the role of hatch-year birds. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 8(1):57-67.
55. Weaver, S, Barrett, A. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(10):789-801.
56. LaDeau SL, Kilpatrick AM, Marra PP. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature.* 2007; 447(7145):710-3.
57. Michel F, Fischer D, Eiden M, Fast C, Reuschel M, Müller K, Rinder M, Urbaniak S, Brandes F, Schwehn R, Lühken R, Groschup MH, Ziegler U. West Nile Virus and Usutu Virus Monitoring of Wild Birds in Germany. *Int J Environ Res Public Health.* 2018; 15(1):171.
58. Ziegler U, Lühken R, Keller M, Cadar D, van der Grinten E, Michel F, Albrecht K, Eiden M, Rinder M, Lachmann L, Höper D, Vina-Rodriguez A, Gaede W, Pohl A, Schmidt-Chanasit J, Groschup MH. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Res.* 2019; 162:39-43.
59. Schwartz G, Farnoushi Y, Berkowitz A, Edery N, Hahn S, Steinman A, Lublin A, Erster O. Molecular characterization of the re-emerging West Nile virus in avian species and equids in Israel, 2018, and pathological description of the disease. *Parasit Vectors.* 2020; 13(1):528.

ABSTRACT

The present study attempts to add to the knowledge on the ecology and epidemiology of Lyme disease and West Nile fever in terms to the involvement of birds in the transmission cycles in both of the infections.

Ixodes ricinus was identified as the dominant tick species (92%) on wild birds, and the Eurasian blackbird (*Turdus merula*) was the most frequently infested bird species in both of the areas that were studied. The spread by *I. ricinus* is more typical on birds in Sofia (25.8%). The Common chaffinch (*Fringilla coelebs*), the Song thrush (*Turdus philomelos*) and the Common nightingale (*Luscinia megarhynchos*) also contribute to the maintenance and spread of *I. ricinus*, as they frequently harboured ticks and had a high mean intensity of infestation. These hosts are widespread species, allowing for range expansion of tick populations, and in some cases of *B. burgdorferi*.

Much more often on birds we found *I. ricinus* nymphs (79.7%) than larvae (19.8%). From epidemiological point of view, the significant prevalence of nymphs is important for the reservoir status of the Eurasian blackbird. It is assumed that birds probably acquire *B. burgdorferi* from infected nymphs during the blood feeding and then infect larvae that attach later in the summer.

Borrelia burgdorferi infection was found in *I. ricinus* removed from three bird species belonging to family Turdidae – the Eurasian blackbird, the Song thrush and the European robin (*Erithacus rubecula*). All of them are species of ground-foraging birds. The Eurasian blackbird tolerated feeding of both immature stages – larvae and nymphs. *Borrelia burgdorferi* was detected in 9.4% of the ticks from Eurasian blackbird. The presence of 13.3% positive larvae from blackbirds suggests a competence of Eurasian blackbird as a host-reservoir. Here we keep in mind that the frequency of transovarial *B. burgdorferi* transmission is low. In cases of birds bitten by infected larvae and uninfected nymphs or only by infected larvae, we could assume that the transmission occurs between hosts and larvae directly. As the Song thrush carried only positive nymphs we cannot assess its reservoir capacity to the vectors. The insufficient number of larvae from European robin also does not allow us to conclude for the involvement of this species in the enzootic cycle of *B. burgdorferi*.

Infection rates in the ticks engorged on blackbirds and questing ticks were similar, 9.4% and 10.6%, respectively. It highlights the epidemiological importance of Eurasian blackbird. A major part of the infected questing nymphs and adults that attack a lot of species of vertebrates,

including human, may have developed after molting from infected larvae and nymphs fed on blackbirds. It is known the tick life cycle undergoes incomplete metamorphosis allowing a transstadial transmission of *B. burgdorferi* from a larva to a nymph and from a nymph to an adult.

Indirect evidence supporting the role of Eurasian blackbird in Lyme disease transmission was the IgG antibodies (39.6%) detection in individuals caught from both areas. Of all the examined bird species, the blackbirds met most criteria for reservoir hosts. Our data showed that the blackbirds carry infected larvae and nymphs *I. ricinus* and it is possible that the *B. burgdorferi* survives for a time in their bodies, taking into account the presence of the immune response. However, the lack of a proven active infection does not allow us to assess more confident opinion on the reservoir capacity of the blackbirds to the vectors. The positive serological results for the Great tit (34%), the Common chaffinch (10%) and the Common nightingale (14.3%) increase the likelihood that these species also are involved in the spread of the Lyme borreliosis. All three species were infested, although without detection of infected ticks.

Much more often, we detected specific IgG antibodies against WNV in widespread resident bird species (Great tit – 19.1%; Eurasian blackbird – 15.1%) and a short-distance migrant (Common chaffinch – 15%). The detection of immunity in young birds in the year of their hatching, may be an indicator of occurred infectious transmission between the birds and the vectors during the same season. The Great tit and House sparrow could be used as sentinel species in WNV surveillance program in Silistra region, and the Great tit and Eurasian blackbird are suitable sentinel species in Sofia.

Antibody response against the causative agent of Lyme disease was significantly higher (22.5%) than the antibody response against West Nile virus (14.1%).