



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛЕВЕН

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА

КАТЕДРА „АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ И БИОЛОГИЯ“

Александър Божидаров Блажев

Проучване на заразеността с *Borrelia burgdorferi sensu lato* при иксодови кърлежи в Плевенска област

АВТОРЕФЕРАТ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И
НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „МЕДИЦИНСКА БИОЛОГИЯ“

ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ 4.3. „БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ“

Научни ръководители:

Проф. д-р Милена Карчева, д.м.

Доц. Милена Атанасова, д.б.

Плевен

2023 год.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология” Медицински университет – Плевен, проведен на 31.04.2023 год. и насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд съдържа 175 страници и е структуриран в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел, Задачи, Материали и методи, Резултати, Дискусия, Обобщени изводи, и Приноси. Илюстриран е с 29 таблици, 39 фигури и 13 епизоотологични карти. Библиографската справка включва 266 източника на латиница и 17 на кирилица.

Включените в дисертационния труд изследвания са извършени в:

- Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“ сектор „Биология” на Медицински университет – Плевен.
- Катедра по Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика на Медицински Факултет при Тракийски Университет, гр. Стара Загора.

Научното жури е в състав назначен със Заповед № 1247/25.04.2023 г. на Ректора на МУ – Плевен:

Вътрешни членове за МУ – Плевен:

1. Проф. д-р Мария Петрова Георгиева-Средкова, д.м.
2. Проф. Регина Семъоновна Комса-Пенкова, д.б.н.
3. Проф. Маргарита Любомирова Александрова, д.б.н. (резервен член)

Външни членове за МУ – Плевен:

1. Проф. Евгения Нешова Иванова, д.б.н.
2. Проф. д-р Виктория Цветанова Дойчева, д.м.
3. Доц. Анелия Михайлова Стоянова, д.б.
4. Доц. Нина Димитрова Цветкова д.б. (резервен член)

Материалите по защитата на дисертационния труд са публикувани на страницата на Медицински университет – Плевен (<http://www.mu-pleven.bg>)

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 30. 06. 2023 год. от 11:30 ч., в зала „Луи Пастьор“ на Факултет „Фармация“, МУ – Плевен.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

BT	Възвратен тиф
ЛБ	Лаймска борелиоза
ТПМ	Тъмнополева микроскопия
ЗМ	Защитена местност
НСИ	Национален статистически институт
ПЗ	Природна забележителност
РЗИ	Регионална здравна инспекция
СЗО	Световната здравна организация

Съкращения на латиница

s.l.	Sensu lato – широк смисъл
PCR	Полимеразна верижна реакция
nPCR	Гнездова полимеразна верижна реакция
TF	Честота на кърлежи
TQI	Обща плътност на кърлежи
NQI	Плътност на нимфи
MQI	Плътност на мъжки индивиди
FQI	Плътност на женски индивиди
U	Градска поддържана тревна площ
W	Неподдържани естествени площи
GIS	Географска информационна система
\bar{x}	Средно аритметично
SD	Стандартно отклонение
RH	Относителна влажност на въздуха
igs	Интергенен спейсър

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	5
I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
1. РЕТРОСПЕКТИВНО ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ЛБ В ПЛЕВЕНСКА ОБЛАСТ И БЪЛГАРИЯ ..	7
2. СЪБИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА КЪРЛЕЖИ	8
3. ПЛЪТНОСТ НА АКТИВНО ДЕБНЕЩИТЕ КЪРЛЕЖИ	8
4. РАЙОНИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	9
5. ТЪМНОПОЛЕВА МИКРОСКОПИЯ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА <i>B. BURGDORFERI</i> S.L. В ЧРЕВНО СЪДЪРЖИМО НА <i>I. RICINUS</i>	11
6. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ КЪРЛЕЖИ	11
7. NESTED PCR ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА <i>B. BURGDORFERI</i> S.L. В <i>I. RICINUS</i>	13
8. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ:	16
9. КАРТОГРАФИРАНЕ НА РАЙОНИТЕ	16
10. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ	17
III. РЕЗУЛТАТИ	17
1. РЕТРОСПЕКТИВНО ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА КЪРЛЕЖОВО-ПРЕНОСИМИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ И ПЛЕВЕНСКА ОБЛАСТ	17
2. КАМПАНИИ ПО СЪБИРАНЕ НА ИКСОДОВИ КЪРЛЕЖИ	20
3. СРАВНЯВАНЕ ПОПУЛАЦИИТЕ НА <i>I. RICINUS</i> МЕЖДУ РАЗЛИЧНИТЕ РАЙОНИ НА ПРОУЧВАНЕ	29
4. РЕЗУЛТАТИ ОТ КАМПАНИИТЕ ПО СЪБИРАНЕ НА <i>IxODES RICINUS</i> В ЗМ „КАЙЛЪКА“	33
5. ТЪМНОПОЛЕВА МИКРОСКОПИЯ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> S.L.	38
6. ПРОУЧВАНЕ НА ЗМ „КАЙЛЪКА“ ЗА НАЛИЧИЕ НА <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> S.L. В КЪРЛЕЖИ ОТ ВИДА <i>IxODES RICINUS</i>	39
7. СРАВНЯВАНЕ НА МЕТОДИТЕ ИЗПОЛЗВАНИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА <i>B. BURGDORFERI</i> S.L. В <i>I. RICINUS</i>	44
9. ЕПИЗООТОЛОГИЧНО КАРТИРАНЕ	45
IV. ДИСКУСИЯ	53
1. РЕТРОСПЕКТИВНО ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ	53
2. СЪБИРАНЕ НА ИКСОДОВИ КЪРЛЕЖИ	54
3. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА <i>IxODES RICINUS</i> В ЗМ „КАЙЛЪКА“	59
4. ТЪМНОПОЛЕВА МИКРОСКОПИЯ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> S.L.	63
5. ДЕТЕКЦИЯ НА <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> S.L. В <i>IxODES RICINUS</i> ЧРЕЗ nPCR	63
6. ПРОУЧВАНЕ НА ЗАЩИТЕНА МЕСТНОСТ „КАЙЛЪКА“ ЗА НАЛИЧИЕ НА <i>B. BURGDORFERI</i> S.L. В КЪРЛЕЖИ ОТ ВИДА <i>I. RICINUS</i> ..	65
V. ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ	68
VI. ПРИНОСИ	69
1. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР	69
2. ПРИНОСИ С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР:	70
3. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР:	70
VII. ПРИЛОЖЕНИЯ	70
1. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:	70
2. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:	71
2.2. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ В ЧУЖБИНА	71
2.3. УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ:	72

ВЪВЕДЕНИЕ

Иксовите кърлежи (семејство Ixodidae) са сравнително малка, таксономично изолирана група акари, облигатни хематофаги, паразити по сухоземни гръбначни животни (главно бозайници, птици и влечуги). В българската фауна са описани 5 рода с 39 вида. Иксовите кърлежи са преносители, а често и гостоприемници на много патогени на природно-огнищни заболявания и участват в разпространението на бактерии, рикетсии, вируси и протозои сред дивите и домашните животни.

Лаймската борелиоза (ЛБ) е най-често срещаната естествена кърлежово-преносима зоонозна инфекция, в страните с умерен климат, където попада и България. Причинителите на ЛБ са спирохети, принадлежащи към комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.), разпространявани от кърлежи от род *Ixodes*.

Световната здравна организация (СЗО) разработва стратегии и подходи за превенция и контрол на тази, понякога подценявана инфекция. Правят се инвестиции за прилагане на ваксини, както рутинно в животновъдството, така и за домашните любимци, за подобряване на условията в екосистемите. Лаймската борелиоза е социално-икономически проблем, затова трябва да се вземат мерки за контрол, мониторинг и ограничаване развитието на кърлежовите популации. Всичко това би дало тласък в борбата срещу този здравен проблем.

Лабораторната диагностика на заболяването се нуждае от бързи и точни методи, позволяващи детекция на патогена директно в неговите вектори. На този етап все още не съществува ефективен метод за ликвидиране на патогена и кърлежовия му преносител. От друга страна все още няма налични ваксини за защита срещу борелии. Проучване относно носителството на патогени в основните вектори (кърлежи от род *Ixodes*), би допринесло за по-бързото ликвидиране или ограничаване на причинителите в естествените им огнища. Използването на бързи и лесно изпълними техники за детекция на борелии в кърлежите би допринесло за своевременното поставяне на диагнозата и адекватното лечение, особено в случаите с неясни фебрилни състояния.

По-задълбочено изучаване на популациите от иксови кърлежи и свързаните с тях патогени ще допринесе за оптимизиране на епидемиологичното проучване при болестта. Това ще помогне за изясняване на общата епидемична обстановка в страната и ще допринесе за по-ефективна превенция срещу Лаймската борелиоза.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото проучване е чрез идентификация и анализ на иксодофауната в Плевенска област и характеризиране инфектираността на *Ixodes ricinus* с *Borrelia burgdorferi* s.l. да се установят огнищата с кърлежови популации и тяхната популационна плътност, като на базата на установените данни се направи оценка на риска от заразяване на населението в областта. За изпълнението на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Да се извърши ретроспективно епидемиологично проучване на трансмисивните инфекции в област Плевен.
2. Да се проучи иксодофауната в района на изследване чрез таксономична идентификация по вид, пол и стадий на развитие на кърлежите и на базата на това да се сформират биогеоценотични групи.
3. Да се проучи заразеността с *Borrelia burgdorferi* s.l. в екземпляри на иксодофауната от Плевенска област като се определят „горещи точки“ с висока популационна плътност на иксодови кърлежи и представляващи повишен епидемиологичен риск за населението.
4. Да се идентифицира наличието на спирохети от комплекса *B. burgdorferi* s.l. в събраните кърлежи от род *Ixodes* чрез прилагане на тъмнополева микроскопия.
5. Да се изолира ДНК от векторите и да се извърши PCR анализ за позитивност към комплекса *B. burgdorferi* s.l.
6. Да се изработи карта на установените огнища с кърлежови популации и тяхната инфектираност с *B. burgdorferi* s.l. в района на Плевен.
7. Да се сравни и анализира плътността на кърлежовите популации и инфектираността им с *B. burgdorferi* s.l. в поддържани зелени площи, третирани с акарициди и в естествени неподдържани и нетретирани зони.
8. Да се оцени риска от заразяване на населението в Плевен и областта въз основа на установената инфектираност на изследваните кърлежи.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. РЕТРОСПЕКТИВНО ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ЛБ В ПЛЕВЕНСКА ОБЛАСТ И БЪЛГАРИЯ

1.1. Изследване на заболяемостта

Обект на изследване на заболяемостта на населението е съвкупността от случаите на заболявания на лицата. Единицата за наблюдение в това изследване са регистрираните случаи на заболявания в лицата, които са потърсили медицинска помощ. Техническа единица и източник на информацията е лечебното заведение, където са регистрирани случаите.

1.2. Източници на информация

Основни източници на информация за ежегодно провежданите изследвания са годишните формуляри, които всички лечебни и здравни заведения в страната представят в НСИ и Националния център по обществено здраве и анализи, дирекция „Национални здравни данни и електронно здравеопазване” <https://nsi.bg/bg>.

Данните за разпространението и заболяемостта от ЛБ в Плевенска област за периода 2001 – 2016 г. са предоставени от РЗИ- Плевен с разрешение за достъп до обществена информация по реда на ЗДОИ изх.№16-02942 от 05.04.2016 г. Данните включват брой регистрирани случаи, разпределение по пол на болелите и възрастова структура на заразените. От 2016 до 2021 г. са използвани данните от публикуваните бюлетини на сайта на РЗИ-Плевен <https://rzi-pleven.com/category/%d0%b1%d1%8e%d0%bb%d0%b5%d1%82%d0%b8%d0%bd/>, както и от годишните публикации „Здравеопазване“ в сайта на НСИ <https://www.nsi.bg/bg>. Подробни сведения за източниците на информация са представени в таблица 1.

Таблица 1. Използвани данни за ретроспективно епидемиологично проучване относно регистрираните случаи на Лаймска борелиоза в България и област Плевен.

Показатели	Източник на информация	Налични данни за периода:
Възраст	НСИ - "Здравеопазване"	Липсват данни
	РЗИ - Плевен	2011 – 2016 г.
Пол	НСИ - "Здравеопазване"	Липсват данни
	РЗИ - Плевен	2002 – 2015 г. ¹
Регистрирана заболяемост	НСИ - "Здравеопазване"	2015 – 2020 г.
	РЗИ - Плевен	2001 – 2020 г.

Регистриран брой случаи месечно	НСИ - "Здравеопазване"	2016 – 2020 г. ²
	РЗИ - Плевен	2001 – 2020 г.
Регистрирани случаи по области	НСИ "Здравеопазване"	2016 – 2020 г.
	РЗИ - Плевен	Липсват данни

¹ За 2008 г. липсва информация за пола на регистрираните с ЛБ.

² Данните са общо за България.

2. СЪБИРАНЕ И ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА КЪРЛЕЖИ

Кампаниите за събиране на кърлежи са провеждани през март, април, май и юни, в рамките на 5-годишен период между 2016 и 2021 г., като е използван метод на флагиране с бял памучен плат (размери около 100 × 100 cm), монтиран на дръжка. Разстоянието, което се флагира за всяко място на вземане на проби при всяко едно посещение, зависи от наличното време и метеорологичните условия, както и от локалното изобилие на кърлежите.

Дните за вземане на проби са избирани по следните критерии: без дъжд и обилна роса, скорост на вятъра по-малка от 3 по скалата на Бюфорт, температура на въздуха над 10°C. За тази цел на земята във всяка зона за събиране на проби е поставена метеорологична станция (Auriol IAN 94604 Owim GmbH & Co. KG, Neckarsulm, Германия), за да се следи местната температура и хигрометрия. Общото време за вземане на проби и площта на повърхността се записват за всяко посещение. Времето, прекарано в пробовземане (включително необходимото за извличане на кърлежите от флага с пинсета и поставянето им отделно в 1,5 ml епруветки тип Eppendorf (Eppendorf AG, Хамбург, Германия)), варира от 5 до 60 min. Събраните кърлежи се пренасят в лабораторията, където се провежда промиване със стерилна вода в ултразвукова почистваща машина (Silvercrest, HOYER Handel GmbH, Хамбург, Германия), идентифициране до ниво вид, стадий на развитие и пол съгласно морфологичните ключове, предоставени в определителите на Георгиева, Филипова и Estrada-Peña et al., с помощта на стереомикроскоп (Olympus SZ4045, Olympus American Inc., Melville, NY).

3. ПЛЪТНОСТ НА АКТИВНО ДЕБНЕЩИТЕ КЪРЛЕЖИ

Плътността на кърлежите е изразена като брой захванати кърлежи на 100 m² провлачен флаг. Площта на флагиране е изчислена с помощта на приложението Google maps (<https://www.google.com/maps/@43.4107218,24.6295521,15z>) и Google earth (<http://earth.google.com>).

Тъй като флагирането в различните места за вземане на проби е извършвано неравномерно (различно време, продължителност на флагирането и различен брой проби), за сравнение и оценка на числеността на активно търсещите кърлежи в различните райони на изследване, са използвани няколко индекса, които да отразяват изобилието на кърлежите. Събраните кърлежи са представени в т. нар. квестинг индекс (**QI**), като броят на събраните индивиди от растителността се

разделя на флагираната площ. Индексът е изчислен само за кърлежите *I. ricinus* (поотделно за възрастните, нимфите), както следва: мъжките (**MQI**); женските (**FQI**); нимфите (**NQI**); и общия брой кърлежи *I. ricinus* на терен (**TQI**). Преобразуването се извършва по следната формулата: $QI = n / S$, където n е броят на събраните кърлежи, а S е повърхността, от която са събирани екземплярите в квадратни метри. Площта и съответните индекси се изчисляват веднага след всяка кампания за събиране на кърлежи. Получените индекси се използват за статистически анализ.

3.1. Честота на активно търсещите кърлежи (Ticks Frequency TF)

TF представлява общият брой кърлежи, събрани от всяко място, независимо от стадия и пола за една минута. Общият брой на събраните кърлежи се разделя на времето за събиране при всяко едно събитие. При отчитане на времето за събиране се засича времето от първото прокарване на флага над растителността до прибирането на последния уловен кърлеж.

4. РАЙОНИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

В хода на проучването са включени райони, неизследвани до момента в България. Те са, както следва:

4.1. Защитена местност „Кайлъка“, Плевен

Защитена местност (ЗМ) „Кайлъка“ е разположена в карстовата долина на р. Тученица в землищата на гр. Плевен, с. Тученица, с. Бохот, с. Радишево. Обявена е за защитена местност със Заповед номер 3700/29.12.1972 г. на МГОПС. Обхваща каньона на р.Тученица и Бохотската гора (карта 2).

За период от седем години (2016-2022 г.) са изследвани осем зони за вземане на проби в ЗМ „Кайлъка“ разделени на две категории – градска (Urbanised – U) и дива (Wild – W).

4.1.1. Поддържани зони в ЗМ „Кайлъка“

Местата за вземане на проби от U1 до U4 (Централна алея на парка 2,8 км). От двете страни на алеята има различни широколистни и иглолистни дървета и поляни. Урбанизираните участъци са под силно антропогенно влияние, редовно посещавани от гражданите, поддържани чрез косене и подрязване на храсти и дървета. Интензивно използвани от посетителите за различни дейности на открито, особено за спорт, разходки с деца, разхождане на кучета, колоездене и т.н. (карти 4 и 7).

Поддържаните обекти се обитават от гризачи и птици, както и от синантропни хищници като кучета (*Canis lupus familiaris*), порове (*Mustela*

putorius) и таралежи (*Erinaceus europaeus*). Появят се (макар и рядко) и по-големи бозайници като сърни (*Capreolus capreolus*) и европейски язовец (*Meles meles*) (лично наблюдение по време на периода на изследване).

4.1.2. Неподдържани зони в ЗМ „Кайлъка“

Неподдържаните зони (W1 – W4) са известни с това, че се обитават от многобройни едри бозайници, особено свободно живееща популация от сърна (*Capreolus capreolus*) или дива свиня (*Sus scrofa*). Чакалите (*Canis aureus*), лисиците (*Vulpes vulpes*), европейският язовец (*Meles meles*) са постоянни обитатели на гората, която е местообитание на много гризачи, насекомоядни, голям брой видове птици и влечуги (лично наблюдение) (карти 8 и 12). Дивите места за вземане на проби са с много по-ниско ниво на ежедневна активност на хората и се посещават главно от горски работници, туристи, събирачи на билки и гъбари, през определени периоди от годината.

4.2. Природна забележителност (ПЗ) „Карстово ждрело на р. Чернелка“ от с. Горталово до с. Къртожабене

Ждрелото се намира в средната част на Дунавската равнина. Представлява карстов каньон от горнокредни варовици и глинесто-песъчливи скали. Разположено е между двете села Горталово и Къртожабене, на около 12 км от град Плевен. Горският му фонд е с обща площ от 300 хектара. По протежение на 6,5 километра малката река Чернелка е образувала каньон с ширина от 60 до 200 метра и височина на скалите от 10 до 35 – 40 метра (карти 1 и 13). Характеризира се със слаба антропогенна намеса с гъста растителност. Сред растителните видове преобладават черен бъз (*Sambucus nigra*) драка (*Paliurus spina-christi*), трънка (*Prunus spinosa*), европейски чашкодрян (*Euonymus europaeus*) глог (*Crataegus sp.*).

4.4. Село Садовец, местност „Гарван дол“

На около 3 км югоизточно от Садовец, между Садовското кале и Кожухаровото кале. В района има изобилие от орехи, липи, тополи, брястове и други многовековни дървета. Пашата на едър и дребен добитък е ежедневна. Характеризира се с наличие на открити ливади с висока тревиста растителност (карта 1).

4.5. Село Гривица, местност „Тачова чешма“

Районът се намира до т.нар. „Алеи“ в близост до два заблатени(до 2019 г.) участъка. Екземпляри от иксодофауната са събирани до 2019 г. поради

пресушаване на блатата и превръщане на местността в незаконно сметище. Растителността е предимно от ниски дървета и храсти. Преобладават драка (*Paliurus spina-christi*), дива круша (*Pyrus pyraeaster*), трънка (*Prunus spinosa*), глог (*Crataegus sp.*), черен бъз (*Sambucus nigra*). Има изкуствени гори от робиния (*Robinia pseudoacacia*). Районът е богат на диви животни (карта 1).

5. ТЪМНОПОЛЕВА МИКРОСКОПИЯ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА *B. BURGDORFERI* S.L. В ЧРЕВНО СЪДЪРЖИМО НА *I. RICINUS*

За детекцията на *B. burgdorferi* s.l. е използван микроскоп с кондензор за тъмно поле. На микроскопски анализ са подложени само ненапити кърлежи, които са събрани от растителността. Кърлежите са изследвани непосредствено след събирането им или след престой в хладилник при 4°C в рамките на седмица. В хода на работа кърлежът се фиксира с помощта на ентомологична пинсета върху предметно стъкло. С върха на стерилна игла се прави срез между 2-3 крайник, като се цели да се разкъса средното черво. Върху хемолимфата с част от чревното съдържимо се добавя малка капка (20-30 µl) PBS или физиологичен разтвор. Наблюдава се на увеличение 400x. За позитивни се приемат тези индивиди, при които е наблюдавана поне една спирохета. За негативни се приемат индивидите, при които в хода на микроскопирането за минимум 50 видни полета не е установено наличие на борелия.

6. ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК ОТ КЪРЛЕЖИ

6.1. Изолиране с фенол-хлороформ изоамилов алкохол по Barker et al (1998).

Материали:

- Протеиназа К
- Фенол-хлороформ изоамилов алкохол (25:24:1)
- Хлороформ – изоамилов алкохол (24:1)
- Ледено студен 100% етанол
- 70% етанол
- TRIS – EDTA (TE) буфер
- Ламинарен бокс
- Вортекс
- 1,5 ml стерилни микроцентрифужни епруветки
- Фризер
- Микроцентрифуга
- Термошейкър

Лабораторно оборудване:

- Термостат

Лизиране на тъканите:

1. Кърлежите се разкъсват с помощта на стерилна игла и/или върха на пипетата в епруветки тип епендорф;
2. Добавя се 400 μ l лизиращ буфер [50 mM Tris-HCl (pH 8.25), 25 mM EDTA, 25 mM NaCl, 1% SDS, Протеиназа К (500 mg/ml)];
3. Пробите се инкубират 3-4 часа при 56°C на термошейкър.

Екстракция и преципитация на ДНК:

1. Към всяка епруветка се добавя равен обем (400 μ l) фенол-хлороформ изоамилов алкохол (25:24:1) и се разбърква в продължение на 5 min на стайна температура;
2. Центрофугира се на 10 000 g за 10 min. на стайна температура;
3. Внимателно се отпипетира горната (водна) фаза, съдържаща ДНК;
4. Отпипетираната фракция се прехвърля в нова епруветка. При наличие на утайка между двете фази стъпките се повтарят отново;
5. Добавя се равен обем от хлороформ-изоамилов алкохол (24:1). Разбърква се внимателно в продължение на 2 min. и се центрофугира за 1 min. при 10 000 g на 4°C;
6. Отпипетира се внимателно горната (водна) фаза, съдържаща ДНК, като се прехвърля в нова епруветка;
7. Добавя се 1/10 обем 3M натриев ацетат (pH = 5) и 2-2,5 обема ледено студен 100% етанол и се инкубира на -70°C за една нощ;
8. Пробите се центрофугират на 4°C за 20 min. на 10 000 g и се отстранява супернатантата;
9. Добавя се 1 ml 70% етанол и се центрофугира на 4°C за 20 min. на 10 000 g.
10. Отстранява се супернатантата, епруветките се сушат на стайна температура за 1-2 часа;
11. Полученият изолат се разтваря в 50 μ l TE буфер (pH 8);
12. Получената ДНК се съхранява на -70°C.

6.2. Екстракция на ДНК с комерсиални китове.

Геномната ДНК е извлечена от отделни кърлежи с помощта на NucleoSpin® Tissue за ДНК от клетки и тъкани (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Получените проби за екстракция са обработени съгласно работния протокол на екстракционния кит.

7. NESTED PCR ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА *B. BURGENDORFERI* S.L. В *I. RICINUS*.

7.1. Гнездова полимеразна верижна реакция nPCR

Гнездова полимеразна верижна реакция (английски nested PCR – гнездова, „вложена“ nPCR) е двуетапна разновидност на PCR, използвана за намаляване на количеството неспецифични реакционни продукти.

Детекцията на *B. burgdorferi* s.l. е осъществена в катедрата по Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика на Медицински Факултет при Тракийски Университет, гр. Стара Загора. Използван е апарат GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA).

С цел повишаване на чувствителността на PCR анализа към наличието на ДНК на *Borrelia* в кърлежи, са извършени два nPCR, насочени към: (1) некодиращ регион, интергенния спейсър на 5S-23S рРНК (PCR_{5S-23Sigs}) и (2) гена, кодиращ флагелин В (FlaB). Последователностите на използваните праймери са представени в таблица 2.

7.3. Вгнезден (nested) PCR

Етапите, по които са проведени nPCR за детекция на борелии са следните:

1. Ламинарният бокс предварително се стерилизира с UV светлина и 70% етанол;
2. След размразяване на пробите внимателно се разбъркват на вортекс миксер и се центрофугират за кратко;
3. Приготвя се реакционна смес (master mix) на стайна температура, като в епруветка се добавят компонентите, представени в таблици 3 и 4;
4. Така приготвената обща смес (master mix) се разбърква добре на вортекс миксер и се центрофугира за кратко;
5. Във всяко кладенче на плаката за PCR се поставят по 17µl от реакционната смес;
6. Добавят се по 3µl от изолираната ДНК;
7. Успоредно с това се подготвят положителни контролни серии, състоящи се от проверена ДНК на *Borrelia* и отрицателни контролни серии, включващи реакции без наличие на ДНК матрица (Вода, чиста от нуклеази, вместо ДНК), за да се открие замърсяване с реагенти и аерозоли;
8. Апаратът за PCR се програмира съгласно схемата на таблица 5. Плаката се поставя в апарата и се дава начало на амплификацията.

Таблица 2. Вътрешни и външни праймери за pPCR на *B. burgdorferi* s.l. 5S-23S интергенен спейсър и FlaB.

Име на праймер	ген	Последователност (5'-3')	Размер на ампликона	Tm	GC%	Температура на хибридизация	Референции
23S3 Out Fw	<i>rrf(5S)-rrl(23S) intergenic spacer</i>	CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC	411 bp	59.61	52.38	55°C	Chu et al., 2008 Schwartz et al., 1992
23Sa Out Rv		TAAGCTGACTAATACTAATTA CCC		53.43	33.33		
Primer 1 In Fw	<i>rrf(5S)-rrl(23S) intergenic spacer</i>	CTG CGA GTT CGC GGG AGA	254 bp	67.1	66.67	59°C	Postic et al., 1994
Primer 2 In Rv		TCC TAG GCA TTC ACC ATA		57.7	44.44		
FlaB Out Fw	<i>FlaB</i>	GCATCACTTTCAGGGTCTCA	503 bp	62.8	50	55°C	Wills et al.
FlaB Out Rv		TGGGGAAC TTGATTAGCCTG		62.7	50		
FlaB In Fw		CTTTAAGAGTTCATGTTGGAG	447 bp	57.4	38.10	58°C	
FlaB In Rv		TCATTGCCATTGCAGATTGT		61.7	40		

9. След извършване на първата амплификация се приготвя реакционната смес за втората (nested) PCR, както е представено на таблици 3 и 4. Разликата с първата PCR е:
- използването на съответните вътрешни праймери (табл.2);
 - 2 μl ДНК матрица, получена от първия PCR и температура на хибридизация (annealing) съобразена с тази на вътрешните праймери, представени в таблица 5;
10. При всяка амплификация се включват отрицателна контрола (вода чиста от нуклеази) и позитивна контрола. За позитивна контрола се използва пречистена геномна ДНК (изолирана от *Borrelia burgdorferi*; щам В31, [ATCC®35210D5™] доставена от LGC, Германия, Хановер), разреждана до концентрация 10 ng/ μl .

Таблица 3. Необходими изходни количества за провеждане на една *nPCR*_{5S-23Sigs} реакция (20 μl).

Компоненти	PCR _{5S-23Sigs} №1	PCR _{5S-23Sigs} №2
Taq Polymerase Master Mix 2X	12.5 μl	12.5 μl
Вода, чиста от нуклеази	3.7 μl	4.7 μl
10 μM прав и обратен праймери	0.8 μl външни праймери: 0.4 μl прав праймер (Forward Primer) 0.4 μl обратен праймер (Reverse Primer)	0.8 μl вътрешни праймери: 0.4 μl прав праймер (Forward Primer) 0.4 μl обратен праймер (Reverse Primer)
ДНК матрица	3.0 μl , екстракт от пробата	2.0 μl , от продукта на PCR № 1

Таблица 4. Необходими изходни количества за провеждане на една *nPCR*_{flav} за една проба (20 μl).

Компоненти	PCR №1	PCR №2
Taq Polymerase Master Mix 2X	12.5 μl	12.5 μl
Вода, чиста от нуклеази	3.5 μl	4.5 μl
10 μM прав и обратен праймери	1.0 μl външни праймери: 0.5 μl прав праймер (Forward Primer) 0.5 μl обратен праймер (Reverse Primer)	1.0 μl вътрешни праймери: 0.5 μl прав праймер (Forward Primer) 0.5 μl обратен праймер (Reverse Primer)
ДНК	3.0 μl , екстракт от пробата	2.0 μl , от продукта на № 1

Таблица 5. Температурни режими на проведените *nPCR* реакции за детекция на *5S-23Sigs* и *flaB*.

nPCR_{5S-23Sigs} №1			
95°C	Първична денатурация	5 min	
95°C	Денатурация	30 s	35 повтарящи се цикъла на амплификация
55°C	Хибридизация на праймерите	30 s	
72°C	Елонгация	40 s	
72°C	Финална елонгация	5 min	
nPCR_{5S-23Sigs} №2			
95°C	Първична денатурация	5 min	
95°C	Денатурация	15 s	35 повтарящи се цикъла на амплификация
59°C	Хибридизация на праймерите	30 s	
72°C	Елонгация	45 s	
72°C	Финална елонгация	5 min	
PCR_{flaB} №1			
95°C	Първична денатурация	5 min	
95°C	Денатурация	15 s	35 повтарящи се цикъла на амплификация
55°C	Хибридизация на праймерите	30 s	
72°C	Елонгация	45 s	
72°C	Финална елонгация	5 min	
PCR_{flaB} №2			
95°C	Първична денатурация	5 min	
95°C	Денатурация	15 s	35 повтарящи се цикъла на амплификация
58°C	Хибридизация на праймерите	30 s	
72°C	Елонгация	45 s	
72°C	Финална елонгация	5 min	

8. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ:

Продуктите от PCR са анализирани чрез електрофореза в 1,5% агарозен гел в TAE буфер [40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA (pH 8,5)] за 1 ч., на 107 V (5V/cm), оцветен с етидиев бромид. За оценка на дължината на получения продукт се използва GenLadder 50bp (Genaxxon bioscience). Резултатите от PCR амплификацията се визуализират с помощта на фото-документационна система UST-20M-8E BIO View Transilluminator, Biostep, Germany.

9. КАРТОГРАФИРАНЕ НА РАЙОНИТЕ

За изготвянето на картите се използва безплатна и отворена кодова информационна система за настолни компютри QGIS 3.18.0-Zürich. Географските координати на всеки един кърлеж се извличат от Google Maps и експортират в Microsoft Excel 2016 непосредствено след събирането им.

За визуализация на терена са използвани слоеве от Open Street Map (OSM Standart) наличен свободно и ESRI World Topo също със свободен достъп. Използва се географската система EPSG:3857 - WGS 84 / Pseudo-Mercator. Всички зони на флагиране се представят като полигони, които се оформят ръчно. Създават се отделни слоеве от *.csv файловете за всички уловени чрез флагиране кърлежи *Ixodes ricinus*, за всички позитивни за *Borrelia burgdorferi* s.l. и за тези, които са негативни.

10. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Данните са въведени и обработени със статистическите пакети IBM SPSS Statistics 23.0., GraphPad Prism v.8 и Excel на MS Office 2021. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза се приема $p < 0.05$.

Приложени са следните методи:

- Дескриптивен анализ.
- Графичен анализ.
- Тест на Шапиро-Уилк.
- Т-критерий на Стюдънт.
- Непараметричен тест на Ман-Уитни (Mann-Whitney U test).
- Хи-квадрат (χ^2) Критерий на Пирсън.
- One Way ANOVA и Post-hoc тест (LSD).
- За да се провери доколко резултатите от ТПМ и двата PCR метода се съгласуват е извършен анализ на надеждността на тестовете, чрез изчисляване на Капа коефициент на Коен (κ), Данните са представени като коефициент на капа (κ) и 95% поверителен интервал (95% CI).

Скалата за тълкуване на Капа коефициент на Коен (κ) по Landis и Koch:

- Карра < 0 : няма съгласие;
- Капа между 0.00 и 0.20: слабо съгласие;
- Капа между 0.21 и 0.40: добро съгласие;
- Капа между 0.41 и 0.60: умерено съгласие;
- Капа между 0.61 и 0.80: съществено съгласие;
- Капа между 0.81 и 1.00: почти пълно съгласие.

III. РЕЗУЛТАТИ

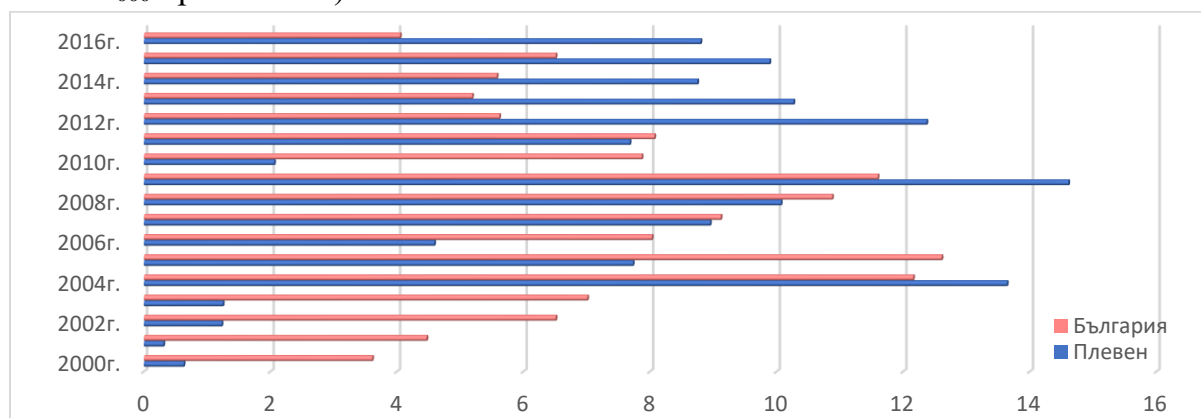
1. РЕТРОСПЕКТИВНО ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА КЪРЛЕЖОВО-ПРЕНОСИМИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ И ПЛЕВЕНСКА ОБЛАСТ

За проучения период в България са регистрирани 9827 случая на Лаймска борелиоза (ЛБ), от тях 352 (3.58%) в област Плевен. Регистрираните случаи на

Марсилска треска (МТ) са 11732, от които в област Плевен – 25. Случаите на туларемия в страната са 195 и само един от тях е регистриран в област Плевен. С Ку-треска са регистрирани 1115 случая в България, от които един в област Плевен.

Данните показват, че водеща за страната по брой регистрирани случаи е МТ, следвана от ЛБ. В област Плевен най-голям брой са регистрираните случаи с ЛБ. Анализирайки заболяемостта на ЛБ в област Плевен и страната (фиг. 1) се установи: ежегодно регистриране на случаи в област Плевен, като най-ниска заболяемост е отчетена през 2001 г. – 0.31‰, а най-висока през 2009 г. – 14.61‰. Средногодишната заболяемост е 7.22‰. В цялата страна за същия период се регистрират случаи с най-ниска заболяемост през 2000 г. – 3.61‰ и най-висока през 2005 г. – 12.61‰. Средногодишната заболяемост в страната е 7.58‰. Прави впечатление, че през някои от годините заболяемостта в област Плевен надвишава тази в страната (2009 г., 2012 г., 2013 г. и 2016 г.).

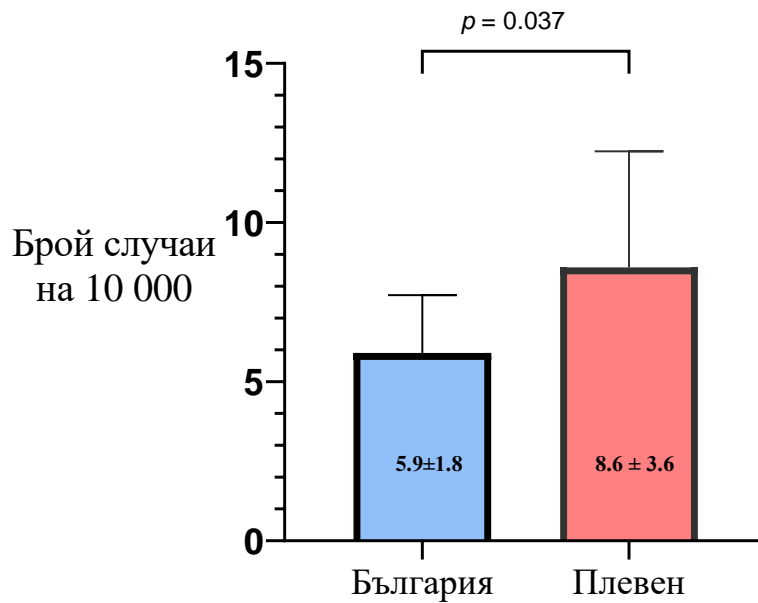
От данните за МТ, в област Плевен са регистрирани единични случаи от 2006 г. до 2016 г., заболяемостта е ниска (от 0.33‰ до 3.04‰). Средногодишната заболяемост е 0.897‰. В България ежегодно се регистрират случаи на МТ и е установена средногодишна заболяемост 8.90‰ (от 2.96‰ през 2016 г. до 19.35‰ през 2001 г.).



Фигура 1. Заболяемост (‰) от Лаймска борелиоза в Плевенска област и България за периода 2000-2016 г.

В област Плевен за периода на проучване са регистрирани един случай на туларемия (2014 г.), който е единственият в страната за същата година и един на Ку-треска (2006 г.), завършил фатално. Заболяемостта за двете инфекции в областта е ниска – 0.38‰ за туларемия и 0.33‰ за Ку-треска. В цялата страна за периода 2000-2017 г. са регистрирани 195 случая на туларемия, със заболяемост от 0.01‰ до 0.21‰ и 1115 случая на Ку-треска, със заболяемост от 0.22‰ до 3.48‰.

От публикуваните данни в наличните публикации „Здравеопазване“ на НСИ, в България от 2010 до 2020 г. са регистрирани 4678 случая на ЛБ. Средно годишно се регистрират 425 ± 135.6 случая за страната (5.9 ± 1.8 ‰). За Плевенска област в същия период са отчетени 232 случая, средно годишно 21 ± 9.2 (8.6 ± 3.6 ‰), което е статистически повече от средните за страната ($p = 0.037$) (фиг. 2).



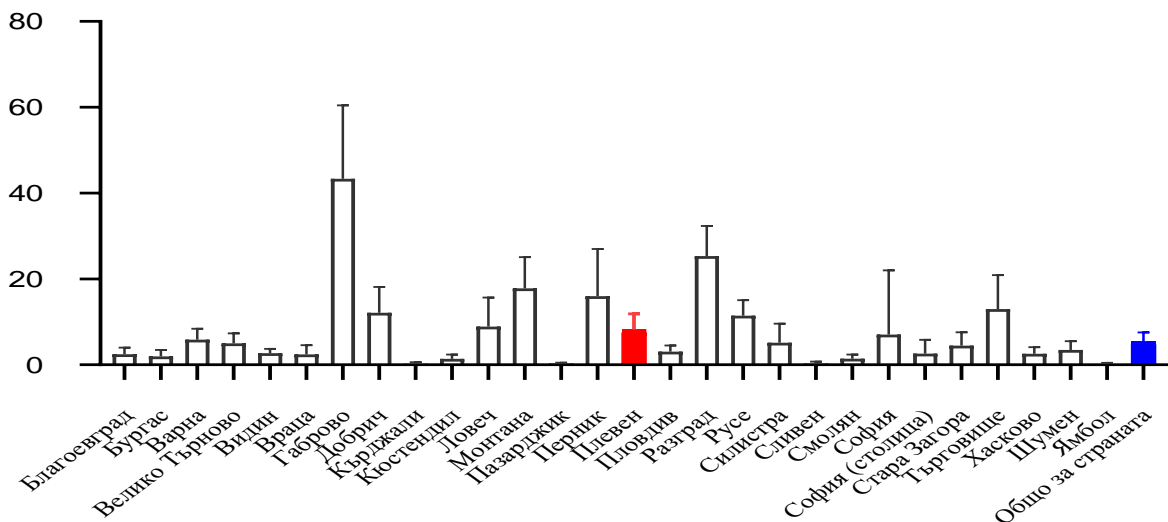
Фигура 2. Брой случаи на ЛБ в България и Плевен за периода 2010 - 2020 г. по данни на НСИ. Бокс-плота е представен чрез \bar{x} и SD .

При анализ на данните от РЗИ – Плевен (2001 – 2020) и НСИ (2016-2020 г.) се установява, че от 2001 до 2020 г. в Плевенска област са регистрирани общо 422 (21.1 ± 12.5 годишно) случая на ЛБ. Най-висок брой регистрирани случаи на ЛБ ($n = 49$) се установява през 2004 г. и 2009 г.

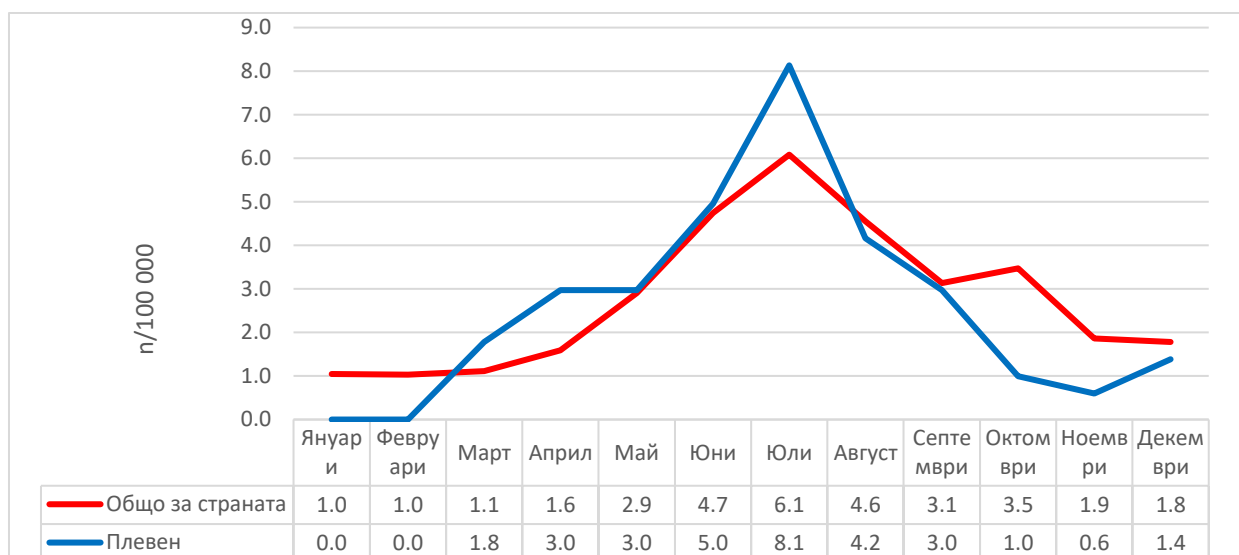
На базата на общодостъпните данни на НСИ (2015-2020 г.), Плевенска област се нарежда на 9^{-то} място в България по брой регистрирани случая с ЛБ (фиг. 3).

Съотношението по пол от данните на РЗИ – Плевен за 2002- 2015 г. ($n = 296$) е 62% инфектирани жени спрямо 38% мъже (14.08 ± 8.71 спрямо 8.7 ± 5.22). Разликата е статистически незначима ($p = 0.068$).

От месечните бюлетини на РЗИ – Плевен и НСИ се установява, че както за България така и за Плевен най-голям брой случаи на ЛБ се наблюдават по време на летните месеци с пик в месец юли. При обобщените за страната случаи се наблюдава малък втори пик през септември - октомври, който липсва в Плевенска област (фиг. 4).



Фигура 3. Брой регистрирани случаи на ЛБ в България по области за периода 2015 - 2020 г. по данни на НСИ.



Фигура 4. Регистрирана заболяемост на 100 000 души население (‰) от ЛБ по месеци в България и Плевен за периода 2015-2020 г.

При разпределението по възраст се наблюдава, че повечето случаи са при лица над 30 г., като най-голям дял имат лицата над 60-годишна възраст.

2. КАМПАНИИ ПО СЪБИРАНЕ НА ИКСОДОВИ КЪРЛЕЖИ

Събирането на иксодови кърлежи се извърши за период от 7 години (2016-2022 г.) през пролетно-летния сезон от март до края на юни според метеорологичните условия. Проведени са общо 75 кампании на събиране, при които са събрани 1459 кърлежи (1376, от които чрез флагиране) от района на Плевенска област.

От тях 1298 (88.91%) са представители на род *Ixodes*; 52 (3.56%) - на род *Dermacentor*; 108 (7,4%) - на род *Rhipicephalus*; 2 (0,1%) на род *Haemaphysalis*. Представители на род *Hyalomma* не са улавяни.

Разпределението по пол и стадий на развитие на събраните чрез флагиране *Ixodes ricinus* е 42.5% ($n = 551$) женски, 40.2% ($n = 521$) мъжки, 17.2% ($n = 223$) нимфи и 0.15% ($n = 2$) ларви. Резултатите от кампаниите в основните 4 зони са представени в таблица 6.

Таблица 6. Разпределение по пол и стадий на развитие на събраните кърлежи по райони.

Район на проучване	Стадий на развитие/пол				Общо
	Женски	Мъжки	Нимфи	Ларви	
ЗМ „Кайлъка“	387	364	108	1	860
ПЗ „р. Чернелка“	114	103	48	1	266
Гривица м. „Тачова чешма“	26	38	61	0	125
Садовец м. „Гарван дол“	16	12	4	0	32
Други	8	4	2	0	14
Общо	551	521	223	2	1297

Средната измерена температура, при която са извършвани събиранията на *Ixodes ricinus* за седемте години на проучването е $19.27 \pm 4.48^\circ\text{C}$. Минималната температура, при която са събирани проби е 9°C , а максималната, при която са събирани е 29°C . Относителната влажност на въздуха (RH), при която успешно се залавят кърлежи по флага, варира от 32% до 96%, средно $63.12 \pm 15.53\%$ RH. Максималната активност изразена чрез плътност и честота на *Ixodes ricinus* е при 20°C и 60% RH (табл. 7).

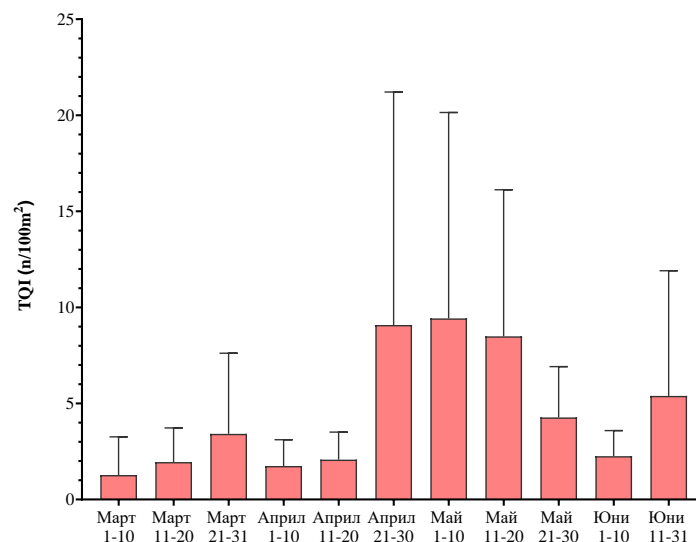
Таблица 7. Обща статистика за TF, RH, TQI и температурата, представени за целия период на изследването.

	N	Минимум	Максимум	\bar{x}	SD
TF (n/min)	73	0.02	3.67	0.56	0.43
TQI (n/100 m ²)	73	0.07	44.00	4.84	7.52
FQI (n/100 m ²)	67	0.5	24	2.33	3.64
MQI (n/100 m ²)	66	0.2	20	2.26	3.54
NQI (n/100 m ²)	45	0.6	8.57	1.28	1.92
Температура (°C)	73	9.00	29.00	19.27	4.48
Относителна влажност на въздуха (RH%)	73	32.00	96.00	63.12	15.53

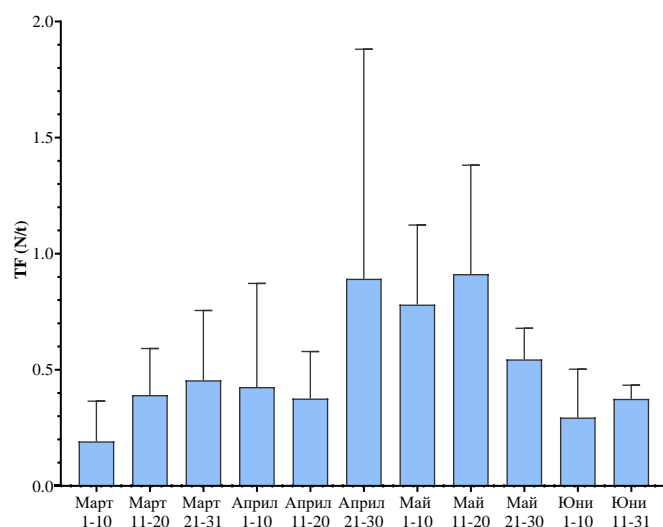
За Плевенска област, средната плътност на *Ixodes ricinus* за периода на проучването, представена чрез TQI, е 4.84 ± 7.52 индивиди на 100 m^2 с максимум 44 броя на 100 m^2 . Средната честота на улавяне (TF) е 0.56 ± 0.43 кърлежи за 1 минута, а максималната честота – 3.67 за минута (табл. 7).

Установи се, че активността на *I. ricinus* в търсенето на гостоприемници започва, след като температурата на околната среда мине 10°C , обикновено началото на месец март. Най-висока активност на причакване настъпва в края на април и продължава до края на май, след което през месец юни постепенно намалява с увеличаването на температурата и засушаването.

С цел да се установи максималното присъствие на активни *I. ricinus* в търсенето на гостоприемник периода на събиране е разделен на интервали от по 10 дни и са отчетени средните индекси TQI и TF (Фиг. 5 и 6). И при двете съпоставяния максимумът на дебнещи кърлежи е в периода от края на април до началото на месец юни.

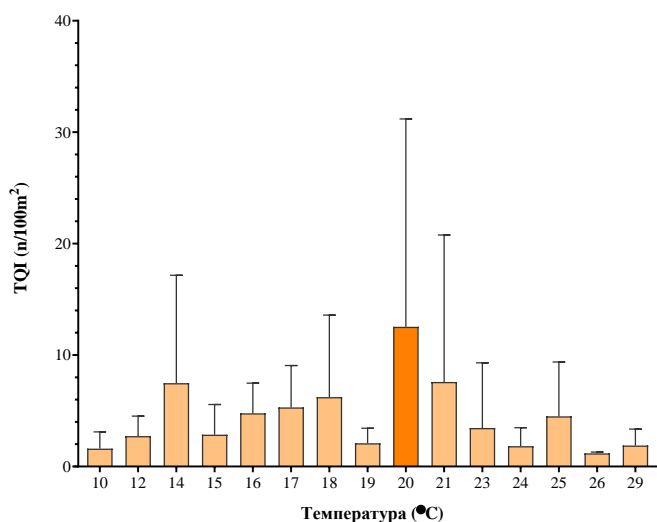


Фигура 5. Динамика на активно търсещите кърлежи, изразена с тяхната плътност (TQI) по 10 дневни интервали. Представени са средните честоти \pm стандартното отклонение за периода на изследване (2016-2022 г.).

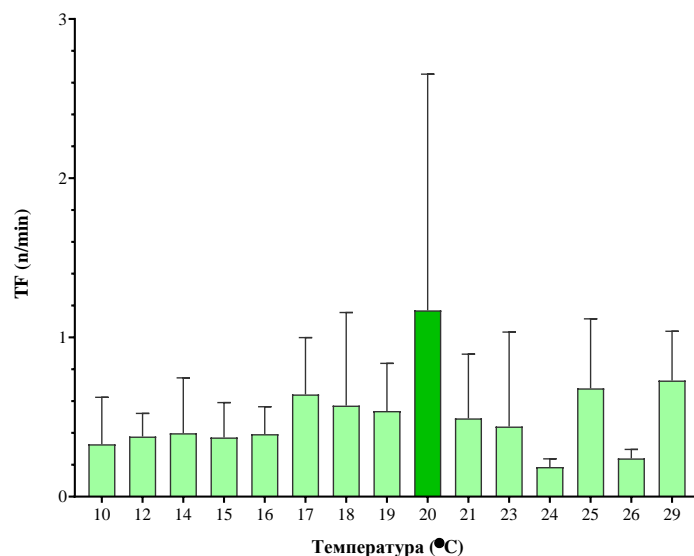


Фигура 6. Динамика на активно търсещите кърлежи, изразена с тяхната честота (TF) по 10 дневни интервали. Представени са средните честоти \pm стандартното отклонение за периода на изследване (2016-2022 г.).

Влиянието на температурата върху търсенето на гостоприемник от кърлежите е извършено чрез изчисляване на средните стойности на TQI и TF за съответните температурни интервали с точност до 1°C. Получените резултати са представени на фигури 7 и 8. Установи се, че при 20°C TQI на *I. ricinus* е най-голяма ($\bar{x} = 12.54$), а максимумът е 31.19 на 100 m². При същата температура е и максималната честота $\bar{x} = 1.17$, с максимум 2.65 индивида за минута.

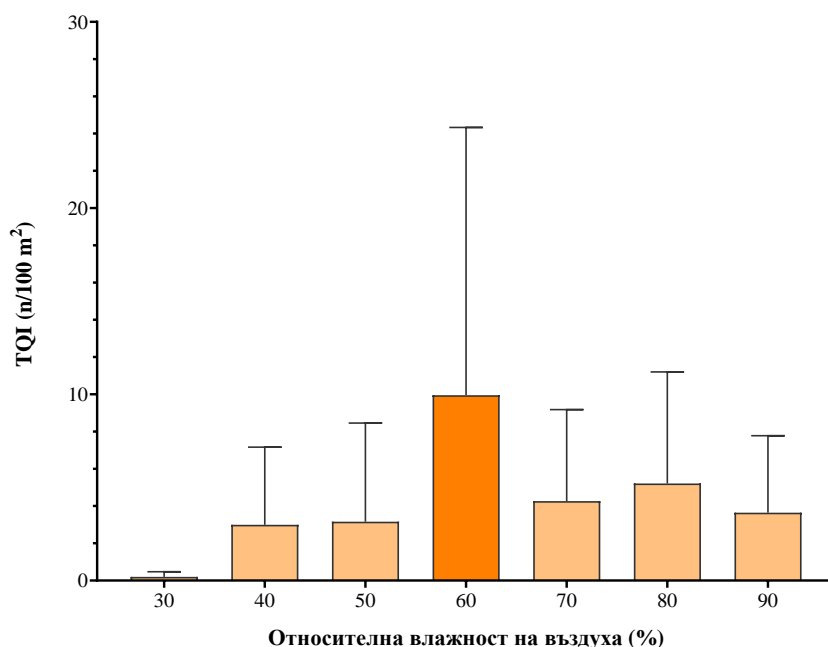


Фигура 7. Влияние на температурата върху плътността на активно търсещите кърлежи на 100 m². Представени са средните стойности за периода на проучването за 2016-2022 г. \pm SD.

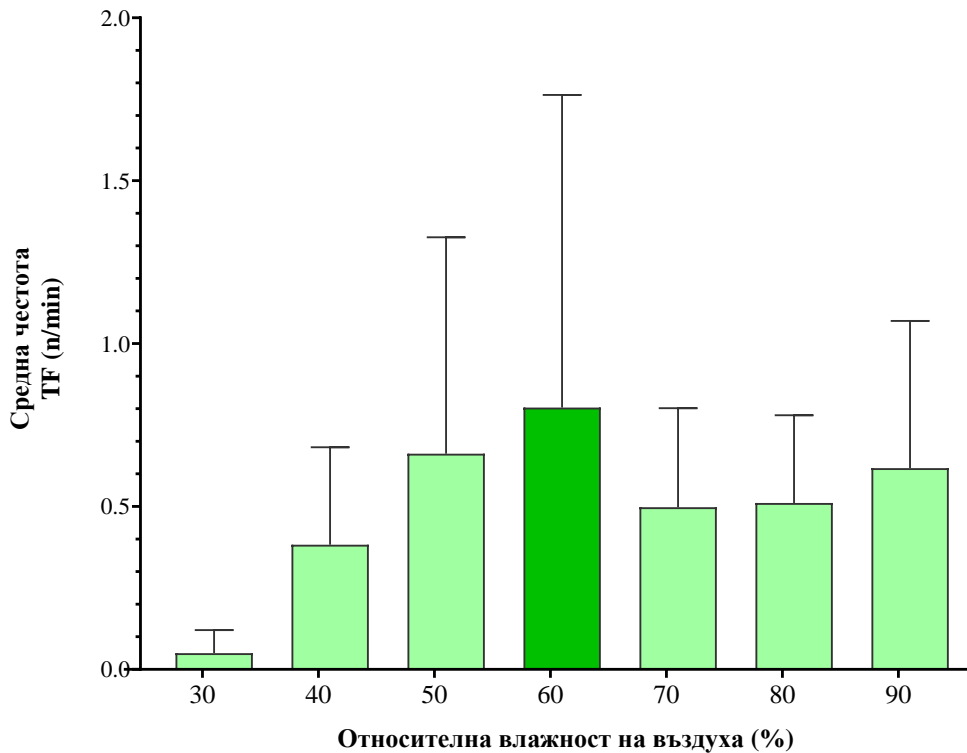


Фигура 8. Влияние на температурата върху честотата на активно търсещите кърлежи. Представени са средните стойности за периода на проучването 2016-2022 г. \pm SD.

Влиянието на относителната влажност на въздуха върху активността на *Ixodes ricinus* в търсене на гостоприемник е проучено подобно на температурата. Индексите TQI и TF са осреднени за отчетените стойности на интервали от 10% RH и представени графично на фигури 9 и 10. Най-висока плътност и честота е установена при 60% RH. Като за TQI, $\bar{x} = 9.96$, с максимум 24.33 индивида за 100 m². За TF $\bar{x} = 0.8$, с максимум 1.76 захванати кърлежа за 1 min.



Фигура 9. Влияние на относителната влажност на въздуха върху плътността на активно търсещите кърлежи на 100 m². Представени са средните стойности за периода на проучването 2016-2022 г. \pm SD.



Фигура 10. Влияние на относителната влажност на въздуха върху честотата на активно търсещите *I. ricinus*. Представени са средните стойности на TF за периода на проучването 2016-2022 $\bar{x} \pm SD$.

2.1. Защитена местност „Кайлъка“

Доминиращият вид кърлежи, който се събира чрез флагиране в района на ЗМ „Кайлъка“ е *Ixodes ricinus*. В района на х. Спартак, за първи път в България е уловен активно търсещ женски кърлеж от вида *Ixodes frontalis*. В тревните площи на зоокъта, намиращ се в парковата част при флагиране е уловен мъжки индивид *Haemaphysalis punctata*. За периода на проучването най-голям брой *Ixodes ricinus* ($n = 860$) са събрани и изследвани от площите на ЗМ „Кайлъка“. Общата изчислена плътност (TQI) в ЗМ „Кайлъка“ е 5.89 ± 8.60 , а честотата (TF) е 0.61 ± 0.46 . В таблица 8 е представена информация относно разпределението по пол, стадия на развитие и годините на събиране. Най-висока плътност на кърлежи е установена през 2017 г. ($n = 49$; $\bar{x} = 20.48 \pm 19.53$), най-голяма честота на улавяне е измерена през 2018 г. ($n = 142$; $\bar{x} = 0.93 \pm 0.57$)

Таблица 8. Събрани *I. ricinus* кърлежи от ЗМ „Кайлъка“ представени по години и стадий на развитие. Представени са средната плътност и честота на *I. ricinus*.

Година	Пол/ стадий на развитие					TQI		TF	
	Женски	Мъжки	Нимфи	Ларви	Общо	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
2016	67	44	10	0	121	2.13 ± 1.63		0.45 ± 0.32	
2017	28	14	7	0	49	20.48 ± 19.53		0.62 ± 0.5	
2018	54	76	11	1	142	7.68 ± 13.83		1.15 ± 1.01	
2019	102	108	30	0	240	5.82 ± 7.20		0.55 ± 0.042	
2020	54	42	9	0	105	5.12 ± 4.71		0.66 ± 0.47	
2021	66	59	26	0	151	5.36 ± 3.92		0.59 ± 0.39	
2022	16	21	15	0	52	1.2 ± 0.8		0.27 ± 0.16	
Общо	387	364	108	1	860	5.89 ± 8.60		0.64 ± 0.58	

1. TQI (Total Ticks Questing Index) Обща плътност на активни *Ixodes ricinus* (n/100 m²).

2. TF (Ticks Frequency) Честота на активни *Ixodes ricinus* (n/min).

За периода на проучването в ЗМ „Кайлъка“ от поддържаните тревни площи са събрани общо 289 броя *Ixodes ricinus* съответно TQI = 5.56 ± 9.08 и TF = 0.53 ± 0.43, а от естествените (неподдържани) райони 571 броя с TQI = 6.29 ± 8.14 и TF = 0.73 ± 0.49.

В неподдържаните зони най-висока честота се установява на територията на Бохотската гора (W4) TF = 0.92 ± 0.21, а в поддържаните части на парка в U4 (TF = 0.84 ± 0.76). Най-голяма плътност на кърлежи в поддържаните естествени зони е установена отново в района на U4 (TQI = 9.93 ± 19.07), а от неподдържаните в района около х. „Среброструй“ W2 (TQI = 11.14 ± 12.79) (табл. 9).

Таблица 9. Разпределение на събраните кърлежи *Ixodes ricinus* от ЗМ „Кайлъка“ по зони, според употреба и поддръжка на зелените площи.

Зони в ЗМ „Кайлъка“						TQI ¹	TF ²
	Женски	Мъжки	Нимфи	Ларви	Общо	($\bar{X} \pm SD$)	($\bar{X} \pm SD$)
Поддържани	142	112	34	1	289	5.56 ± 9.08	0.53 ± 0.43
U1	23	14	9	0	46	2.08 ± 1.68	0.22 ± 0.19
U2	39	27	6	0	72	4.55 ± 3.89	0.5 ± 0.28
U3	28	30	12	0	70	7.43 ± 9.72	0.58 ± 0.26
U4	52	41	7	1	101	9.93 ± 19.07	0.84 ± 0.76
Неподдържани	245	252	74	0	571	6.29 ± 8.14	0.73 ± 0.49
W1	120	127	36	0	283	5.48 ± 5.31	0.70 ± 0.48
W2	46	41	21	0	108	11.14 ± 12.79	0.76 ± 0.50
W3	20	20	7	0	47	1.57 ± 1.73	0.61 ± 0.73
W4	59	64	10	0	133	5.59 ± 8.37	0.92 ± 0.21
Общо	387	364	108	1	860	5.89 ± 8.60	0.61 ± 0.46

1. TQI (Total Ticks Questing Index) Обща плътност на активни *Ixodes ricinus* (n/100 m²).

2. TF (Ticks Frequency) Честота на активни *Ixodes ricinus* (n/min).

2.2. Природна забележителност „Карстово ждрело на р. Чернелка“

От района на ПЗ „Чернелка“ са събрани общо 266 броя кърлежи при проведени 12 кампании за събиране. Сто и четиринадесет от тях са женски, 103 мъжки, 48 нимфи и 1 ларва. Разпределението на събраните кърлежи по години и стадий на развитие са представени в таблица 10. Всички индивиди са от вида *Ixodes ricinus*. Общо за целия период се установява, че $TQI=1.61 \pm 3.16$ и $TF = 0.012 \pm 0.16$. Най-голяма плътност и честота на кърлежи е отчетена в района на бившата х. „Капчука“ $TQI = 3.25 \pm 0.49$; $TF = 0.58 \pm 0.06$.

Таблица 10. Разпределение по години и стадий на развитие на събраните активно търсеци *Ixodes ricinus* от района на ждрелото на р. Чернелка.

Година	Стадий на развитие/пол				Общо
	Женски	Мъжки	Нимфа	Ларва	
2016	25	15	1	1	42
2017	22	22	8	0	52
2018	8	14	4	0	26
2019	1	1	0	0	2
2021	5	15	10	0	30
2022	53	36	25	0	114
Общо	114	103	48	1	266

2.3. С. Гривица м. „Тачова чешма“

Събирането на кърлежи в тази местност се проведе през периода от 2016 до 2019 г. Общо са събрани 125 кърлежи *Ixodes ricinus*, 26 женски, 38 мъжки и 61 нимфи. В района са улавяни също така отделни индивиди *Dermacentor marginatus* и *Haemaphysalis punctata*. Плътността на *I. ricinus* в м. „Тачова чешма“ е $TQI = 6.82 \pm 6.5$, а честотата $TF = 0.75 \pm 0.25$.

2.4. С. Садовец, м. „Гарван дол“

В тази зона са събрани 56 иксодови кърлежи – 32 екземпляра *Ixodes ricinus* и 24 екземпляра *Dermacentor marginatus* от общо 4 кампании (една без събран материал). Разпределението по пол и стадий на развитие на *I. ricinus* е, както следва: 16 женски, 12 – мъжки и 4 нимфи – $TQI = 0.69 \pm 0.08$, $TF = 0.21 \pm 0.54$.

3. СРАВНЯВАНЕ ПОПУЛАЦИИТЕ НА *I. RICINUS* МЕЖДУ РАЗЛИЧНИТЕ РАЙОНИ НА ПРОУЧВАНЕ

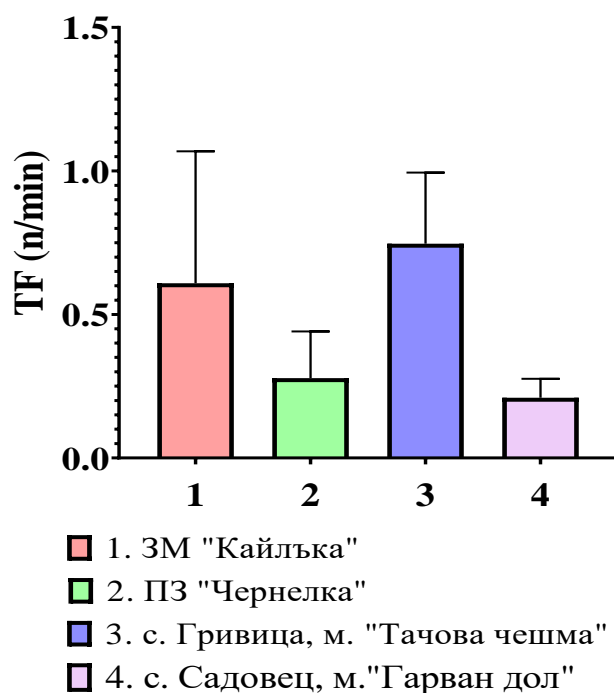
Разпределението на данните за параметрите TF, TQI, MQI, NQI, t, RH е проверено с теста на Shapiro-Wilk. При достоверност на теста ($p < 0.05$) нулевата хипотеза за нормално разпределение се отхвърля, т.е. разпределението на данните е различно от нормалното. Разпределението при изследваните количествени променливи показват значително отклонение от нормалността при TF, TQI, FQI, MQI, NQI и относителната влажност. С нормално разпределение е само показателят температура (табл. 11).

Таблица 11. Тест на Shapiro-Wilk за разпределение на данните от изследваните показатели.

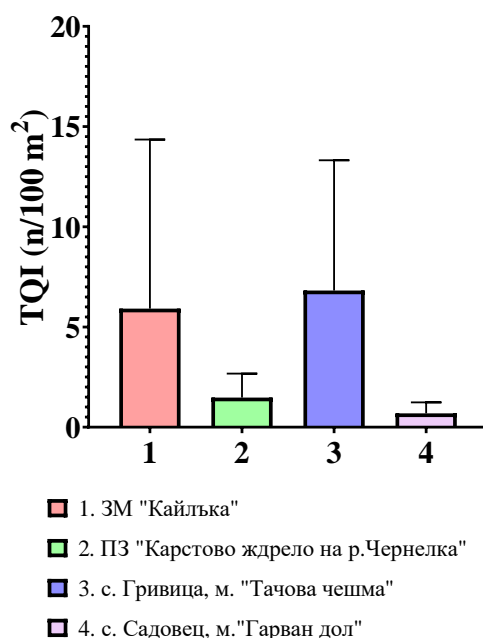
Показател	Shapiro-Wilk		
	W	Df (степени на свобода)	Sig.(p)
TF ¹	0.865	75	0.001
TQI ²	0.606	75	0.001
FQI ³	0.566	67	0.001
MQI ⁴	0.601	66	0.001
NQI ⁵	0.611	45	0.001
Температура	0.979	75	0.240
Относителна влажност на въздуха	0.961	75	0.021

1. TF (Ticks Frequency) Честота на активни *Ixodes ricinus* (n/min).
2. TQI (Total Ticks Questing Index) Обща плътност на активни *Ixodes ricinus* (n/100 m²).
3. FQI (Female Ticks Questing Index) Плътност на активни женски *Ixodes ricinus* (n/100 m²).
4. MQI (Male Ticks Questing Index) Плътност на активни мъжки *Ixodes ricinus* (n/100 m²).
5. NQI (Nymph Ticks Questing Index) Плътност на активни нимфи *Ixodes ricinus* на (n/100 m²).

Изобилието от *I. Ricinus*, оценено чрез индексите TF и TQI е най-голямо в м. „Тачова чешма“. Изчислена средна честота – $0,75 \pm 0.25$ n/min; средна плътност 6.82 ± 6.5 n/100 m². В ЗМ „Кайлъка“ TF = 0.61 ± 0.46 n/min; TQI = 5.89 ± 8.60 n/100 m². В ПЗ „Чернелка“: TF = 0.28 ± 0.16 n/min; TQI = 1.48 ± 1.2 n/100 m². Най-ниски стойности се изчислиха за събраните кърлежи от м. „Гарван дол“: TF = 0.13 ± 0.18 n/min; TQI = 1.18 ± 1.83 n/100 m² (фиг. 11 и 12).



Фигура 11. Честота на активно причакващите *I. ricinus* в различните зони на флагиране за периода 2016-2022 г. Бокс-плътът е представен чрез средните стойности на TF и стандартното отклонение.



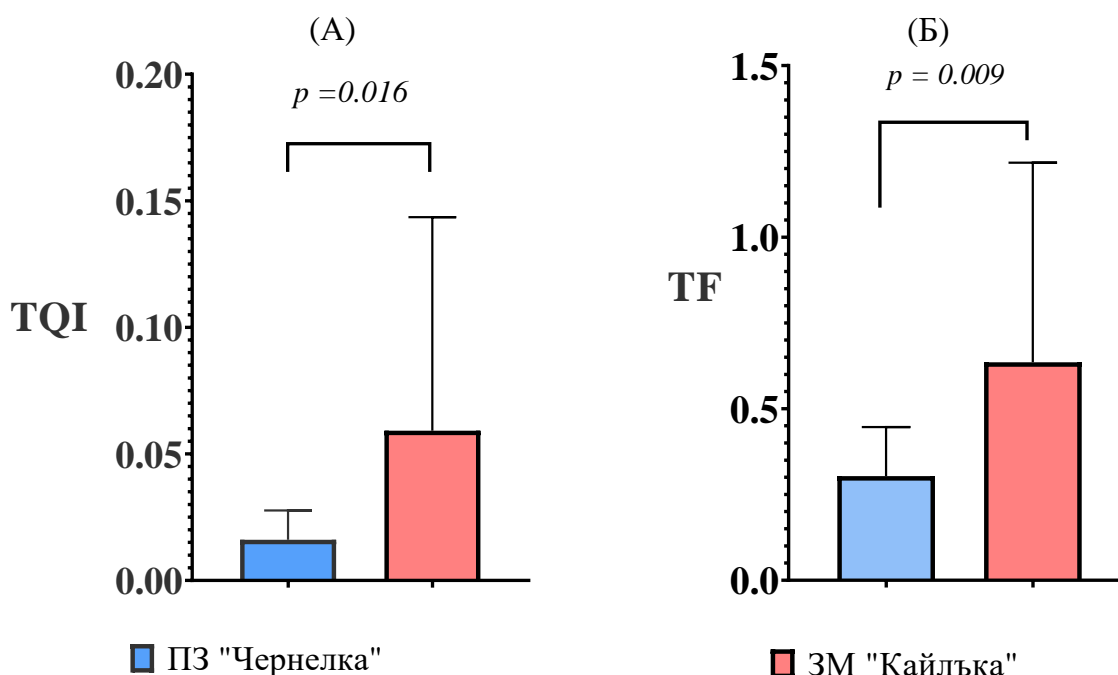
Фигура 12. Плътност на активно причакващите *I. ricinus* в зоните на флагиране за периода 2016-2022 г. Бокс-плътът е представен чрез средните стойности на TQI и стандартното отклонение.

При проведения анализ на вариацията (Kruskal-Wallis) между основните зони на събиране (ЗМ „Кайлъка“, ПЗ „Чернелка“, м. „Тачова чешма“, м. „Гарван дол“) с различните индекси за плътност и честота се установиха различия ($p < 0.05$) по отношение на TF $H(3) = 11.77$; $p = 0.008$; TQI $H(3) = 9.7$, $p = 0.021$; MQI $H(3) = 10.84$, $p = 0.013$; NQI $H(3) = 8.51$, $p = 0.037$.

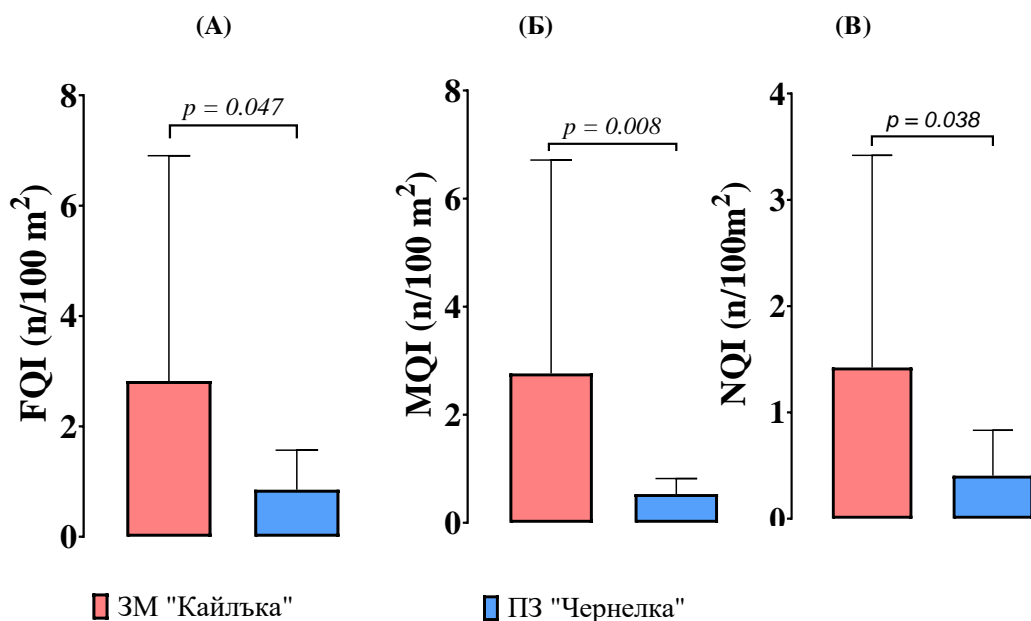
За да се определи дали има разлики в индексите между различните зони, от които са събирани кърлежите индексите TF и TQI между всеки две от зоните са сравнени чрез Mann-Whitney U test. Статистически значими разлики се установиха, както следва:

3.1. ЗМ „Кайлъка“ – ПЗ „Чернелка“

- TQI $U(N_{\text{Кайлъка}} = 54, N_{\text{Чернелка}} = 12) = 179.5$, $z = -2.402$, $p = 0.016$ (фиг. 13 А);
- TF $U(N_{\text{Кайлъка}} = 54, N_{\text{Чернелка}} = 12) = 166.0$, $z = -2.628$, $p = 0.009$ (фиг. 13 Б);
- FQI $U(N_{\text{Кайлъка}} = 50, N_{\text{Чернелка}} = 10) = 150$, $z = -1.984$, $p = 0.047$ (фиг. 14 А);
- MQI $U(N_{\text{Кайлъка}} = 49, N_{\text{Чернелка}} = 11) = 131.5$, $z = -2.636$, $p = 0.008$ (фиг. 14 Б);
- NQI $U(N_{\text{Кайлъка}} = 30, N_{\text{Чернелка}} = 8) = 62$, $z = -2.077$, $p = 0.038$ (фиг. 14 В);



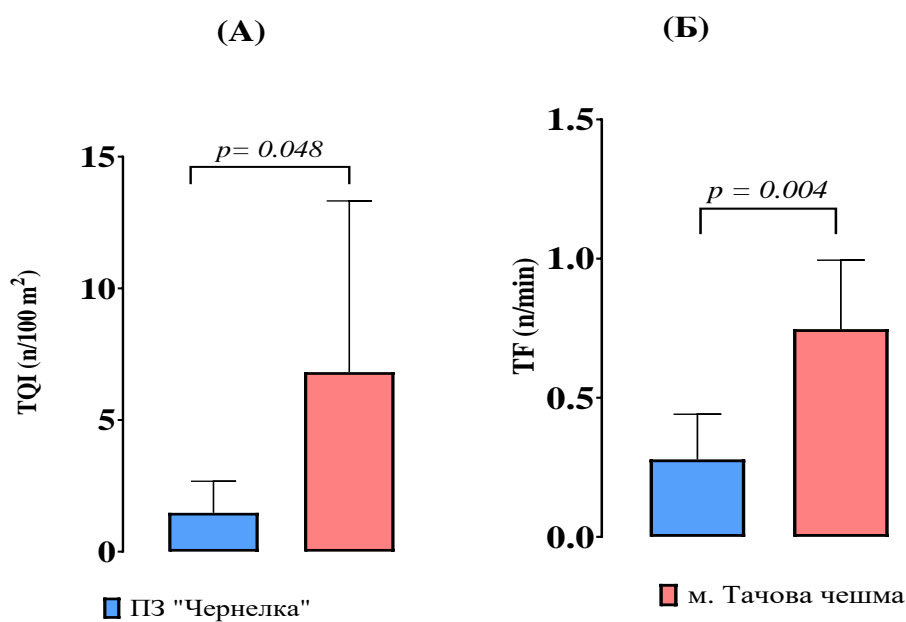
Фигура 13. Статистически значими разлики при сравняването на TQI (А) и TF (Б) в ПЗ „Чернелка“ и ЗМ „Кайлъка“. На бокс-плота са представени средните стойности и стандартното отклонение.



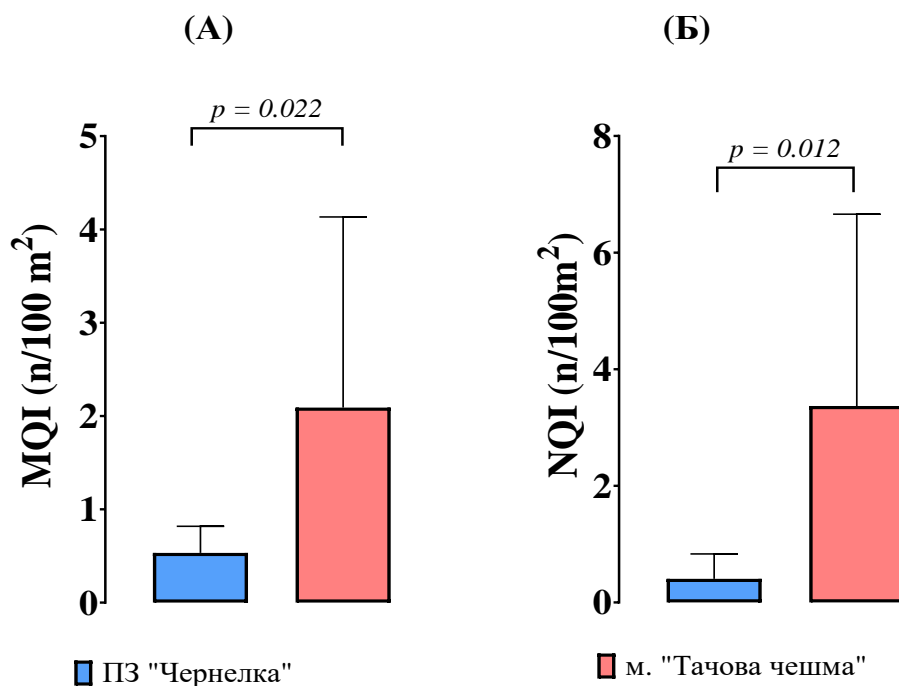
Фигура 14. Статистически значими разлики при сравняването на FQI (A), MQI (Б) и NQI (B) между ПЗ „Чернелка“ и ЗМ „Кайлъка“. На бокс-плота са представени средните стойности и стандартното отклонение.

3.2. ПЗ „Чернелка“ – с. Гривица м. „Тачова чешма“

- TQI U ($N_{\text{Чернелка}} = 12, N_{\text{Гривица}} = 3$) = 4, $z = -2.021, p = 0.048$ (фиг 15 А);
- TF U ($N_{\text{Чернелка}} = 12, N_{\text{Гривица}} = 3$) = 0, $z = -2.598, p = 0.004$ (фиг. 15 Б);
- MQI U ($N_{\text{Чернелка}} = 11, N_{\text{Гривица}} = 1$) = 2, $z = -2.258, p = 0.022$ (фиг. 16 А);
- NQI U ($N_{\text{Чернелка}} = 8, N_{\text{Гривица}} = 3$) = 0, $z = -2.449, p = 0.012$ (фиг. 16 Б).



Фигура 15. Статистически значими разлики при сравняването на TQI (A) и TF (Б) и NQI (B) между ПЗ „Чернелка“ и м. „Тачова чешма“ край с. Гривица.



Фигура 16. Статистически значими разлики при сравняването на MQI (А) и NQI (Б) в ПЗ „Чернелка“ и м. „Тачова чешма“.

При сравняване на зоните ЗМ „Кайлъка“ – с. Гривица м. „Тачова чешма“, ЗМ „Кайлъка“ – м. „Гарван дол“, ПЗ „Чернелка“ – м. „Гарван дол“ и с. Гривица м. „Тачова чешма“ – м. „Гарван дол“, не се установиха статистически значими разлики.

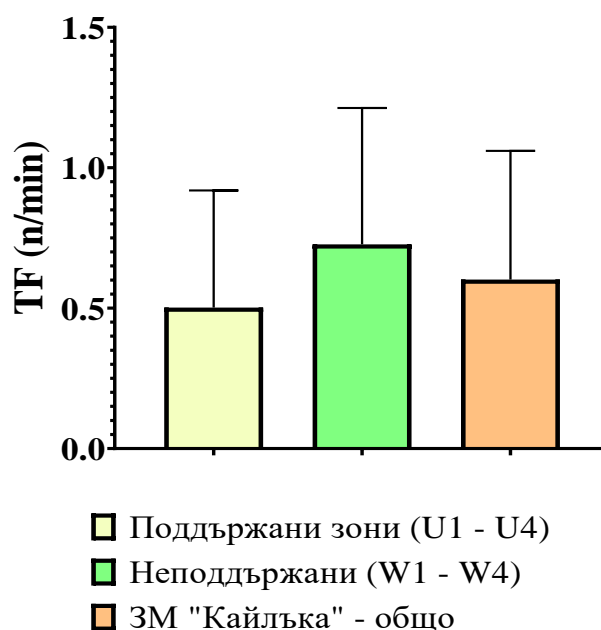
4. РЕЗУЛТАТИ ОТ КАМПАНИИТЕ ПО СЪБИРАНЕ НА *Ixodes ricinus* В ЗМ „КАЙЛЪКА“.

В опит да се установи дали наличието на активно търсещи *Ixodes ricinus* кърлежи се повлиява от човешката дейност, се сравниха изчислените индекси от различните зони в ЗМ „Кайлъка“.

За сравняване между поддържаните (U) и (W) неподдържани площи в ЗМ „Кайлъка“ е използван теста на Mann-Whitney. Не се установяват статистически значими разлики между поддържаните (урбанизирани) и неподдържаните (естествени) зони в ЗМ „Кайлъка“ (табл. 12 и фиг. 17).

Таблица 12. Тест на Mann-Whitney за сравняване на индексите за наличие на *Ixodes ricinus* в урбанизирани (U) и (W) неподдържани площи в ЗМ „Кайлъка“.

ЗМ „Кайлъка“		Брой флагирания (N)	Mean Rank	Sum of Ranks	Mann- Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2- tailed)
TF	U	29	23.09	669.50	234.5	669.5	-1.83	0.068
	W	23	30.80	708.50				
	Общо	52						
TQI	U	29	25.21	731.00	296	731	-0.69	0.49
	W	23	28.13	647.00				
	Общо	52						
FQI	U	25	25.32	633.00	267	543	-0.42	0.672
	W	23	23.61	543.00				
	Общо	48						
MQI	U	24	23.83	572.00	272	572	-0.09	0.932
	W	23	24.17	556.00				
	Общо	47						
NQI	U	12	16.25	195.00	75	211	-0.98	0.330
	W	16	13.19	211.00				
	Общо	28						



Фигура 17. Честота на активно причакващите *I. ricinus* събрани от ЗМ „Кайлъка“ в поддържани и естествени неподдържани участъци. Бокс-плотът е представен чрез средните стойности на TF и стандартното отклонение.

Mann-Whitney U test е приложен, за да се установят разлики в разпространението на *Ixodes ricinus* между различните двойки зони. Резултатите са представени в таблица 13 и фигури 18 – 22.

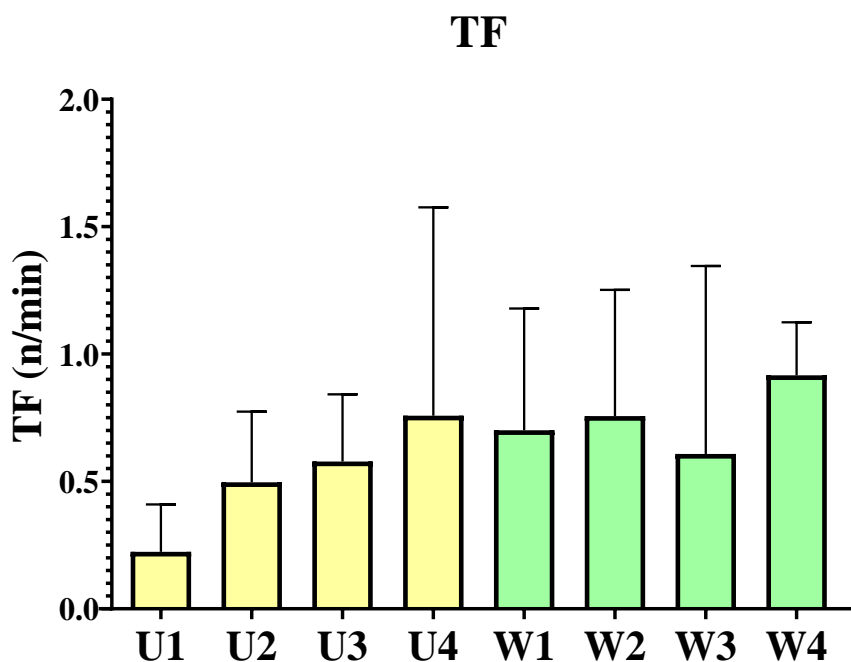
Таблица 13. Mann-Whitney U test за сравняване на показателите с неравномерно разпределени данни между различните урбанизирани (U) и неподдържани (W) зони в ЗМ „Кайлъка“.

Зони	Статистически значима разлика в	Среден ранг (mean rank)	Медиана	\bar{X}	SD	U	N	Z	p
U1	TF ¹	3.83	0.14	0.23	0.19	2	6	-2.58	0.009
U3		9.17	0.64	0.58	0.26		6		
U1	TF	4.33	0.14	0.23	0.19	5	6	-2.72	0.005
W1		11	0.55	0.70	0.48		10		
U1	TF	4.17	0.14	0.23	0.19	4	6	-2.26	0.026
W2		8.83	0.77	0.76	0.49		6		
U1	TF	3.5	0.14	0.23	0.19	0	6	-2.36	0.024
W4		8	1.00	0.91	0.21		3		
U2	FQI ³	9.45	0.50	0.49	0.28	6	11	-2.09	0.04
W3		4	0.43	0.69	0.76		4		
U2	TF	6.71	2.36	2.32	1.50	2.5	12	-2.24	0.018
W4		13.17	1.00	0.91	0.21		3		
W1	TQI ²	8.9	3.16	5.48	5.31	6	10	-1.98	0.048
W3		4	0.86	1.57	1.73		4		

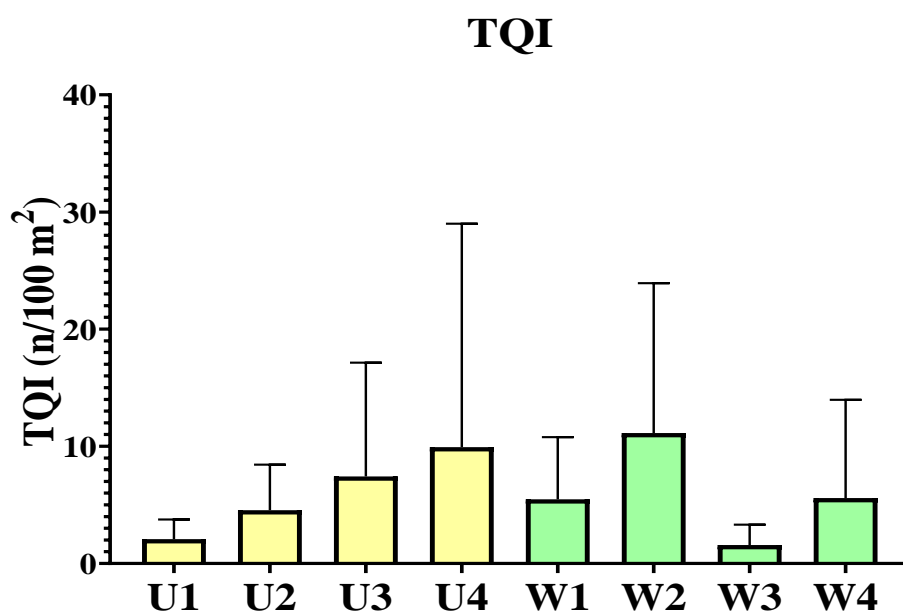
1. TF (Ticks Frequency) Честота на активни *Ixodes ricinus* (n/min).

2. TQI (Total Ticks Questing Index) Обща плътност на активни *Ixodes ricinus* (n/100 m²).

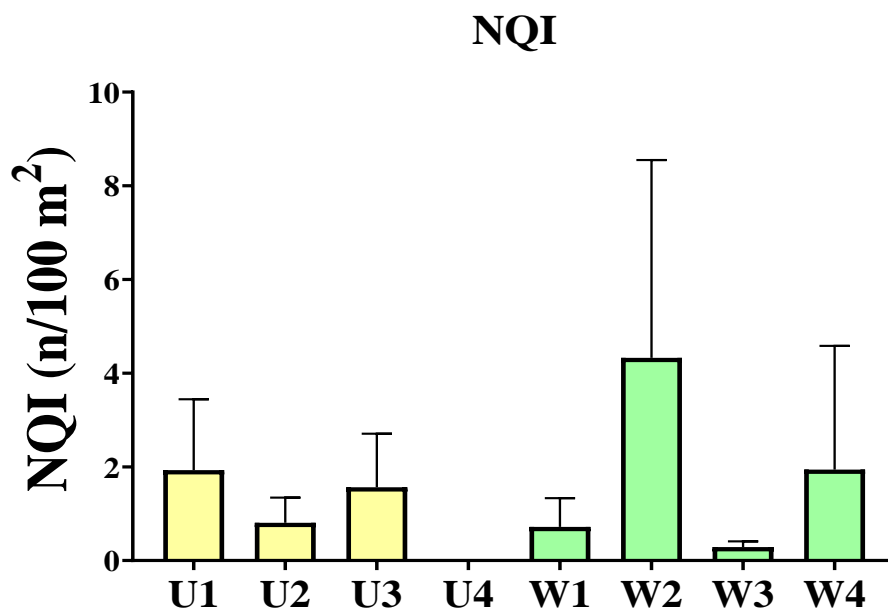
3. FQI (Female Ticks Questing Index) Плътност на активни женски *Ixodes ricinus* (n/100 m²).



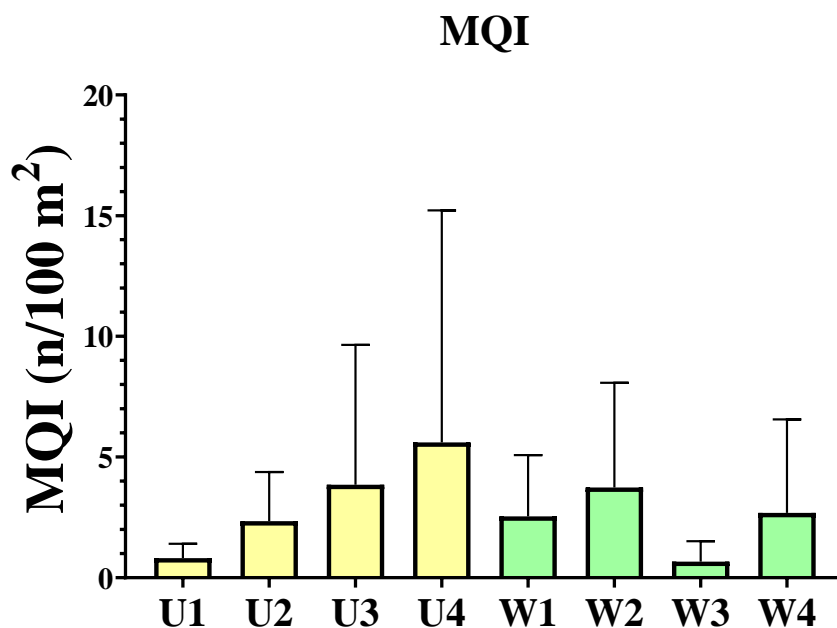
Фигура 18. Честота на активно причакващите *Ixodes ricinus* (TF) в осем зони на флагиране в ЗМ „Кайлъка“. Бокс-плътът е представен чрез средните стойности на TF и стандартното отклонение.



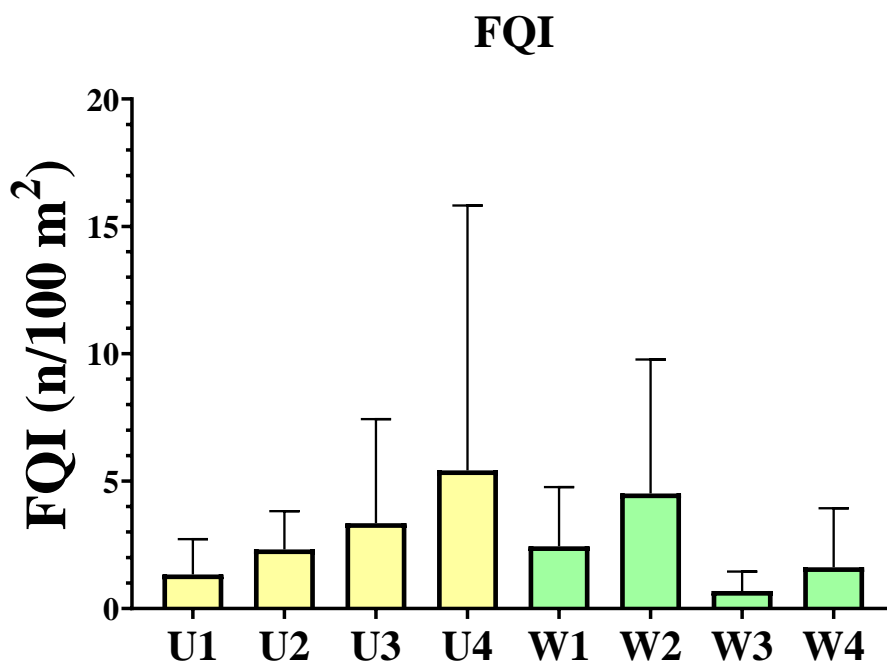
Фигура 19. Плътност на активно причакващите *Ixodes ricinus* (TQI) в осем зони на флагиране в ЗМ „Кайлъка“. Бокс-плътът е представен чрез средните стойности на TQI и стандартното отклонение.



Фигура 20. Плътност на активно причакващите *Ixodes ricinus* нимфи в осем зони на флагиране в ЗМ „Кайлъка“. Бокс-плотът е представен чрез средните стойности на NQI и стандартното отклонение.



Фигура 21. Плътност на активно причакващите мъжки *I. ricinus* в осем зони на флагиране в ЗМ „Кайлъка“. Бокс-плотът е представен чрез средните стойности на MQI и стандартното отклонение.



Фигура 22. Плътност на активно причакващите женски *I. ricinus* в осем зони на флагиране в ЗМ „Кайлъка“. Бокс-плотът е представен чрез средните стойности на FQI и стандартното отклонение.

5. ТЪМНОПОЛЕВА МИКРОСКОПИЯ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА *BORRELIA BURGDORFERI* S.L.

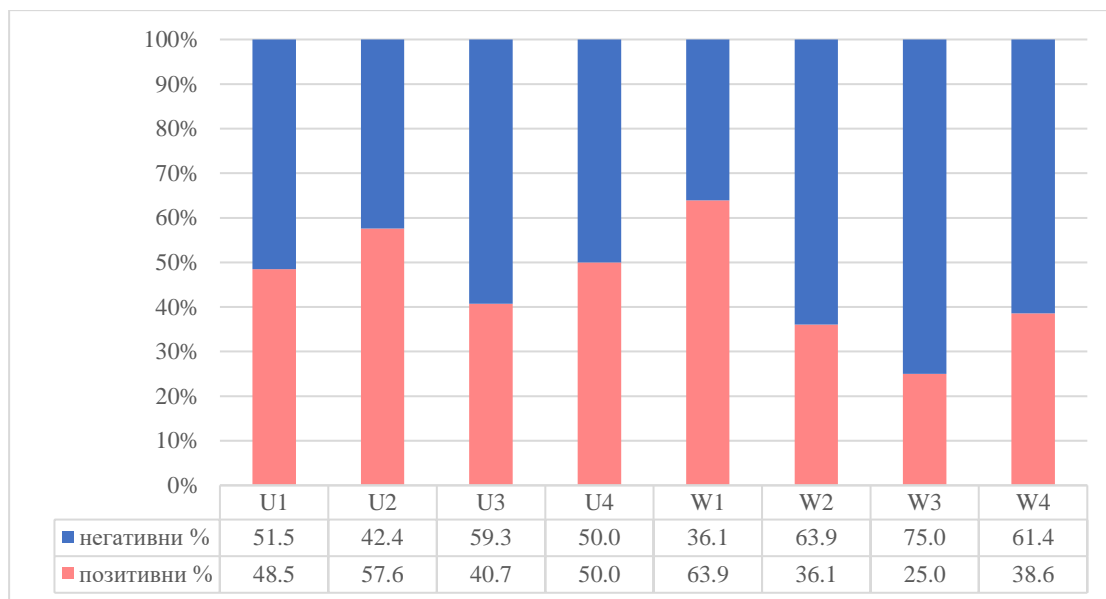
За периода на проучването са изследвани общо 394 кърлежа за наличие на *Borrelia* sp. В 129 (32.94%) от тях са наблюдавани спирохети (68 женски; 41 мъжки и 20 нимфи). Резултатите от ТПМ в различните изследвани зони са представени в таблица 14. През годините, в които е извършвана ТПМ най-много инфектирани кърлежи са отчетени през 2017 г. - 49.25% от 67 изследвани индивида. Установява се връзка между годините и инфектираността с борелии $\chi^2(3, N = 394) = 14.94, p = 0.002$. При сравняване на половозрелите форми се открива разлика в инфектираността с *B. burgdorferi* s.l. между женските и мъжките $\chi^2(2, N = 330) = 5.72, p = 0.019$.

Таблица 14. Данни от ТПМ за наличие на *Borrelia burgdorferi* s.l. в съответните зони на флагиране, разпределени по стадий на развитие и пол.

Пол/ стадий	ТПМ	ЗМ „Кайлъка“	ПЗ „Чернелка“	С. Садовец м. „Гарван дол“	Гривица м. „Тачова чешма“	Плевен
Женски	Негативни	74 (62.18%)	18 (47.37%)	6 (100%)	8 (72.73%)	1 (100%)
	Позитивни	45 (37.82%)	20 (52.63%)	0 (0%)	3 (27.27%)	0 (0%)
Мъжки	Негативни	71 (73.2%)	21 (61.76%)	3 (100%)	19 (90.48%)	0 (0%)
	Позитивни	26 (26.8%)	13 (38.24%)	0 (0%)	2 (9.52%)	0 (0%)
Нимфи	Негативни	13 (68.42%)	3 (42.86%)	0 (0%)	27 (72.97%)	1 (100%)
	Позитивни	6 (31.58%)	4 (57.14%)	0 (0%)	10 (27.03%)	0 (0%)
Общо	Негативни	158 (67.23%)	42 (53.16%)	9 (100%)	54 (78.26%)	2 (100%)
	Позитивни	77 (32.77%)	37 (46.84%)	0 (0%)	15 (21.74%)	0 (0%)

6. ПРОУЧВАНЕ НА ЗМ „КАЙЛЪКА“ ЗА НАЛИЧИЕ НА *BORRELIA BURGENDORFERI* S.L. В КЪРЛЕЖИ ОТ ВИДА *IXODES RICINUS*

От събраните общо 860 кърлежи *Ixodes ricinus*, 405 са изследвани за наличие на борелии с поне един от трите метода. Позитивни – 183 (45.2%). Чрез тъмнополева микроскопия са изследвани 235 индивида, като в 77 (32.5%) се установява наличие на спирохети. Чрез PCR са тествани 202 кърлежа за наличие на спирохети от комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l., като 97 (48%) от тях позитивират при амплификацията на *23S/5S igs* гена и 104 (51.5%) – на *FlaB* гена. Резултатите от проведените тестове за поддържаните и неподдържаните площи в ЗМ „Кайлъка“ са представени в таблица 15. Събраните и тествани кърлежи за наличие на борелии по години, както и получените резултати са представени в таблица 16. На фигура 23 са представени процентните съотношения между позитивни и негативни *Ixodes ricinus* в различните зони на ЗМ „Кайлъка“. В неподдържаната зона W4 се установяват най-голям процентен дял позитивни кърлежи (63.9%), следвани от тези събрани от урбанизирана зона U2 (57.6%).



Фигура 23. Процентен дял на позитивни и негативни *Ixodes ricinus* в различните зони на ЗМ „Кайлъка“. Броят на позитивните е на базата на позитивирани кърлежи, по които и да е метод на изследване.

По-висок процент инфектирани кърлежи, независимо от метода на изследване, се наблюдава при тези от градските поддържани площи, но липсва статистически значима разлика, – 49.66 % спрямо 42.69 % ($\chi^2 = 1.822$ $n = 405$; $df = 1$ $p = 0.177$).

Таблица 15. Резултати от изследването на *Ixodes ricinus* за наличие на *Borrelia burgdorferi* s.l. в изследваните зони на ЗМ "Кайлъка".

Зони на събиране в ЗМ „Кайлъка“	Вид тест				Детекция на <i>Borrelia</i> sp. в <i>I. ricinus</i> чрез, който и да е тест Процент на заразени кърлежи (%) и брой позитивни проби (n)
	Брой събрани кърлежи	nPCR _{23S/5S} Инфектирани кърлежи (%) и брой на позитивните спрямо тестваните проби (n)	nPCR _{FlaB} Инфектирани кърлежи (%) и брой на позитивните спрямо тестваните проби (n)	ТПМ Инфектирани кърлежи (%) и брой на позитивните спрямо тестваните проби (n)	
Градски площи	289	46.25 (n = 37/80)	51.251 (n = 41/80)	40.54 (n = 30/74)	49.66 (n = 72/145)
U1	46	55.56 (n = 10/18)	61.11 (n = 11/18)	43.48 (n = 10/23)	51.52 (n = 16/33)
U2	72	38.10 (n = 8/21)	52.38 (n = 11/21)	40.00 (n = 6/12)	57.6 (n = 19/33)
U3	70	47.06 (n = 8/17)	47.06 (n = 8/17)	22.22 (n = 2/9)	40.7 (n = 11/27)
U4	101	45.83 (n = 11/24)	45.83 (n = 11/24)	44.44 (n = 12/27)	50 (n = 26/52)
Неподдържани площи	571	49.18 (n = 60/122)	51.64 (n = 63/122)	29.19 (n = 47/161)	42.69 (n = 111/260)
W1	283	54.10 (n = 33/61)	54.10 (n = 33/61)	25.00 (n = 1/4)	63.93 (n = 39/61)
W2	108	58.82 (n = 10/17)	64.71 (n = 11/17)	23.40 (n = 11/47)	36.07 (n = 22/61)
W3	47	0.00 (n = 0/3)	0.00 (n = 0/3)	27.27 (n = 6/22)	25 (n = 6/24)
W4	133	41.46 (n = 17/41)	46.34 (n = 19/41)	32.95 (n = 29/88)	38.6 (n = 44/114)
Общо	860	48.02 (n = 97/202)	51.49 (n = 104/202)	32.77 (n = 77/235)	45.19 (n = 183/405)

Таблица 16. Резултати от ТПМ, nPCR5S-23Sigs и nPCRFlaB за инфекция с *Borrelia* в *I. ricinus* по време на кампанията за събиране (2016-2021 г.) в ЗМ "Кайлъка".

Година на събиране		2016				2017				2018				2019				2021			
Събрани кърлежи		121				49				142				240				151			
Метод		ТПМ	nPCR _{5S-23Sigs}	nPCR _{FlaB}	Позитивирани, по който и да е тест	ТПМ	nPCR _{5S-23Sigs}	nPCR _{FlaB}	Позитивирани, по който и да е тест	ТПМ	nPCR _{5S-23Sigs}	nPCR _{FlaB}	Позитивирани, по който и да е тест	ТПМ	nPCR _{5S-23Sigs}	nPCR _{FlaB}	Позитивирани, по който и да е тест	ТПМ	nPCR _{5S-23Sigs}	nPCR _{FlaB}	Позитивирани, по който и да е тест
Изследвани кърлежи		112	7	7	113	27	-	-	27	74	27	27	82	22	108	108	123	-	60	60	60
Резултати	Позитивни	33	3	3	37	12	-	-	12	27	8	10	33	5	53	58	66	-	33	32	35
	Негативни	79	4	4	76	27	-	-	27	47	19	17	49	17	55	50	55	-	27	28	25

При сравняването (чрез метода χ^2) на позитивно отчетените проби, по които и да е от методите между различните зони в ЗМ „Кайлъка“, се установяват статистически значими разлики между някои от тях. В поддържана зона U2 кърлежите, позитивни за *V. burgdorferi* s.l. са сигнификантно повече от тези в неподдържаните диви зони W2, W3 и W4. В зона U4 позитивните са значително повече от тези в зона W3. Неподдържана зона W1 позитивните са значително повече от тези в зона U3 и останалите неподдържани зони (W2, W3 и W4) (табл. 17).

Таблица 17. Статистически значими разлики между различните зони в ЗМ „Кайлъка“. Представени са резултатите от проведен χ^2 тест, където $p < 0.05$. Броят на позитивните е на базата на позитивирали кърлежи, по които и да е метод на изследване.

Детекция на <i>Vorrelia</i> sp. в <i>I. ricinus</i> , чрез който и да е тест	Сравнени зони	Брой позитивни (%)	Брой негативни (%)	Pearson χ^2 Степени на свобода (Df = 1)	Общ брой (n)	p
	U2	19 (57.58)	14 (42.42)	4.029	33	0.045
	W2	22 (36.07)	39 (63.93)		61	
	U2	19 (57.58)	14 (42.42)	5.988	33	0.014
	W3	6 (25.00)	18 (75.00)		24	
	U2	19 (57.58)	14 (42.42)	3.764	33	0.05
	W4	44 (38.60)	70 (61.40)		114	
	U3	11 (40.74)	16 (59.26)	4.104	27	0.043
	W1	39 (63.93)	22 (36.07)		61	
	U4	26 (50.00)	26 (50.00)	4.21	52	0.04
W3	6 (25.00)	18 (75.00)	24			
W1	39 (63.93)	22 (36.07)	9.475	61	0.002	
W2	22 (36.07)	39 (63.93)		61		
W1	39 (63.93)	22 (36.07)	10.48	61	0.001	
W3	6 (25.00)	18 (75.00)		24		
W1	39 (63.93)	22 (36.07)	10.232	61	0.001	
W4	44 (38.60)	70 (61.40)		114		

7. СРАВНЯВАНЕ НА МЕТОДИТЕ ИЗПОЛЗВАНИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА *B. BURGDORFERI* S.L. В *I. RICINUS*

От изследваните с ТПМ кърлежи, 44 (20♂ и 24♀) са тествани и с nPCR. Нимфи не са включвани, поради малките им размери. Стойностите на κ между трите теста показаха различни нива на съгласие. При сравняването на всички кърлежи, тествани с nPCR ($n = 214$) по двата гена съгласието е съществено $\kappa = 0.785$ ($p = 0.001$) 95% CI: [0.703, 0.868]. Броят на съвпадения в резултатите (съгласия): е 191 (89.25% от наблюденията). Същото съществено съгласие се открива между двата nPCR при сравняването на пробите, детектирани и с ТПМ ($n = 44$), където $\kappa = 0.665$ ($p = 0.001$), 95% CI: [0.445, 0.886]; брой съвпадения: 37 (84.09% от случаите).

Стойностите на κ при съпоставянето на резултатите от ТПМ с nPCR_{5S-23S IGS} и ТПМ с nPCR_{flaB} са съответно: умерено съгласие $\kappa = 0.435$ ($p = 0.004$) 95% CI: [0.153, 0.716], брой съвпадения: 33 (75.00% от случаите) и добро съгласие $\kappa = 0.335$ ($p = 0.024$), 95% CI: [0.056, 0.613], брой съвпадения: 30 (68.18% от случаите).

Резултатите от сравняването на трите теста при 44 *Ixodes ricinus* кърлежи са представени в таблица 18.

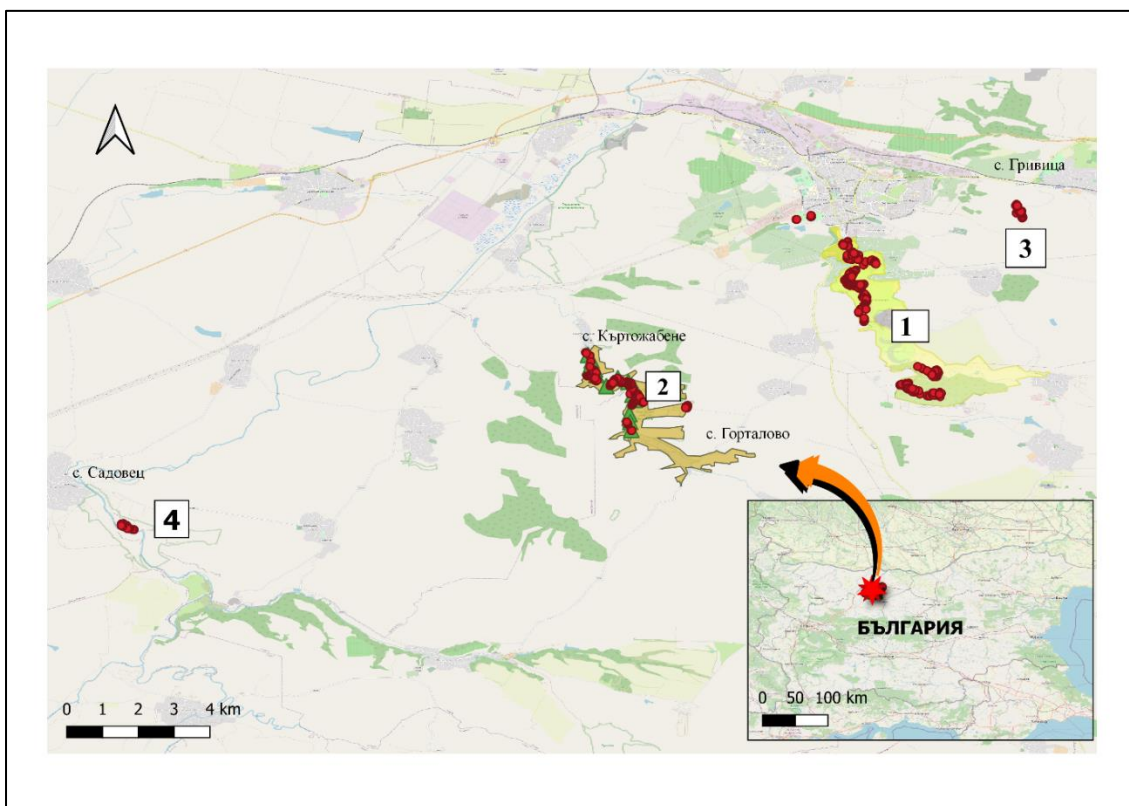
Таблица 18. Сравнение на ТПМ микроскопия и PCR анализ при откриването на *B. burgdorferi* s.l. в кърлежи *I. ricinus* ($n = 44$), събрани от района на Плевенска област. ☒- показва използвания тест.

	Резултати по следния метод			Общ брой позитивни кърлежи
	ТПМ	PCR _{5S-23S IGS}	PCR _{FlaB}	
Позитивни кърлежи по всеки метод	15	14	19	
Негативни кърлежи по всеки метод	29	30	25	
Позитивни кърлежи само по един метод			☒	3
		☒		0
	☒			4
Позитивни кърлежи по два от методите		☒	☒	13
	☒	☒		9
	☒		☒	10
Позитивни кърлежи и при трите метода	☒	☒	☒	10

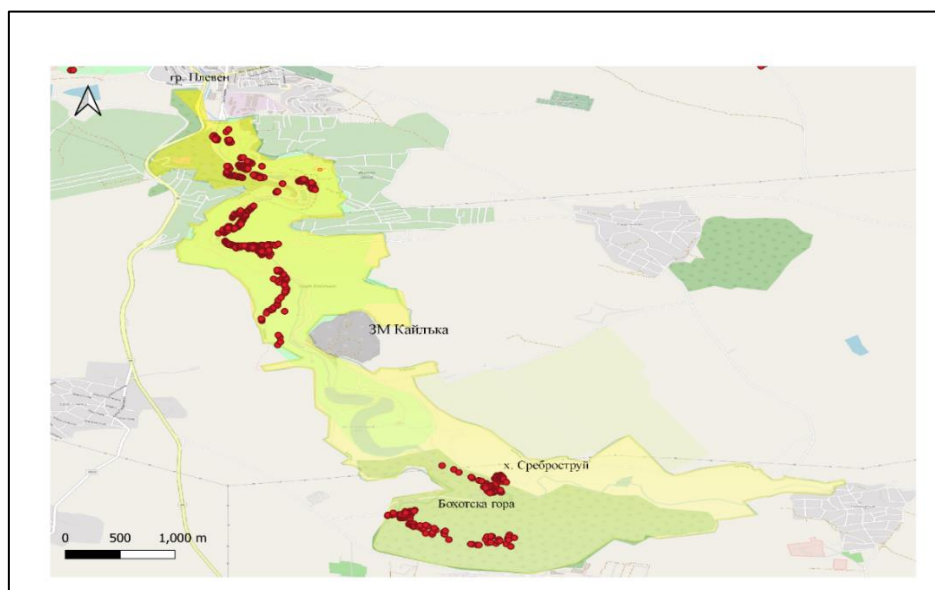
Тъй като различните използвани методи за откриване на *Borrelia burgdorferi* s.l. имат редица предимства и недостатъци, кърлежите се приемат за позитивни, в случаите, при които позитивира, поне един от използваните методи на изследване (ТПМ и/или PCR положителен кърлеж).

9. ЕПИЗООТОЛОГИЧНО КАРТИРАНЕ

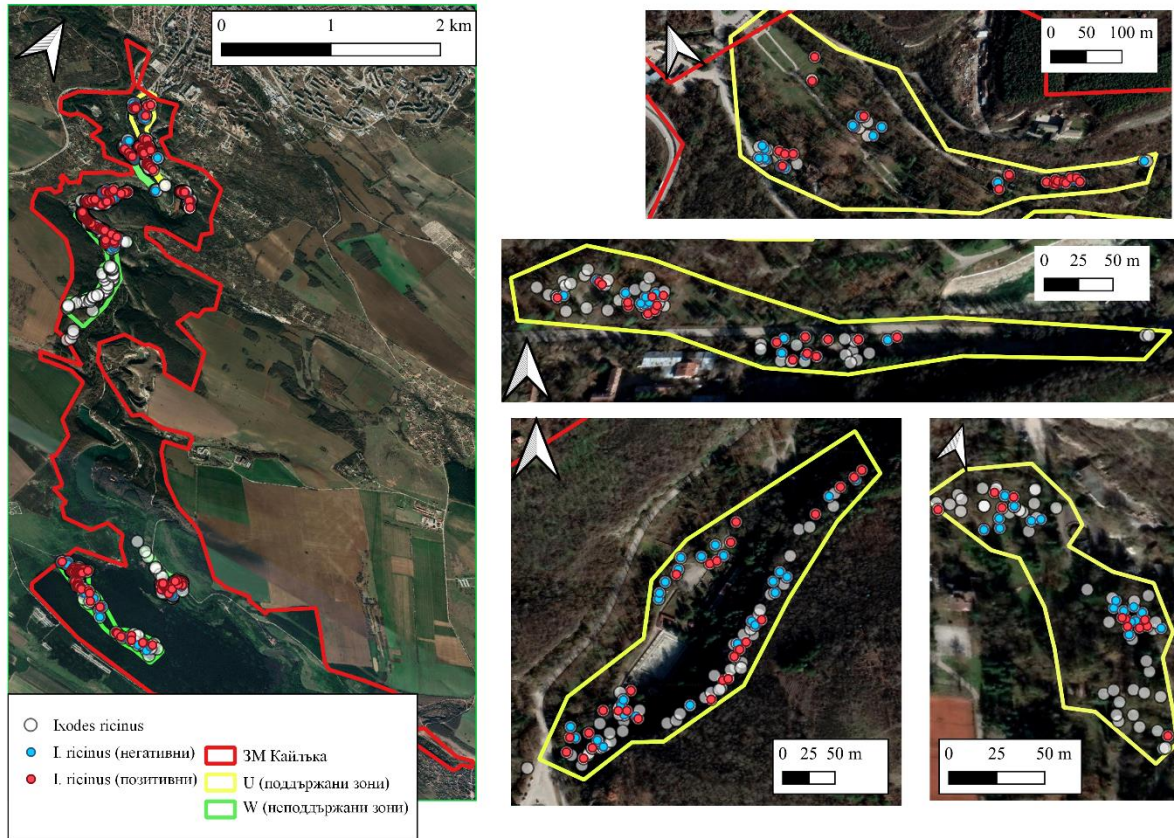
В резултат от цялостната работа от проучването са изработени епизоотологични карти обхващащи няколко района на Плевенска област.



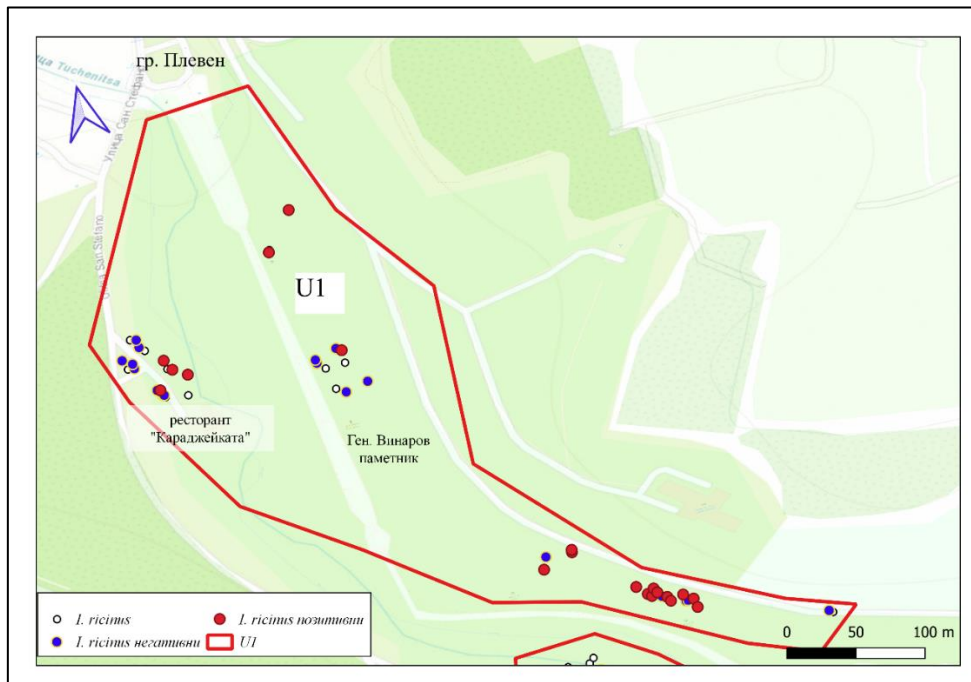
Карта 1. Райони на изследване в Плевенска област. 1) ЗМ „Кайлъка“; 2) ПЗ „Карстово ждрело на р. Чернелка“; 3) с. Гривица – м. „Тачова чешма“; 4) с. Садовец – м. „Гарван дол“.



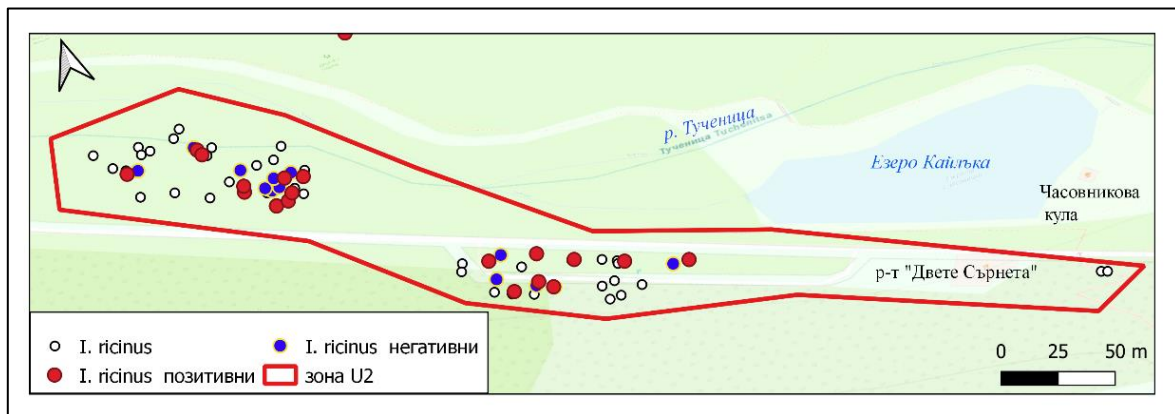
Карта 2. Епизоотологична карта на ЗМ „Кайлъка“. Локализацията на събраните кърлежи от вида *Ixodes ricinus* са отбелязани чрез символ ●.



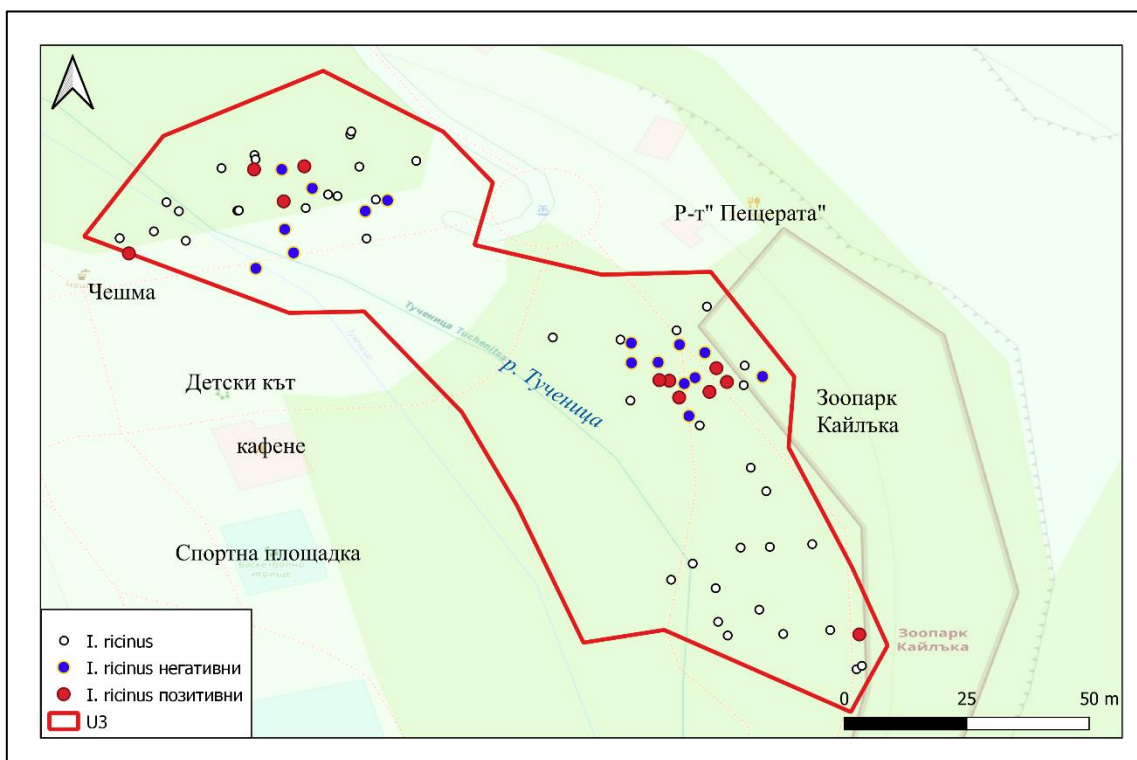
Карта 3. ЗМ „Кайлъка“ и поддържаните зони с огнища на *Ixodes ricinus* и заразеността им с *Borrelia burgdorferi* s.l. Вляво е представена територията на ЗМ „Кайлъка“, вдясно са представени неподдържаните изследвани зони W1 – W4.



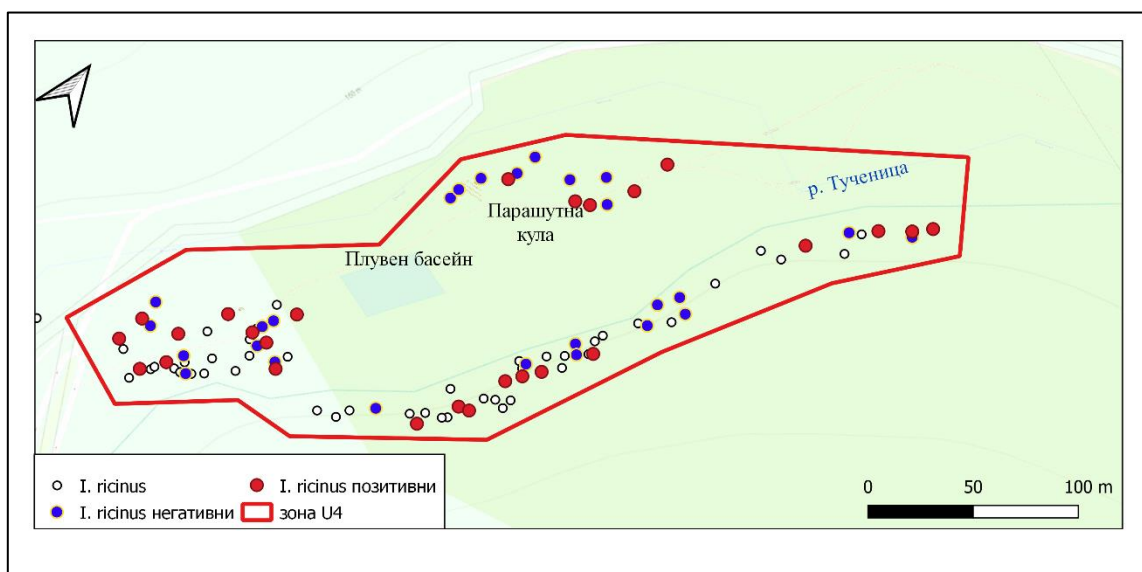
Карта 4. Поддържана зона U1 в ЗМ „Кайлъка“.



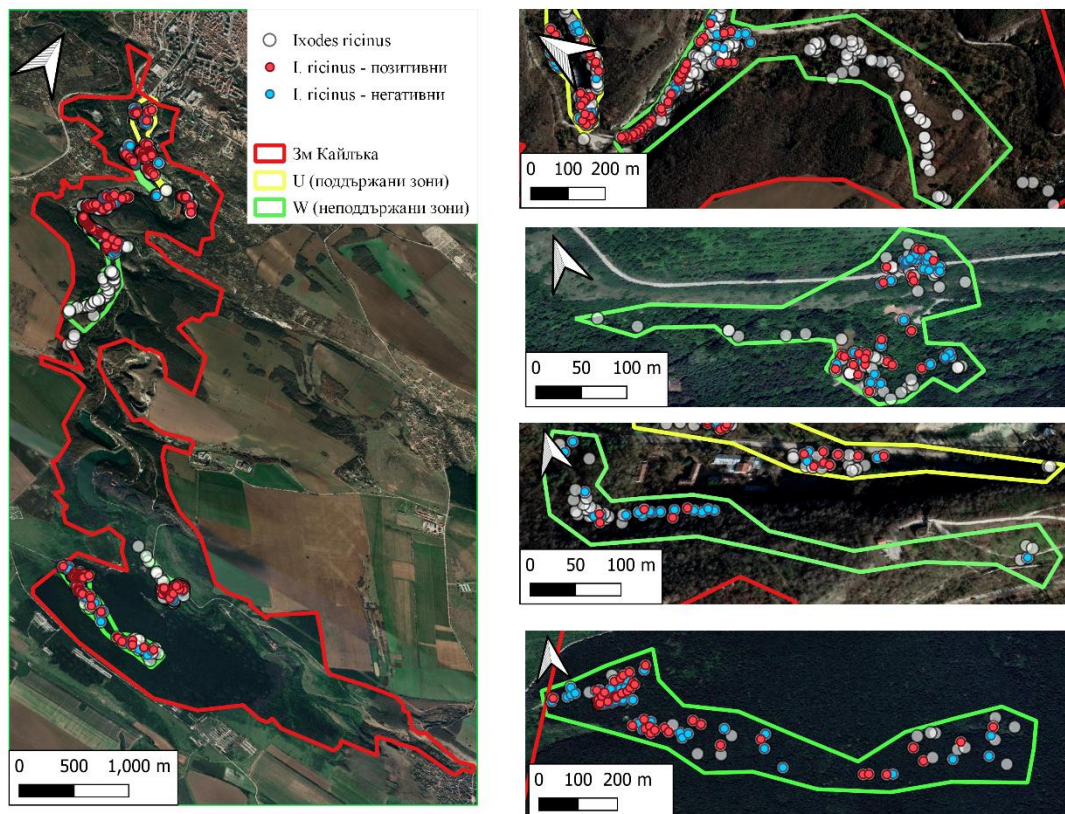
Карта 5. Поддържана зона U2 в ЗМ „Кайлъка“.



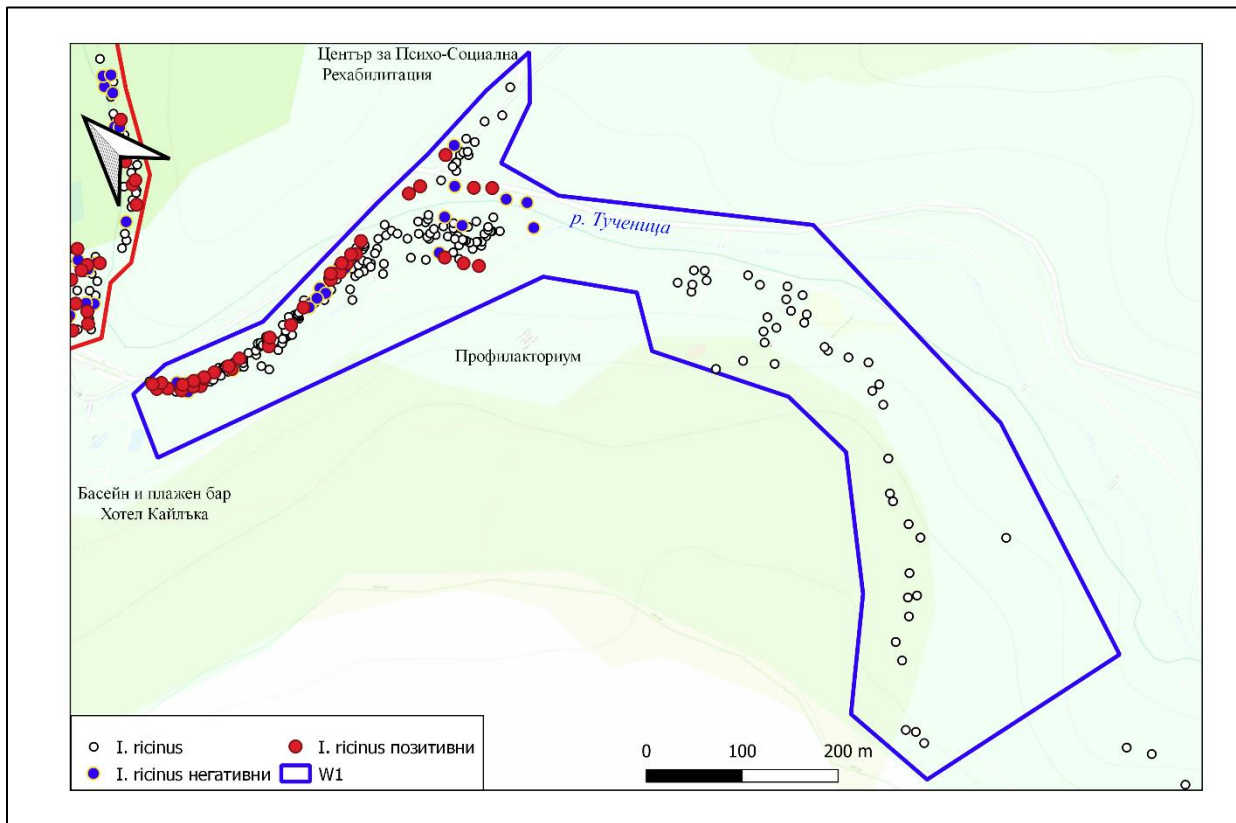
Карта 6. Поддържана зона U3 в ЗМ „Кайлъка“.



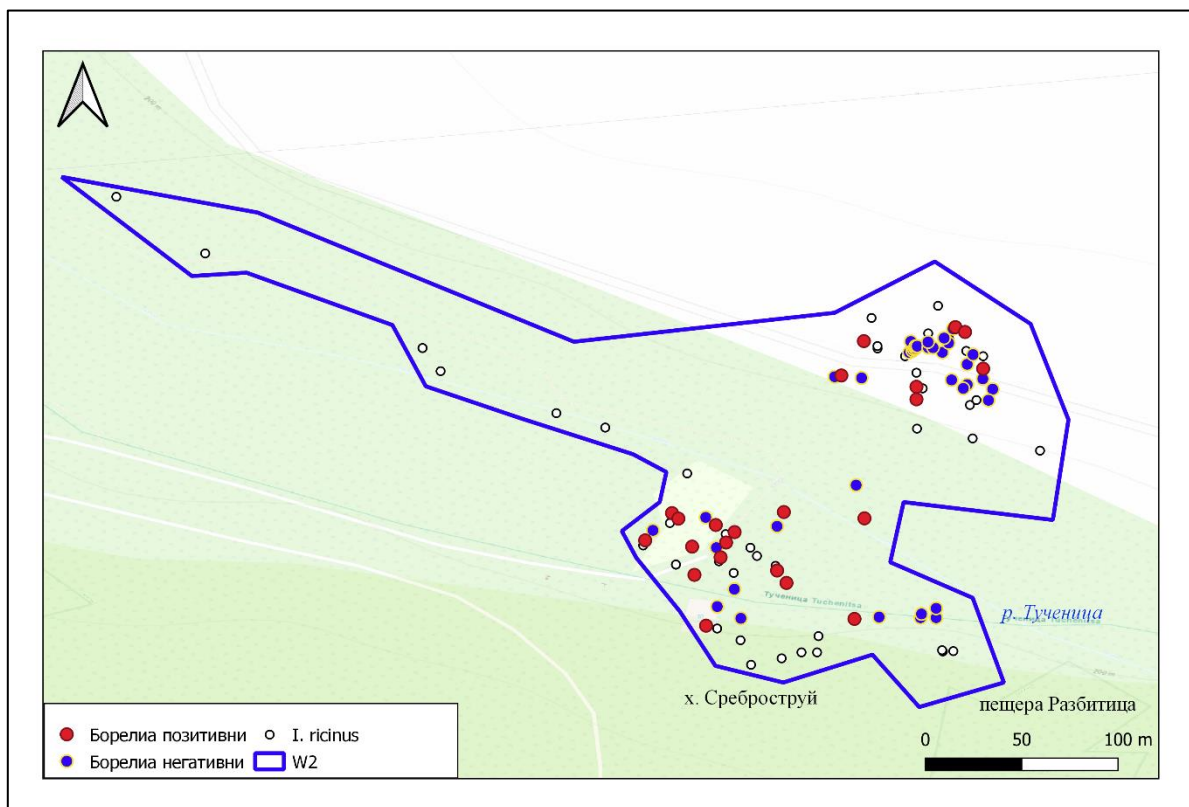
Карта 7. Поддържана зона U4 в ЗМ „Кайлъка“.



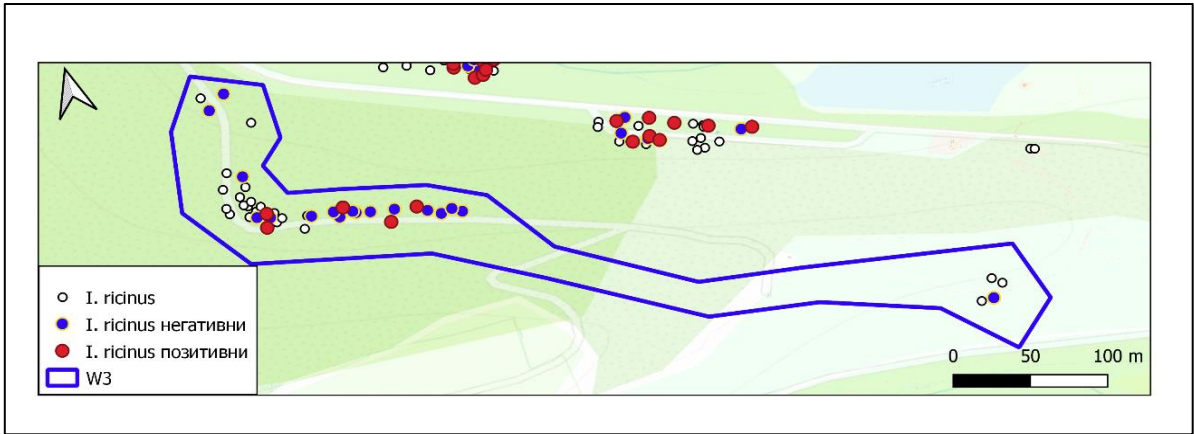
Карта 8. ЗМ „Кайлъка“ и неподдържаните зони с огнища на *Ixodes ricinus* и заразеността им с *Borrelia burgdorferi* s.l.



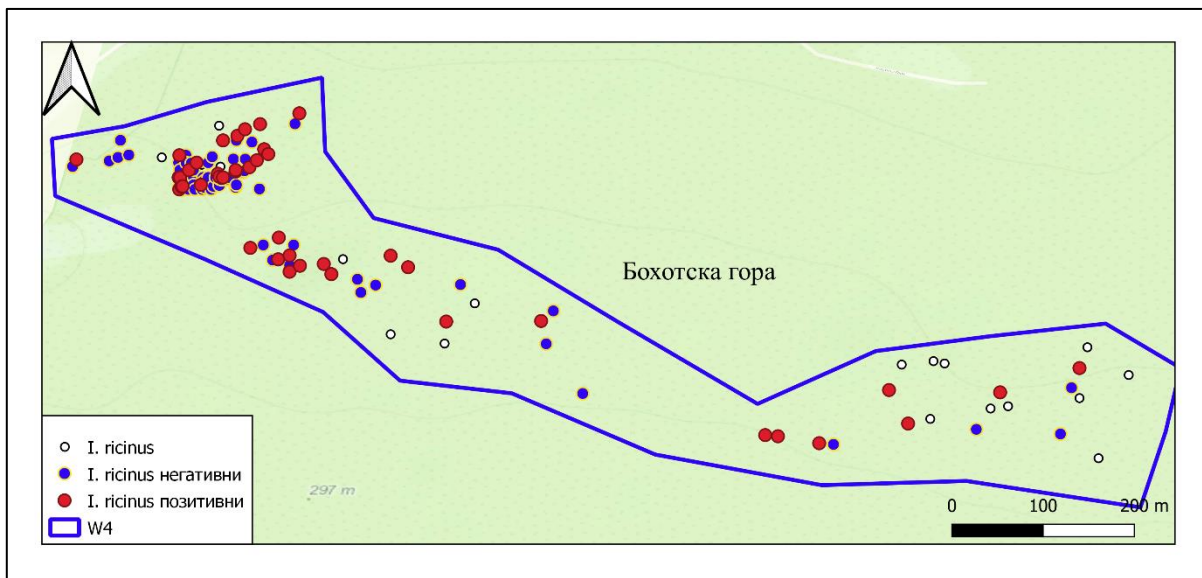
Карта 9. Неподдържана зона W1 в ЗМ „Кайлъка“.



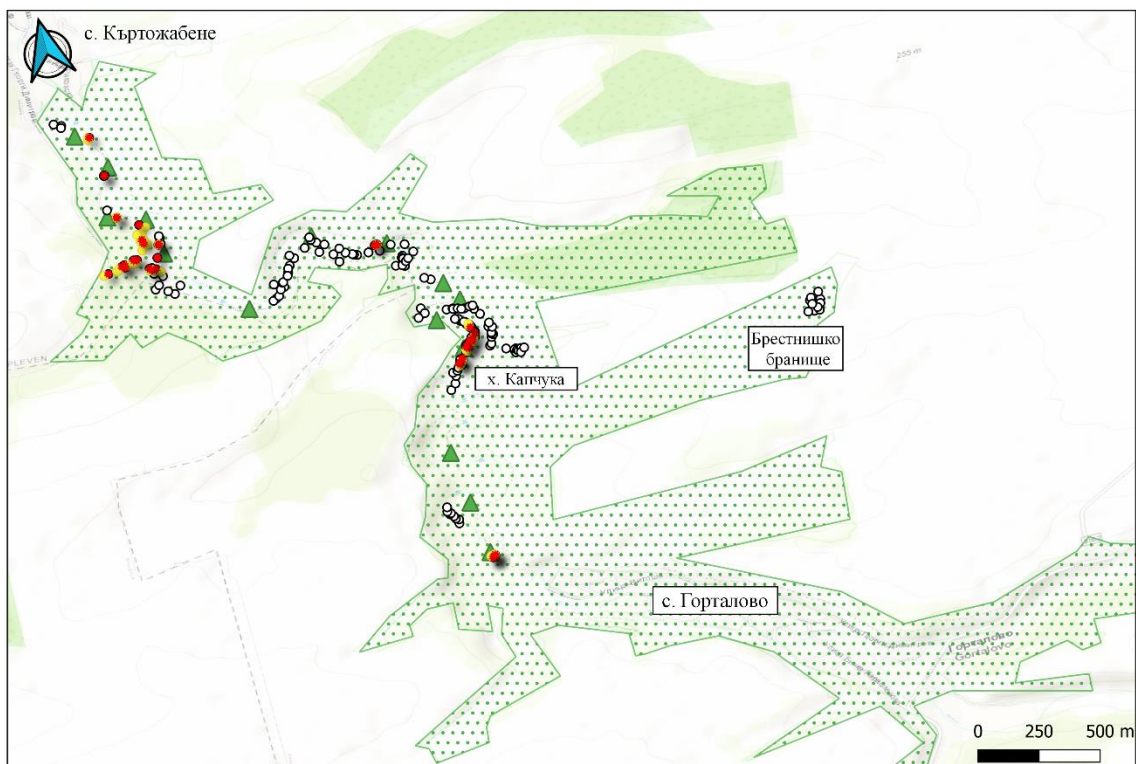
Карта 10. Неподдържана зона W2 в ЗМ „Кайлъка“.



Карта 11. Неподдържана зона W3 в ЗМ „Кайлъка“.



Карта 12. Неподдържана зона W4 в ЗМ „Кайлъка“.



Карта 13. Природна забележителност „Карстово ждрело на р. Чернелка“. Всички събрани *I. ricinus* кърлежи са отбелязани чрез \circ . Позитивните за *V. burgdorferi* s.l. чрез \bullet ; негативните чрез \bullet ; Местата обособени за отдих чрез \blacktriangle .

IV. ДИСКУСИЯ

1. РЕТРОСПЕКТИВНО ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ

Литературната справка показва, че ЛБ е най-широко разпространената в света кърлежово преносима трансмисивна инфекция. В Европа ЛБ се регистрира във всички страни. Висока степен на инфектираност на кърлежите с *Borrelia burgdorferi* (нимфи над 10%, имагинални форми над 20%) е регистрирана в Централна Европа (Австрия, Република Чехия, Германия, Швейцария, Словакия, Словения). Първите целенасочени проучвания върху заболяемостта в България са от 90-те години на ХХ век. Някои автори представят регионите в България, както следва: със заболяемост под 10‰ (Видин, Силистра, София, Кюстендил, Благоевград, Смолян, Кърджали, Ямбол); със заболяемост до 20‰ – (Перник, Плевен, Ловеч, Габрово, Пловдив, Пазарджик, Ст. Загора, Сливен, Бургас, Добрич, Разград) и заболяемост до 30‰ (Враца, В. Търново, Търговище, Русе, Шумен, Варна). Оформени са 14 прородно-огнищни зони (ПОЗ) на Лаймска борелиоза, в зависимост от географско-ландшафтните условия и административни единици в страната. Плевен и областта попадат в т. н. Плевенско-Ловчанска ПОЗ. Както показват данните от ретроспективното епидемиологично проучване, заболяемостта в област Плевен през последните 20 години се запазва на ниво до 20‰. Това показва, че факторите (биологични и социални), влияещи върху епизоотичния и епидемичния процес продължават да действат. Свързващо звено между резервоарите на причинителя и хората са инфектираните кърлежи *Ixodes* spp. От събраните екзофилни кърлежи при теренната работа се установи, че те са преобладаващата популация в региона на Плевен.

Марсилската треска, предизвикана от *Rickettsia conorii conorii*, е трансмисивна зооноза, която е ендемична в страните от Средиземноморския басейн. Векторите на това заболяване са кърлежите от род *Rhipicephalus*, които са широко разпространени. През последното десетилетие заболяемостта в страната варира между 2.96‰ и 19.35‰. Ендемични райони са Пазарджик, Пловдив, Сливен, Хасково, Бургас, Варна.

В област Плевен случаи на Марсилска треска се регистрират спорадично. Предполага се, че заразените хора са пребивавали в ендемични огнища, в които са претърпели ухапване от кърлеж. Циркулацията на кърлежи *Rhipicephalus sanguineus* s. l. според находките при флагирането, предполага поддържане на местна епизоотия, но тук значение има и влиянието на климато-географските фактори върху *R. conorii*.

Резултатите от проведеното проучване потвърждават факта, че от кърлежово-преносимите заболявания в област Плевен, най-голямо значение за

региона има Лаймската борелиоза. Налице са физикогеографски условия, вектори и резервоари, които поддържат непрекъснатост на епизоотичния процес. Необходим е системен мониторинг върху инфектираността на кърлежите с цел да се подобрят профилактичните и протиепидемични мерки. Последните са свързани с информираност на населението за особеностите в протичането на заболяването, възможностите за диагностика, както и възможностите да се води ефективна борба с кърлежите.

2. СЪБИРАНЕ НА ИКСОДОВИ КЪРЛЕЖИ

2.1. Избор на метод за събиране на кърлежи

Наблюдението на кърлежите в медицинската и ветеринарната ентомология започва през 1902 г., като са събирани *Ixodes ricinus* от овце за изследване на влиянието им върху здравето на животните. Методите за събиране на кърлежи в активния им период на търсене на гостоприемници се извършва чрез влачене на светло (бяло) памучно одеяло, парче мъхеста материя, флаг, чрез примамка – човек или химично вещество, напр. CO₂. Специфичната методика за събиране на проби варира в зависимост от целта на изследването, а ефективността на методите може да зависи от вида кърлеж, стадия на развитие и поведението им при търсенето на гостоприемник. При дебнещите кърлежи, които се изкачват към върха на растителността и изчакват да се прикрепят към гостоприемника, са полезни методи за събиране, които осигуряват голяма повърхност за контакт с растителността. Събирането на кърлежи от околната среда по време на кампаниите не се отразява върху намаляването или контрола на популациите от кърлежи.

За да се установи наличието на кърлежи в определените зони, както и заразеността им с *Borrelia burgdorferi* s.l., е необходимо да бъдат улавяни в етапите на развитие извън гостоприемника. Инфектираността със спирохети на кърлежи, отстранени от гостоприемник не може да бъде преценена. Събирането им от избрани животински видове може да доведе до подценяване на видовото разнообразие и числеността им в даден район. Свалянето на кърлежи от заразен с ЛБ гостоприемник може да повиши значително процента на инфектираност в изследваните проби, поради предаването на патогена при съвместното хранене.

Най-често използваните техники за събиране на дебнещи иксодови кърлежи, са влаченето (dragging) и флагирането (flagging). Чрез тези методи се улавят само гладни и активни кърлежи. И при двата метода се използва парче бял памучен плат. При влаченето, операторът тегли зад себе си платното. При флагирането платът е закрепен на дръжка, подобно на знаме и се прокарва чрез замятане или плъзгане по листната покривка или растителността. Двата метода

често се използват в литературата като взаимозаменяеми, но всъщност са различни техники за събиране на проби, мотивирани от различни цели.

2.2. Видов състав

Най-голям дял от установените чрез флагиране видове иксодови кърлежи заемат *Ixodes ricinus*. Това е най-често откриваният вид върху човека (в около 90% от случаите). *I. ricinus* е установен във всички райони на изследване в Плевенска област. По данни на Гладнишка и сътр. 92 - 96% от кърлежите, свалени от хора в България за периода 2016 - 2021 г. са определени като *I. ricinus*. В проучването са включени случаи на хора от София, които са посетили Националната референтна лаборатория по Кърлежово/векторно преносими инфекции, листерии и лептоспири. Епидемиологичното значение на *I. ricinus*, като вектор на различни трансмисивни заболявания е голямо поради факта, че от него са изолирани различни патогени. Estrada-Рейна описва 20 различни патогена в *Ixodes ricinus*, като подчертава, че той е основният вектор на *Borrelia burgdorferi* s.l. за Европа.

Въз основа на метаанализ от 115 проучвания, публикувани през периода 1990-2021 г. кърлежи от вида *I. ricinus*, събрани от градски зелени площи са докладвани в литературата от 24 държави в Европа, включително и България. В повечето от публикациите, свързани с урбанизираните райони, се отчита едновременното присъствие на всички жизнени стадии, обхващащи различни европейски региони. Съотношението между половозрелите форми спрямо нимфите и ларвите е изключително разнообразно. В ревюто на Hansford и колектив, относно разпространението на *I. ricinus* в градските зони, дялът на мъжките (49,6%) и женските (50,4%) е в съответствие с получените от нас резултати (49% мъжки и 51% женски). Наличието на ларви е отчетено само в една трета от всички изследвания, като не се уточнява по какъв начин са събрани. Някои от публикациите посочват нимфите като най-голям дял от събраните кърлежи, докато в нашето проучване те са 17%.

За първи път в България се улавя активно търсец женски кърлеж от вида *Ixodes frontalis* (фиг. 24). Уловен е в близост до х-л „Спартак“, намиращ се в ЗМ „Кайлъка“. В България от този вид е описан един индивид, свален от белогуш дрозд (*Turdus torquatus*), в планината Люлин. Събирането му през пролетта, чрез флагиране показва, че е успешно презимувал и линял от нимфа до възрастна женска в района. Медицинското му значение не е добре проучено, но има доказана роля в ензоотичния цикъл на *Borrelia* spp. Чрез PCR са установени *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* и *Borrelia turdi*. *Ixodes frontalis* е орнитофилен вид и обикновено обитава гнездата на птиците. Публикации, свързани с улавянето му чрез флагиране, са изключително редки за Европа, въпреки че видът се счита за повсеместно разпространен.

Относително малко видове от иксовите кърлежи, принадлежащи към *Metastriata*, имат медицинско значение за хората. В рамките на проучването, в района на Плевенска област са събрани чрез флаг предимно представители от родовете *Rhipicephalus*, *Dermacentor* и *Haemaphysalis*.



Фигура 24. *Ixodes frontalis*, женски. Вентрален изглед. Дигископия Leica DM750, увеличение x40; Nikon D7200; Nikkor 50mm 1.8. А. Блажев 29.04.2021.

Два индивида, определени като *Haemaphysalis punctata* са уловени в различни местности – първият в м. „Тачова чешма“ до с. Гривица, а вторият в тревната площ на зоокъта в урбанизираната част на ЗМ „Кайлъка“. Откриването му в района на с. Гривица не е необичайно, поради факта, че там се срещат зайци, таралежи и различни дребни гризачи, които се явяват негов основен гостоприемник. Индивидът, уловен в тревните части на зоокъта в ЗМ „Кайлъка“ може да е попаднал, както от естествените обитатели в парка, така и от животните, отглеждани там. Липсват сведения за паразитите по животните, обитаващи зоокъта.

За периода на проучването в Плевенска област не е открит представител на род *Hyalomma* нито чрез флагиране, нито свален от гостоприемник.

Възможността за пренасяне на кърлежи от животни на хора е от значение, както в селските райони, така и в крайградските и градските райони. Градските паркове и крайградските зелени площи, представляващи зони за отдих на семейства, спортисти и домашни любимци са подходяща среда за контакт с кръвосмучещи членестоноги, каквито са например кърлежите. Въпреки това, проучванията в България върху числеността и сезонната динамика на разпространение на кърлежите в градските и крайградските паркове, са недостатъчни.

2.3. Влияние на температурата и относителната влажност върху активността на *Ixodes ricinus* в търсенето на гостоприемник

Установен е едномодален модел на активността на кърлежите в Плевенска област, който е потвърден от плътността на търсещите кърлежи и броя на събраните кърлежи за минута. Най-висока активност на кърлежите е отчетена от края на месец април до началото на юни. Регистрираните случаи на Лаймска борелиоза и ухапвания от кърлежи са основно през периода март - юли и единични случаи през есента. Климатът в Северна България се характеризира с горещо, сухо и продължително лято до средата на октомври, след което температурите спадат до критични за активността на кърлежите. Вероятно съществува минимална есенна активност на кърлежите, но климатичните условия не бяха подходящи за събиране на кърлежи (дъжд, силен вятър и непроходимост в някои от районите по това време на годината).

Най-голямото предизвикателство за сухоземните членестоноги е поддържането на водния баланс - факт, който е особено важен за оцеляването на кърлежите и особено за *I. ricinus*, тъй като видът е изключително чувствителен към температурата и относителната влажност в сравнение с други видове кърлежи. Наблюденията от настоящото изследване изцяло подкрепиха този факт. Повишаването на относителната влажност има положителен ефект върху активността при търсене на *I. ricinus*, като максималната активност, изразена чрез TQI, достигна до 60 %. Намалването на TQI при повишена относителна влажност на пръв поглед изглежда противоречиво. При оптимална влажност кърлежите имат по-продължителна търсеща активност, което от своя страна увеличава шанса за прикрепване към гостоприемниците. Поради по-големия брой кърлежи, които са се прикрепили към гостоприемника, броят на търсещите кърлежи по повърхността на тревата се изчерпва и това води до по-малкото им количество при флагиране. С повишаване на температурата, TQI се увеличава и достига най-високите си стойности при 20°C, след което спада (фиг. 7). Повишаването на температурата има отрицателен ефект върху преживяемостта на кърлежите, както и върху тяхната активност. Вероятно това е причината, да не откриваме кърлежи в районите на изследване след месец юни.

В изследванията, извършени в Европа се наблюдават вариации в плътността зависими от сезона. Има доказателства за едномодална активност с пролетни пикове, както е в нашите изследвания, но и такива за бимодални модели с вторични пикове в годината.

Schulz и съавтори установяват, че в тринадесет от дванадесетте места за вземане на проби в Германия се наблюдава унимодален модел на активност за всички етапи на развитие, характеризиращ се с единствен пик на активност, започващ от началото на март до края на май. Само едно от местата за вземане на проби е било с бимодален модел на активност. Втори по-малък пик на активност

е установен за нимфите и ларвите през есента, докато при възрастните форми не е наблюдаван втори пик.

В подкрепа на установената едномодална активност в района на гр. Плевен са и резултатите, получени от регистрираните случаи на ЛБ в областта. Най-голяма заболяемост се регистрира през месеците юни-юли (фиг. 4), което съвпада с установената от нас максимална активност на *I. ricinus* в периода от април до края на месец май. Симптоматиката на ЛБ се проявява по различен начин и не винаги непосредствено след ухапването от кърлеж. Тестирането за наличие на инфекция с *B. burgdorferi* s.l. при пациенти е базирано на откриване на антитела срещу патогена (IgM и/или IgG) в серума. Изследването се извършва поне 30 дни след ухапването от кърлеж. Поради това се открива забавяне в пиковите на кърлежовата активност и регистрираните случаи в РЗИ-Плевен. От друга страна, анализът на регистрираните случаи в България показва бимодална активност с по-малък пик през октомври (фиг. 4).

Това предполага, че широкият спектър от градски зелени площи може да е подходяща среда за развитието на кърлежови популации, чиято активност може да настъпи в различно време през годината.

Ixodes ricinus е екзофилен, три-гостоприемников вид кърлеж, ограничен в райони с умерени до високи валежи и растителност, която запазва високата влажност. По време на периодите без гостоприемници *I. ricinus* се нуждае от относителна влажност поне от 81-85 %, за оцеляването си. Нашите резултати показваха, че *I. ricinus* е най-активен в търсенето на гостоприемник при $t = 20^{\circ}\text{C}$ и $\text{RH} = 60\%$.

Установихме, че плътността и честотата на активно търсещите кърлежи намалява, когато температурите се повишат над 20°C . Qviller и сътр. получават сходни резултати при изследване плътността на *I. ricinus* в крайбрежния регион на Западна Норвегия. В тази част на Европа активността е най-висока при $15-17^{\circ}\text{C}$. Доказано е обаче, че кърлежите са активни и многобройни при много по-високи температури на други места. Например в Южна Англия позитивен геотропизъм на *Ixodes ricinus* започва при 24°C на 80% RH или при 18°C на 71% RH. Намаляването на плътността на кърлежите с повишаване на температурата, както е установено в насоящото проучване, теоретично може да е свързано с това, че относителната влажност става лимитираща при по-високи температури. В контролирано лабораторно проучване, което тества активността на *I. ricinus* при 25°C и 60% RH, 25°C и 85% RH и 15°C и 85% RH, предполага, че оптималните условия за търсене са по-близо до 15°C при 85%RH. В други изследвания са установени, както отрицателни, така и положителни корелации с температурата. Отрицателната корелация с температурата при по-континентален климат в Швеция в сравнение с положителната корелация при атлантически климат в Ирландия подсказва, че разликите в реакцията на температурата са свързани и с

други фактори на климата. Високите температури могат да предизвикат стрес от изсушаване в сухи/континентални райони, каквото е лятото в централна северна България.

3. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА *IXODES RICINUS* В ЗМ „КАЙЛЪКА“

Опасността от заразяване на човек с кърлежово-преносими инфекции е пряко свързана с числеността и разпространението на активно търсещите кърлежи. Една от целите на това проучване е да се сравнят и оценят популациите на иксодови кърлежи (Ixodidae) в поддържани (урбанизирани) и неподдържани (диви) райони в ЗМ "Кайлъка" в град Плевен.

Повишеният риск от ухапване в градските паркове и градини е проучен в много европейски страни. В България първите проучвания на популациите от кърлежи в градска среда са проведени в „Борисовата градина“, гр. София.

Стабилни популации от кърлежи се наблюдават в много градски паркове в Европа, като в тях са доказани различни патогени, причиняващи заболявания при хора и домашни животни. Парковете и градините са места за отдих, които често се посещават през пролетно-летния сезон. Това определя необходимостта да се оцени риска от ухапвания от кърлежи и да се предприемат мерки за предотвратяване на тази заплаха за общественото здраве.

По време на проучването потвърдихме присъствието на кърлежи във всички изследвани зони в ЗМ „Кайлъка“, главно на *I. ricinus*, без значими разлики в числеността им на територията на парка. *Ixodes ricinus* е доминиращ вид от кърлежовата фауна в Европа и е най-изследваният вид.

Липсата на разлики в плътността на *I. ricinus* между градските и дивите зони в ЗМ „Кайлъка“ най-вероятно се дължи на големия брой дребни и средни бозайници и множеството птици, обитаващи парковата територия. Повечето от кърлежите, събрани в поддържаните зони, са открити в близост до места, където има хранителни отпадъци, в близост до барове, ресторанти, детски площадки и контейнери за боклук. Тези места привличат дребни гризачи, както и бездомни кучета, които са гостоприемници в различните стадии от развитието на кърлежите.

Защитена местност "Кайлъка" е разположена в каньона на малката река Тученица и от двете страни е заобиколен от високи скални образувания, което осигурява относително постоянна влажност. От друга страна, паркът граничи с гористи местности, обитавани от различни животни, в това число и сърни, което осигурява отлични условия за жизнения цикъл на кърлежите *I. ricinus* във всички етапи от развитието им.

В литературата, свързана с изследване на кърлежовите популации в градски и крайградски паркове и градини, преобладаващият вид е *Ixodes ricinus*. Той се описва като най-синантропен вид, с най-широк спектър на гостоприемници, включително хора. В ревюто си относно разширяването на ареала на *I. ricinus*,

Medlock разглежда ролята на сърните и елените като основна за разширяване на ареала му в някои части на Европа.

Интересен факт е, че 87% от събраните кърлежи в ЗМ „Кайлъка“ са възрастни. Малкото уловени нимфи и липсата на ларви могат да се обяснят с метода на пробосъбиране. Нимфите, поради значително по-малкия си размер, са по-чувствителни към загубата на вода и притежават по-ниски абсолютни енергийни резерви от възрастните. Малък брой нимфи стигат до върха на растителността, което намалява шанса да бъдат уловени чрез прокарването на флаг. Вероятно много от нимфите се намират в долните слоеве на растителността и остават недокоснати от флага. Друга вероятна причина е сезонна активност на нимфите. Възможно е активността на нимфите да е по-голяма през есента, когато не са провеждани кампании за събиране, поради неблагоприятните метеорологични условия.

Районът, анализиран в това изследване, не е бил обект на анализ по отношение на кърлежите. Това проучване допринася за разбирането и картографирането на зоните на разпреостранение на кърлежи и може да допринесе за създаването на ефективна цялостна стратегия за наблюдение. Тези данни позволяват също така да се определят периодите с по-висока численост на кърлежите в изследвания район, като по този начин се предоставят указания за предпазните мерки, които трябва да се спазват от обслужващия персонал през тези периоди.

3.1. TF и TQI в ЗМ „Кайлъка“

Честотата на кърлежите TF е показател, който се използва, за да се оцени риска на човек за контакт с кърлеж, в даден момент, в дадена област. Този показател е по-удобен в сравнение с гъстотата на кърлежите, тъй като времето за събиране може да варира в райони с еднаква площ. Индексът показва честотата на кърлежите в дадена област – брой за единица време. От друга страна, TF дава относителна представа за скоростта, с която се събират търсещите кърлежи чрез флагиране в дадена област.

При сравняването на TF и на TQI в двата типа зони в ЗМ „Кайлъка“ се установяват сходни стойности. Това показва, че рискът от ухапване от кърлеж по време на активния за кърлежите период в урбанизираните и в дивите зони на парка е еднакъв. След съпоставянето на зоните помежду им (по отделно всяка с всяка) се установяват статистически значими разлики за TF.

Най-ниски средни стойности за TF са изчислени за участъка, който е разположен в началото на парковата част - U1. Три от останалите зони (U3, W1, W2 и W4) показват статистически значими по-високи стойности. В зона U4 честотата на улавяне на *I. ricinus* също е по-висока сравнена с тази в U1, но не е сигнификантна ($p = 0.055$). На фиг. 32 се вижда, че стойностите на TF нарастват от U1 към U4, т.е. от градската паркова част към неподдържаните площи на ЗМ

„Кайлъка“. Във всички урбанизирани зони (U1-U4) тревните площи са еднакво добре поддържани. Разликата в честотите между U1 и U3, вероятно се дължи на наличието на зоокът в района на U3. Въпреки обезпаразитяването на обитателите в зоокъта, наличието на храна в хранилките привлича различни естествени обитатели на парка. Това увеличава плътността на гостоприемниците и съответно на съпътстващите ги паразити в дадената зона. Разликите с трите диви зони не е необичайна, тъй като U1 е най-близко разположената част до града и значително по-рядко могат да се наблюдават представители на дивата фауна, характерни за останалата част на парка и цялата ЗМ „Кайлъка“.

Най-високи средни стойности на TF се отчитат за зоните W4 (0.92 ± 0.21), последвани от U4 (0.84 ± 0.76) при средна стойност за цялата защитена местност от 0.61 ± 0.46 . Местност „Бохотска гора“ (W4) е най-отдалечената зона спрямо гр. Плевен и липсва акарицидна обработка. Поради това разликите в честотата на улавяне в U1 и U2 спрямо W4 е значима.

Зона U4, както се вижда от карта 3, граничи с неподдържаните естествени територии на парка и е една от най-тесните части на каньона на р. Тученица. От една страна локалните климатични условия са благоприятни за развитието на кърлежите, защото влажността се запазва за по-дълго време. От друга страна, преминаването на различни диви животни от останалата част на парка е по-често, което допълнително увеличава изобилието от кърлежи в тази зона.

Не се установяват значими разлики по отношение на TF между различните диви зони, но при сравняване на плътността на *I. ricinus*, изчислена чрез TQI се отчита такава между W1 и W3. Тази разлика в плътностите се дължи на разположението на зона W3. Тя се намира върху западния скален венец над каньона. Тази част е по-открита, по-малко залесена и съответно по-суха, в сравнение с W1, която е богато залесена с разнообразни дървесни видове (изоставен дендрариум), обезпечаваци подходящи условия за съществуването на *I. ricinus*.

Falco и Fish изследват риска от ухапване от кърлеж и евентуално инфектиране от ЛБ в зоните за отдих в паркове в Ню Йорк. Те използват индекс, наречен "encounter distance". С него измерват разстоянието, на което първият кърлеж ще се захване на флага. Резултатите им показват, че в районите, използвани по-често от гражданите има по-малък риск от ухапване, като се базират на факта, че за улавянето на кърлеж е необходимо по-голямо разстояние.

Трудно е да се сравнят двата индекса, но и при двете проучвания целта е да се определи рискът за хората. Методът, който се използва в публикацията на Falco and Fish счетохме за неподходящ при нашите условия, защото от практиката се установява, че е възможно да се хване кърлеж на флагчето при първата стъпка, но следващият активно търсещ кърлеж е възможно да бъде уловен след много метри разстояние. По тази причина избрахме рискът да се оценява чрез броя уловени

кърлежи за времето на флагиране. От друга страна, времето, прекарано в престой или ходене в зона, обитавана от кърлежи, значително увеличава риска за ухапване. Въпреки че няма статистически значими разлики в гъстотата между градските и дивите райони, сравняването на броя кърлежи за единица време показва, че в дивите райони има по-висок риск от ухапване от кърлежи.

Намирането на по-малко кърлежи в често посещавани поддържани райони може да се дължи на това, че те се прикрепят към домашни кучета и хора, и биват отстранявани от активно търсещата популация. Допълнителни фактори представляват по-честата поддръжка на зелените площи, като косене и изнасяне на зелени отпадъци. В някои райони с интензивно използване е налице градска инфраструктура, пътища и сгради, което представлява бариера за дивите бозайници-гостоприемници или намалява времето на техния престой. Всички тези фактори могат да спомогнат за по-малкия брой на кърлежите или понижават оцеляването им в съответните райони.

При сравняване на плътността на нимфите NQI не се откриват разлики между поддържаните и неподдържаните зони в ЗМ „Кайлъка“. Многобройни проучвания показват, че източник на инфекцията при хората за различни патогени, пренасяни от кърлежи, са именно нимфите. Това се дължи на сравнително малкия им размер, което ги прави трудни за откриване и по този начин те остават прикрепени върху хората за по-дълъг период, преди да бъдат отстранени. Това увеличава възможността за предаване на патогени от нимфите на гостоприемника. Сезонната фенология на нимфите на *I. ricinus* се различава в различните географски райони, но в континентална Европа тя е бимодална и се състои от голям пролетен пик, последван от по-малък есенен пик. От гледна точка на общественото здраве разбирането на екологичните фактори, които причиняват междугодишните вариации в NQI, а оттам и в риска от заразяване, е важно за разработването на стратегии за контрол с цел намаляване на честотата на кърлежово-преносимите заболявания.

Тъй като за нито един от индексите за отчитане на активно търсещите кърлежи не се получават статистически значими разлики между поддържаните и дивите неподдържани райони, не може да се твърди, че рискът от ухапване от кърлежи на хора е различен в двата района. Въз основа на тези данни не можем да заключим, че има разлика в разпределението и плътността на популациите на кърлежите между двата типа зони в ЗМ "Кайлъка".

Тези резултати показват, че независимо от вида на изследваната територия, съществува висок риск от ухапване от кърлежи и съответно от заразяване с болести, предавани чрез кърлежи. Поддържаната част на ЗМ „Кайлъка“ привлича много граждани, туристи и посетители, поради което е необходимо да се приложат по-ефективни мерки за намаляване на числеността на кърлежите в градските райони.

4. ТЪМНОПОЛЕВА МИКРОСКОПИЯ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА *BORRELIA BURGENDORFERI* S.L

От откриването на *Borrelia burgdorferi* от Willey Burgdorfer през 1982 чрез ТПМ до днес са използвани различни методи за идентификацията на борелии от групата на ЛБ. Един от най-евтините, бърз и лесно приложим метод остава ТПМ. Поради тази причина пилотните проучвания за наличие на спирохети са извършени чрез този метод. Точността на метода е обсъждана и сравнявана с други техники на детекция в различни публикации. При всички микроскопски техники (имунофлуоресцентни, тъмнопoleви или фазовоконтрастни) може да се установи наличие на спирохети, но не може да се идентифицира вида на дадената бактерия. Детекцията се основава на характерни морфологични признаци. От друга страна в кърлежите от род *Ixodes* са установени и борелии от групата на ВТ, като *B. miyamotoi*. Спирохетите от двете групи не могат да се отдиференцират чрез ТПМ. За тази цел се използват PCR техники, като се амплифицират участъци от генома характерни за едната или другата група борелии.

В настоящото проучване се установи чрез ТПМ 32.94% инфектираност с *B. burgdorferi* s.l. на кърлежите събрани от различните райони на Плевенска област. От четирите основни района, в които са събирани проби единствено в м. „Гарван дол“ на с. Садовец не се откриват заразени кърлежи. Трябва да се отбележи, че от същата местност броят на изследваните кърлежи е най-малък – 9 броя. Във всички останали райони са наблюдавани борелии. Най-голям процент на заразеност чрез ТПМ се установи при кърлежите, събрани от ПЗ „Карстово ждрело на река Чернелка“ (46.84%), следвани от ЗМ „Кайлъка“ (32.77%) и м. „Тачова чешма“, с. Гривица (21.74%).

5. ДЕТЕКЦИЯ НА *BORRELIA BURGENDORFERI* S.L. В *IXODES RICINUS* ЧРЕЗ nPCR

При идентифицирането на борелии от групата ЛБ в кърлежи, най-често използваният метод е PCR. Разработени са множество тестове на базата на PCR. Поради голямата им консервативност като маркери, за целта са използвани най-често *16S* рДНК, интергенният спейсър на *5S-23S* рДНК и *fla* генът. В хода на настоящото проучване е използван един структурен ген – *flab* и некодиращия участък на интергенния спейсър на *5S-23S* рДНК.

Поради прилагането на различни методи за откриване на *Borrelia burgdorferi* s.l., приехме да отчитаме като позитивни кърлежите, в които е открита *Borrelia*, независимо от приложения метод на изследване. Съответствието между

nPCR_{23S/5S} и nPCR_{FlaB} с ТПМ е съответно умерено и добро според теста за съгласуваност на Коен (Cohen's Kappa).

При оценката на методите най-много позитивни за борелии кърлежи се откриват с nPCR_{FlaB} (19/44). При използването на nPCR_{23S/5S} позитивираха 14 от 44. Възможно е при амплифицирането на флагелиновия ген да се детектират и борелии от групата на ВТ, тъй като този ген е сравнително консервативен за рода, докато силно променливият регион на дупликацията 5S-23S е широко използван за субтипизиране на видовете *B. burgdorferi* s.l.

Чрез nPCR се детектираха *B. burgdorferi* в три кърлежа, за които е установено, че са негативни чрез ТПМ. От друга страна, 4 от 44-те позитивни на ТПМ кърлежи не са потвърдени чрез нито един от двата nPCR. Nefedova и сътр. в свое проучване сравняват двата метода ТПМ и PCR, където чрез PCR те откриват 10% повече заразени кърлежи, отколкото на тъмно поле. Въпреки това те посочват, че 8% от силно ТПМ-позитивните кърлежи не са дали PCR продукт.

В изследване на Alekseev и сътр. за наличие на *Borrelia burgdorferi* s.l. чрез ТПМ и PCR в кърлежи, събрани от балтийския район на Русия са съпоставени резултатите от двата метода. От позитивните на ТПМ кърлежи ($n = 472$) само 64,8% са амплифицирали PCR продукт съответстващ на *B. burgdorferi* s.l. При негативните ($n = 159$) на ТПМ, липсата на борелийна ДНК се потвърждава в 79,81%. Авторите допускат, че ТПМ е по-чувствителна от PCR за откриване на борелии. Откриването на ДНК на *Borrelia* в близо 20% от отрицателните проби на тъмно поле противоречи на техните резултати. За обяснение на несъответствието посочват следните причини: 1) деградация на ДНК по време на съхранението; 2) микроорганизмите, наблюдавани при ТПМ, може да представляват видове, различни от *B. burgdorferi* s.l.

Възможни причини за неуспешната амплификация могат да бъдат лабораторни грешки, които се дължат на различни причини. От друга страна, вероятна причина за липсата на амплификация може да бъде и малкото количество борелии в кърлежите. Подобни разлики в методите на изследване са получени и при сравняване на резултатите от ТПМ, култивиране в среда BSK II и PCR с използване на праймерна група, базирана на флагелиновия ген на *B. burgdorferi*.

Алтернативно обяснение за несъответствието в откриването на борелии чрез PCR и ТПМ може бъде и фактът, че за ТПМ се използва част от чревното съдържание и спирохетите може да са отсъствали или да не са били открити там. Невъзможността за откриване на спирохети чрез ТПМ може да се дължи на ограниченото им разпространение в този фрагмент от средното черво на кърлежа. По-добри резултати с PCR в сравнение с ТПМ са установени и при изследване на активно търсещи кърлежи от Финландия, в което са сравнени ТПМ, култивиране на *B. burgdorferi* s.l. и PCR.

Микроскопските техники, използвани като стандартна процедура в миналото, не позволяват да се прави разлика между геноспецифичните видове и ако не се използват правилно, могат да доведат до подценяване на степента на заразяване с *B. burgdorferi* s.l. От друга страна, докладваните в миналото честоти на разпространение на ЛБ спирохети сред кърлежи *I. ricinus* също биха могли да бъдат нереално високи поради неправилното идентифициране на спирохетите на ВТ *B. miyamotoi* чрез микроскопиране.

Като заключение, PCR методите са изключително прецизни и намират все по-голямо приложение в различни области на биологията и медицината. ТПМ е лесен, евтин и достъпен метод, подходящ за пилотни проучвания върху разпространението на борелии в кърлежовата фауна. Въпреки липсата на пълна съгласуваност на резултатите, използвани заедно или поотделно, те дават добра представа за разпространението на ЛБ сред популациите на *Ixodes ricinus*.

6. ПРОУЧВАНЕ НА ЗАЩИТЕНА МЕСТНОСТ „КАЙЛЪКА“ ЗА НАЛИЧИЕ НА *B. BURGDORFERI* S.L. В КЪРЛЕЖИ ОТ ВИДА *I. RICINUS*

В настоящото проучване голяма част от събраните и тествани кърлежи са от района на ЗМ „Кайлъка“. Тази местност е разположена непосредствено до града, лесно достъпна е, ежедневно се посещава от много граждани и се характеризира с богата флора и фауна. Това позволява събраният материал бързо и ефективно да се обработи и систематизира. Изследването на градски, крайградски паркове и градини за артроподи – вектори на различни трансмисивни заболявания през последните две десетилетия е изключително актуално. Голяма част от тях са насочени именно към иксодофауната и в частност към *I. ricinus* и свързаните с него инфекции.

Проучванията в България относно инфекциозността на *I. ricinus* с ЛБ в градските паркове е проведено през 2001 г. единствено за района на Борисовата градина в София, където е установена малко по-ниска инфекциозност на кърлежите - 45%. В достъпната специализирана литература друго подобно проучване за страната не беше открито. Аналогични изследвания на *I. ricinus* за наличие на *B. burgdorferi* s.l. в други страни от Балканския полуостров показват големи разлики в инфекциозността на кърлежите. При изследване на различни видове кърлежи, от които 30 *I. ricinus* от Босна и Херцеговина не са отчетени позитивни за *B. burgdorferi* s.l. кърлежи. Сравнително ниска инфекциозност на кърлежите показват проучвания от Румъния, като общото разпространението на *Borrelia* е 18 %. Един от изследваните райони е Гюргево, където се наблюдава повишена инфекциозност при възрастните форми - 19.8%. Отново в Румъния при изследване на 12 221 *I. ricinus* за различни геновидове на *B. burgdorferi* s.l. чрез PCR с интергенния спейсър на 23S-5S гена авторите съобщават за 1.4% общо

разпространение на инфекцията, като средното местно разпространение е между 0.75% и 18.8%.

В европейската част на Турция честотата на заразяване е 38.7% в Истанбул и 11.4% в района на Лозенград (Къркларели). Висока инфекциозност на кърлежите се съобщава в проучвания от Сърбия. Milutinović и сътр. изследват 18 различни области в Сърбия и установяват 42.5%, докато в друго проучване от Сърбия 49% от събраните кърлежи са позитивни за *B. burgdorferi* s.l. Тези различия в резултатите показват, че разпространението на борелиите не е хомогенно, а по-скоро има огнищен характер, свързан с условията, при които обитава техният вектор.

В своя метаанализ Rauter и Hartung класифицират районите според степента на заразяване на кърлежи с борелии на следните категории: ниска степен на заразяване (нимфи, ≤ 11 %; възрастни, ≤ 20 %), висока степен на заразяване (нимфи, > 11 %; възрастни, > 20 %) и изключително висока степен (> 30 %). Техният анализ показва, че средната степен на инфекция е 13,7% от общо 112 579 кърлежа, изследвани в Европа за периода от 1984 до 2003 г. Друг метаанализ, основан на откриване на *B. burgdorferi* s.l. главно чрез PCR (2010-2016 г.), показва, че общото средно разпространение на *B. burgdorferi* s.l. в кърлежи *I. ricinus* достига 12,3% за Европа. Резултатите от това проучване определят ЗМ „Кайлъка“ като район с изключително високо ниво на инфекция.

Въпреки нарастващия брой случаи на ЛБ, както в Европа, така и в Плевен, популациите от кърлежи в областта и в частност ЗМ „Кайлъка“ не са изследвани до този момент за инфекция с *B. burgdorferi* s.l. В настоящото проучване се потвърждава наличието на ЛБ чрез ТПМ и PCR, както в поддържаните градски зони, така и в дивите райони на парка.

Между градските и дивите зони се наблюдава по-голям процент на позитивни *I. ricinus* в поддържаните части, но разликата не е значима. В проучване, проведено в Германия (Бон), където сравняват инфектираността на кърлежи, събрани от 3 различни типа зони (градски паркове, частни градински площи и крайградски паркове) също не констатират статистически значими разлики в инфектираността между различните зони.

С най-голям дял на позитивни за *B. burgdorferi* s.l. се оказват кърлежите събрани от W1 (63,93%). Тази зона е изключително благоприятна за оцеляването на *Ixodes ricinus*, тъй като заема участък с гъста растителност, оформящи малки фрагментирани гористи зони, с различни по големина ливадни участъци. От друга страна, влагата от реката помага на популациите от кърлежи да оцелеят и да поддържат ензоотичния цикъл на *B. burgdorferi* s.l. Един от основните фактори, който се счита за благоприятстващ развитието и разпространението на *Ixodes ricinus* е именно фрагментацията на горите. Такъв тип мозаечност в растителността увеличава броя на подходящите хабитати за различни

компетентни гостоприемници, което води до увеличаване на популациите от кърлежи, свързани с тях. Това се подкрепя от факта, че значително по-голям процент инфектирани кърлежи отчитаме в W1 спрямо тези събирани от района на х. „Среброструй“ (W2) и Бохотската гора (W4). Зоните W2 и W4 се намират в гориста част с по-малко ливадни участъци, т.е. ниска степен на фрагментация.

От поддържаните зони, U2 е с най-голям процент позитивни за *B. burgdorferi* s.l. *Ixodes ricinus* (57,58%). Това е една от най-посещаваните части в ЗМ „Кайлъка“. Високата степен на инфектираност може да се обясни с това, че: 1) територията е силно фрагментирана; 2) на територията се намират заведения за хранене, които привличат безстопанствени кучета, както и местни животни (грязачи и птици). Подобни резултати за градски паркове, с висока честота на инфекция в локалните популации на *I. ricinus*, са установени и в Хелзинки. Авторите доказват, че инфектирани популации от кърлежи *I. ricinus*, силно заразени с *B. burgdorferi*, могат да съществуват дори в градска среда, която не е населена с едри бозайници. Случаят със зона U2 е подобен, тъй като въпреки наличие на едри бозайници (сърни, глигани) на територията на ЗМ „Кайлъка“, те навлизат изключително рядко в поддържаните участъци.

В обзора на Herrmann и Gern (2015) се разглежда влиянието на *B. burgdorferi* s.l. върху поведението на *I. ricinus*. Отбелязва се, че заразените кърлежи имат по-продължителен период на търсене и по-голяма устойчивост на изсушаване. Тъй като кърлежите, уловени с флаг представляват само активно търсещите кърлежи, най-вероятно по-високата инфекциозност в зони W1 и U1 се дължи на този факт.

Високата честота на борелии в кърлежите, обитаващи определени зони за отдих, представлява риск за посетителите на парка, които може да бъдат ухапани от заразен кърлеж. Редовното третиране на тревните площи срещу кръвосмучещи членестоноги и поставянето на информационни табели за наличието на кърлежи на високорисковите места би било ефективно за повишаване на вниманието и предпазване на посетителите. Събирането на данни за популациите на кърлежите и техните патогени може да помогне за насочване на кампаниите за обществено здраве, особено за посетители с ограничени познания за кърлежите и патогените, които те могат да пренасят в такива райони.

Въпреки, че кърлежово-преносимите инфекции са обект на интензивни проучвания в световен мащаб, в България са извършени сравнително малко проучвания в тази област. За първи път в настоящото проучване се разглеждат проблеми, свързани, както с иксодофауната така и с разпространението на спирохетите от групата на ЛБ в Плевенска област.

Проучването дава основа за допълнителни научни изследвания, включващи връзка между патогените в кърлежите, микроклимата и анализа на разпространението на гостоприемниците. В настоящото проучване кърлежите от вида *Ixodes ricinus* са потенциални или признати преносители на широк спектър

от животински/човешки патогени (*Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella clarridgeia*, *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. и др), което засилва необходимостта от създаването и прилагането на програми за контрол в района, целящи намаляване, както на числеността на кърлежите, така и на въздействието на факторите на околната среда, благоприятстващи развитието и разпространението на кърлежите. Екологичният анализ, базиран на географска информационна система (ГИС) позволява да се анализира информацията за специфичните подходящи местообитания за тези видове кърлежи в района, което осигурява полезна база за контролни интервенции.

Картирането на кърлежите и инфектираните с борелии вектори в района би било полезен инструмент при вземането на решения от страна на здравните органи с цел определяне на възможния риск за специфичните трансмисивни патогени. Настоящото проучване би могло да помогне за избора на адекватни стратегии за контрол на вредителите, с цел опазване на общественото здраве.

V. ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ

1. Извършеният ретроспективен анализ на данни от НСИ и РЗИ-Плевен, показва, че в област Плевен ежегодно се регистрират случаи на кърлежово-преносими инфекции. Най-много са случаите на ЛБ, като по този показател Плевен се подрежда на 9-то място в страната.
2. Извършените теренни проучвания показват наличието на различни екзофилни представители от иксодофауната, като най-разпространен се оказва видът *I. ricinus*, явяващ се и основният преносител на ЛБ в Европа.
3. Използваните методи за събиране на кърлежи от естествените им хабитати и картирането са подходящи за оценка на разпространението на *B. burgdorferi* s.l. и удачно описват епизоотичната обстановка в изследвания район.
4. Установеният модел на активност при търсене на гостоприемници от *I. ricinus* е унимодален, като обхваща пролето-летния сезон с пик през месеците април – май:
 - a. Максималната активност на *I. ricinus* в търсенето на гостоприемник е при 20°C.
 - b. Най-голям е броят на събраните кърлежи при 60% относителна влажност на въздуха.
5. Установено е наличие на спирохети от комплекса *B. burgdorferi* s.l. в техните вектори от различни зони в Плевенска област
6. Установени са нови, неописани до момента огнища с висока плътност на *I. ricinus*, в част от които заразеността на кърлежите е с екстремно високи стойности за носителство на спирохети.

7. При сравняването на райони, в които се прилагат мерки за обезпаразитяване с такива от естествен тип не се открива разлика в наличието и разпространението на кърлежите.
8. Не се открива разлика в инфектираността на кърлежите от вида *I. ricinus* с *B. burgdorferi* s.l. между изследваните райони.
9. Екологичният анализ, базиран на ГИС е подходящ за обобщаване информацията относно специфичните местообитания за видовете кърлежи в района, което може да се използва като модел за контролни интервенции.
10. Оценката на риска от заразяване на населението в района на Плевен на базата на анализа за инфектираност на изследваните кърлежи, както и изработването на карти с данни за установените огнища с кърлежови популации и нивата им на инфектираност с *B. burgdorferi* s.l. биха могли успешно да се приложат като модел и стратегия за управление и профилактика на разглежданите инфекциозни заболявания, както и за комплексни проучвания в други райони на страната.

VI. ПРИНОСИ

На базата на проведените в настоящия дисертационен труд проучвания, получените резултати и обсъждането им могат да се формулират следните приноси:

1. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. Проведено е комплексно ретроспективно епидемиологично, социално-демографско проучване на популационни извадки с доказана ЛБ.
2. За първи път в Плевенска област е направено проучване на популациите от иксодови кърлежи.
3. За първи път е използвана честотата на активно причакващите кърлежи като индекс за сравнение на различните популации *I. ricinus*.
4. За първи път в Плевенска област се изследват популациите на *I. ricinus* за носителство на спирохети от комплекса *B. burgdorferi* s.l.
5. За първи път в България е проучена популационната плътност и честота на кърлежите от вида *I. ricinus*.
6. За първи път в България се улавя и идентифицира активно причакващ женски индивид от вида *Ixodes frontalis*.
7. Оригинален принос на проучването е установяването на ареали на *Ixodes ricinus* с екстремно висок процент на инфектираност с *B. burgdorferi* s.l.
8. За първи път в България се извършва сравняване на кърлежовите популации събирани от зони с регулярно третиране и поддържане на тревните площи с естествени неподържани райони.

2. ПРИНОСИ С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР:

1. Извършена е оценка на риска от заразяване на населението в района на Плевен на базата на анализа за инфектираност на изследваните кърлежи.
2. Изработени са карти с данни за установените огнища с кърлежови популации и тяхната инфектираност с *B. burgdorferi* s.l.
3. Направеното проучване може да се използва като модел и стратегия за управление и профилактика на разглежданите инфекциозни заболявания, а също и за комплексни проучвания в други райони на страната.

3. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР:

1. Потвърждава се важното епидемиологично значение на *Ixodes ricinus* в ензоотичния цикъл на *B. burgdorferi* s.l.
2. Потвърдени са най-често срещаните екзофилни иксодови кърлежи с медицинско значение за човека в Плевенска област.
3. Потвърден е унимодалният модел на активност при вида *I. ricinus* за територията на Плевенска област.
4. Потвърждава се трансстадийния път на предаване на *B. burgdorferi* s.l.
5. Потвърдено е влиянието на температурата и относителната влажност на въздуха върху активността на кърлежите от вида *I. ricinus*.

VII. ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Списък на научните публикации във връзка с дисертацията:

1. Blazhev A, Karcheva M, Tsenova A, Blazheva S, Kostov K. Serological tests for lyme borreliose. General Medicine. 2018;20(3):20-4. **URL:** <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85056886355&partnerID=40&md5=b1f59de2508382a8321e0545dfb2fbc9>
ISSN: 1311-1817 Q4
2. Blazhev A, Karcheva M, Yordanova N, Kostovska M. Tick-borne infections in the pleven region - environmental and epidemiological aspects. General Medicine. 2018;20(1):30-5. **URL:** <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85047321879&partnerID=40&md5=28a2d98113bcaa719dd159ed08b0ca99>
ISSN: 1311-1817 Q4
3. Blazhev A, Stanilov I, Miteva LD, Atanasova M, Blazheva S, Stanilova S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Senu Lato in *Ixodes ricinus* Ticks Collected from Kaylaka Park in Pleven, Bulgaria. Microorganisms. 2022 Apr 3;10(4):772. DOI: 10.3390/microorganisms10040772 **ISSN: 2076-2607; IF = 4.926; SJR = 0.86; Q2**

2. Списък на участията в научни конференции във връзка с дисертацията:

2.1. Участия в научни форуми в България (8)

1. A. B. Blazhev, M. D. Karcheva, M. A. Atanasova, K. S. Ilieva, S. O. Blazheva, K. G. Kostov STUDY OF THE HARD TICK POPULATIONS IN PLEVEN REGION AND THEIR INFECTIVITY WITH *BORRELIA BURGENDORFERI* SENSU LATO XII Национална конференция по медицинска биология Цигов чарк 8-10 септември 2017
2. A. B. Blazhev, M.D. Karcheva, K. S. Ilieva, K. G Kostov TICK-BORNE INFECTIOUS DISEASES IN THE PLEVEN REGION; XII Национална конференция по медицинска биология Цигов чарк 8-10 септември 2017
3. A. B. Blazhev, Ts. Doichinova, S. Blazheva, M. Atanasova, M. Karcheva Study of infectivity with *Borrelia burgdorferi* s.l. among *Ixodes ricinus* population in Pleven region, Bulgaria. Third International Conference on Zoology, Zoonoses and Epidemiology October 21 – 23, 2019, Hissar, Bulgaria.
4. Emilova N, Akisheva A, Makaveeva P, Blazhev A, Karcheva M. Sero Epidemiological Study Of Lyme Disease Susceptible Persons In Pleven Region. Black Sea Symposium for Young Scientists in Biomedicine 2018 with a Special Jubilee Session on Healthcare Management. April 12, 2018 – April 15, 2018. Medical University Prof. Dr. Paraskev Stoyanov, Varna.
5. Blazhev A, Blazheva S, Doichinova T, Karcheva M, Atanasova M. The estimation scale of endangerment with tick attacks in Kaylaka park, Pleven. XIII Conference of Medical Biology Sept 13-15, 2019; Varna: Varna Medieval Forum; 2019. p. 29-30.
6. Blazhev AB, Doichinova TG, Blazheva SO, Atanasova MA, Karcheva MD. Hot spots infested with Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) around Pleven, Bulgaria and their role as vectors of Lyme borreliosis. JBCR. 2019;12 supl 2:140-1.
7. Александър Блажев, Цеца Дойчинова, Милена Карчева, Светла Блажева, Милена Атанасова. Горещи точки, заразени с Иксодови кърлежи (Acari: Ixodidae) около Плевен, България и тяхната роля като вектори на Лаймска борелиоза. Юбилейна научна конференция - 45 години на висшето училище в Плевен. 31.10.2019 до 02.11.2019 г.

2.2. Участия в научни форуми в чужбина

Blazhev A, Karcheva M, Blazheva S, Ilieva K, Atanasova M. Foci of hard ticks (Ixodidae) in areas with increased outdoor activity near to the town of Pleven, Bulgaria. 35th Balkan Medical Week 25th-27th September 2018 Athenes Greece

2.3. Участие в проекти:

1. №4/2017 Проучване на заразеността с *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato при иксодови кърлежи в Плевенска област
2. №20/2019 Проучване разпространението на *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato сред кърлежи от вида *Ixodes ricinus* в защитена местност „Кайлъка”