

# **СБОРНИК НАУЧНИ ТРУДОВЕ**

**XX НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС  
ПО КЛИНИЧНА МИКРОБИОЛОГИЯ И  
ИНФЕКЦИИ НА БЪЛГАРСКАТА  
АСОЦИАЦИЯ НА МИКРОБИОЛОЗИТЕ**



**Пловдив, 16.09–18.09.2022 г.  
Аудиторен комплекс, МУ - Пловдив**

## **ГЕНЕРАЛНИ СПОНСОРИ:**



---

## **ЗЛАТЕН СПОНСОР:**



---

## **СПОНСОРИ**

АА МЕДИКЪЛ БЪЛГАРИЯ ООД  
БИОМЕДИКА БЪЛГАРИЯ ЕООД  
БИОМЕД ФЮЧАР ЕООД  
БИОСИСТЕМИ ООД  
ДИАМЕД ООД  
ДИАХИМ ЕАД  
ИНТЕРБИЗНЕС 91 ЕООД  
МЕДИКЛИМ ЕООД  
MEDISON PHARMA BULGARIA  
РИДАКОМ ЕООД  
РСР ООД  
СИНМЕД БЪЛГАРИЯ ООД  
ФОТ ООД

## Съдържание

### СЕСИЯ I: ОТЧЕТ ЗА ДЕЙНОСТТА НА НАЦИОНАЛНИ РЕФЕРЕНТНИ ЦЕНТРОВЕ ...8

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР „РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ И ТУБЕРКУЛОЗА” - АНАЛИЗ НА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2021-2022 ..... 8

NATIONAL REFERENCE CENTER “RESPIRATORY INFECTIONS AND TUBERCULOSIS” – ANALYSIS OF ACTIVITY IN 2021-2022..... 8

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, ПРЕДАВАНИ С ХРАНИ И ВОДИ (НРЦ-ИПХВ), АНАЛИЗ НА ЗАБОЛЯЕМОСТТА, 2021 г. .... 9

NATIONAL REFERENCE CENTER FOR FOOD- AND WATERBORNE DISEASES (NRC FWD), MORBIDITY ANALYSIS, 2021 ..... 10

ДОКЛАД НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО МИКРОБНА ЛЕКАРСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И АНТИБИОТИЧНА КОНСУМАЦИЯ ..... 11

REPORT FROM THE NATIONAL REFERENCE CENTER FOR MICROBIAL DRUG RESISTANCE AND ANTIBIOTIC USE..... 12

БАКТЕРИАЛНИ, ВИРУСНИ И ПАРАЗИТНИ ВЕКТОР-ПРЕНОСИМИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2021 Г. .... 13

BACTERIAL, VIRAL AND PARASITIC VECTOR-BORNE INFECTIONS IN BULGARIA, 2021..... 13

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ЗООАНТРОПОНОЗИ С ЕПИДЕМИЧЕН РИСК, НОВИ ИНФЕКЦИИ И УПРАВЛЕНИЕ НА БИОРИСКА -2021 (НРЦ ЗЕРНИ-УБ).... 14

NATIONAL REFERENT CENTER OF ZOONOSES WITH EPIDEMIC RISK, NEW INFECTIONS AND BIOHAZARD MANAGEMENT – 2021 (NRC ZERNI-BM)..... 15

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР „СЕКСУАЛНО-ПРЕДАВАНИ ИНФЕКЦИИ (СПИ) И ВИРУСНИ ХЕПАТИТИ” ..... 15

NATIONAL REFERENCE CENTER "SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS (STIs) AND VIRUS HEPATITIS" ..... 16

ДЕЙНОСТИ НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, СВЪРЗАНИ С МЕДИЦИНСКО ОБСЛУЖВАНЕ (НРЦ-ИСМО) ПРЕЗ 2021г. .... 17

ACTIVITIES OF THE NATIONAL REFERENCE CENTER OF HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS (NRC-HAI) IN 2021 ..... 18

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМИ ИНФЕКЦИИ: ГОДИШЕН ДОКЛАД ЗА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2021 Г. .... 18

NATIONAL REFERENCE CENTER “VACCINE PREVENTABLE INFECTIONS”: ANNUAL REPORT FOR 2021..... 20

### СЕСИЯ II: МИКРОБНА ЛЕКАРСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ .....22

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА ХЕМАТОГЕНЕН ОСТЕОМИЕЛИТ ПРИЧИНЕН ОТ SALMONELLA ГРУПА ОВ..... 22

CLINICAL CASE OF HEMATOGENIC OSTEOMYELITIS CAUSED BY SALMONELLA GROUP OV ..... 23

ЕТИОЛОГИЧНА СТРУКТУРА И АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА ИЗОЛАТИ ОТ ПАЦИЕНТИ С ДОКАЗАНА COVID-19 ИНФЕКЦИЯ ОТ УМБАЛ “ПРОФ. Д-Р СТ. КИРКОВИЧ“ АД ЗА ПЕРИОД ОТ 01.01.2021 ДО 01.06.2022 Г.....	23
ETIOLOGICAL STRUCTURE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ISOLATES FROM PATIENTS WITH PROVEN COVID-19 INFECTION FROM THE UNIVERSITY HOSPITAL "PROF. DR. KIRKOVICH AD FOR THE PERIOD FROM 01.01.2021 TO 01.06.2022. ....	24
ОЦЕНКА НА COLISPOT ТЕСТА КАТО ЛЕСЕН ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ, РЕНТАБИЛЕН СКРИНИНГОВ ИНСТРУМЕНТ ЗА ОТКРИВАНЕ НА УСТОЙЧИВИ НА ПОЛИМИКСИНИ <i>ENTEROBACTERIALES</i> И <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	25
EVALUATION OF THE COLISPOT TEST AS AN EASY, COST-EFFECTIVE SCREENING TOOL FOR DETECTION OF POLYMYXIN RESISTANT <i>ENTEROBACTERIALES</i> AND <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	26
МОЛЕКУЛЯРНА ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА КАРБАПЕНЕМ-РЕЗИСТЕНТНИ ИЗОЛАТИ ОТ СЕМЕЙСТВО <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> , ПОЛУЧЕНИ ОТ ПАЦИЕНТИ, ХОСПИТАЛИЗИРАНИ В COVID-19 КЛИНИКИ И ИНТЕНЗИВНИ КЛИНИКИ НА УМБАЛ“СВЕТА МАРИНА“, ВАРНА В ПЕРИОДА 2020 – 2021 .....	27
MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF CARBAPENEM-RESISTANT <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> ISOLATES, OBTAINED FROM PATIENTS, HOSPITALIZED IN COVID-19 WARDS AND ICUS OF UNIVERSITY HOSPITAL “SAINT MARINA”, VARNA DURING THE PERIOD 2020 – 2021 .....	27
ЕДИН БАКТЕРИОЛОГИЧЕН ОТЧЕТ НА СБАЛ ПО ДЕТСКИ БОЛЕСТИ В УСЛОВИЯТА НА ВИРУСНА ПАНДЕМИЯ ОТ КОВИД-19.....	28
A BACTERIOLOGICAL REPORT OF A SPECIALIZED PEDIATRIC HOSPITAL IN THE SETTINGS OF THE COVID-19 PANDEMIC .....	30
<b>СЕСИЯ III: COVID-19.....</b>	<b>32</b>
ВИРУСНА ЕТИОЛОГИЯ НА КО-ИНФЕКЦИИТЕ СЪС SARS-COV-2 И ДРУГИ РЕСПИРАТОРНИ ПАТОГЕНИ В БЪЛГАРИЯ.....	32
VIRAL AETIOLOGY OF CO-INFECTIONS WITH SARS-COV-2 AND OTHERS RESPIRATORY PATHOGENS IN BULGARIA .....	33
ПЪРВИ СЛУЧАИ НА ПОСТВАКСИНАЛНА ИНФЕКЦИЯ СЪС SARS-COV-2 ALPHA (B.1.1.7) ВАРИАНТ СРЕД ЗДРАВНИ РАБОТНИЦИ В БЪЛГАРИЯ.....	34
FIRST CASES OF POSTVACCINATION INFECTION WITH SARS-COV-2 ALPHA (B.1.1.7) VARIANT AMONG HEALTHCARE WORKERS IN BULGARIA.....	35
Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНИТЕТ СРЕЩУ SARS-COV-2: КАКВО НАУЧИХМЕ.....	36
SARS-COV-2 SPECIFIC T-CELL IMMUNITY: THE LESSONS LEARNED.....	37
ДЕТЕКЦИЯ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА SARS-COV-2 СПЕЦИФИЧНИТЕ ПАМЕТОВИ Т ЛИМФОЦИТИ 6 И 12 МЕСЕЦА СЛЕД ПРЕКАРАНА ИНФЕКЦИЯ .....	38
DETECTION AND CHARACTERIZATION OF SARS-COV-2 SPECIFIC MEMORY T-LYMPHOCYTES 6 AND 12 MONTHS AFTER INFECTION .....	39
ОЦЕНКА НА БИМОЛЕКУЛНОТО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И КИНЕТИКАТА НА СВЪРЗВАНЕ НА SARS-COV-2 СТРУКТУРНИ ПРОТЕИНИ И СПЕЦИФИЧНИ АНТИТЕЛА ЧРЕЗ МЕТОДА НА ПОВЪРХНИНЕН ПЛАЗМОНЕН РЕЗОНАНС (SPR).....	40

ASSESSMENT OF BIMOLECULAR INTERACTION AND BINDING KINETICS OF SARS-COV-2 STRUCTURAL PROTEINS AND SPECIFIC ANTIBODIES BY SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) METHOD .....	41
OMICRON – УСПОКОЕНИЕ ИЛИ ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВО?.....	42
OMICRON – RELIEF OR CHALLENGE?.....	43
CLOSTRIDIUM DIFFICILE АСОЦИИРАНА ДИАРИЯ СЛЕД COVID 19 – ОПИТЪТ НА КЛИНИКА ПО ИНФЕКЦИОЗНИ БОЛЕСТИ КЪМ УМБАЛ „ПРОФ. СТОЯН КИРКОВИЧ“-АД, СТАРА ЗАГОРА.....	44
CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASSOCIATED DIARRHEA AFTER COVID 19 - THE EXPERIENCE OF THE CLINIC OF INFECTIOUS DISEASES AT THE UNIVERSITY HOSPITAL "PROF. STOYAN KIRKOVICH" AD, STARA ZAGORA .....	44
ПОСТ COVID ИНФЕКЦИЯ С ВИСЦЕРАЛНА ЛАЙШМАНИОЗА – ПОТЕНЦИАЛЕН РИСК ОТ ЖИВОТОЗАСТРАШАВАЩО СЪСТОЯНИЕ: ПРЕДСТАВЯНЕ НА КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ.....	45
POST COVID INFECTION WITH VISCERAL LEISHMANIASIS - POTENTIAL RISK TO LIFE-THREATENING CONDITION: PRESENTATION OF A CLINICAL CASE .....	46
<b>СЕСИЯ IV: ИНФЕКЦИИ НА РЕСПИРАТОРНИЯ ТРАКТ И ТУБЕРКУЛОЗА.....</b>	<b>47</b>
ВИДОВО РАЗНООБРАЗИЕ НА ИЗОЛИРАНИТЕ В БЪЛГАРИЯ КЛИНИЧНО ЗНАЧИМИ НЕТУБЕРКУЛОЗНИ МИКОБАКТЕРИИ .....	47
SPECIES DIVERSITY OF CLINICALLY SIGNIFICANT NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA ISOLATED IN BULGARIA .....	48
ГЕНОТИПНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА РИНОВИРУСИ, ЦИРКУЛИРАЛИ В БЪЛГАРИЯ В ПЕРИОДА 2019-2021 .....	48
GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF RHINOVIRUSES CIRCULATED IN BULGARIA, 2019-2021 .....	49
ОСТРИ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ – СЪВРЕМЕНЕН МИКРОБИОЛОГИЧЕН ПОДХОД.....	50
ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS IN CHILDHOOD – AN ADVANCED MICROBIOLOGICAL APPROACH.....	51
<b>СЕСИЯ V: СЕКСУАЛНО ПРЕДАВАНИ ИНФЕКЦИИ.....</b>	<b>53</b>
АНАЛИЗ НА ТРАНСМИСИОННИТЕ РЕЗИСТЕНТНИ МУТАЦИИ И РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА СУБТИПОВЕТЕ НА HIV-1 В БЪЛГАРИЯ 2012-2021 .....	53
ANALYSIS OF THE TRANSMITTED DRUG RESISTANCE MUTATIONS AND DISSEMINATION OF HIV-1 SUBTYPES IN BULGARIA 2012-2021 .....	54
ЕНДОМЕТРИАЛЕН МИКРОБИОМ ПРИ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ ПРОБЛЕМИ.....	55
ENDOMETRIAL MICROBIOME IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE PROBLEMS .....	56
<b>СЕСИЯ VI: ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМИ ИНФЕКЦИИ.....</b>	<b>57</b>
ПНЕВМОКОКОВО НОСИТЕЛСТВО И РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА СЕРОТИПОВЕТЕ ПРИ ЗДРАВИ ДЕЦА ДО 6 ГОДИШНА ВЪЗРАСТ В БЪЛГАРИЯ СЛЕД ВЪВЕЖДАНЕ НА PCV10 В НАЦИОНАЛНИЯ ВАКСИНАЦИОНЕН КАЛЕНДАР .....	57

PNEUMOCOCCAL CARRIAGE AND PREVALENCE OF SEROTYPES IN HEALTHY CHILDREN UP TO 6 YEARS OF AGE IN BULGARIA AFTER INTRODUCTION OF PCV10 IN THE NATIONAL VACCINATION CALENDAR.....	58
ЛАБОРАТОРНО ДОКАЗВАНЕ НА ПЪРВИ СЛУЧАИ НА ВИРУСА НА МАЙМУНСКА ВАРИОЛА В БЪЛГАРИЯ.....	59
LABORATORY DETECTION OF FIRST CASES OF MONKEYPOX VIRUS IN BULGARIA	60
<b>СЕСИЯ VII: ИНФЕКЦИИ, ПРИЧИНЯВАНИ ОТ ХРАНИ И ВОДИ.....</b>	<b>61</b>
ДИАГНОСТИЧНИ ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА ПРИ ИНФЕКЦИИ С НЕПОЛИОМИЕЛИТНИ ЕНТЕРОВИРУСИ.....	61
DIAGNOSTIC CHALLENGES IN INFECTIONS WITH NON-POLIOMYELITIS ENTEROVIRUSES.....	61
АНАЛИЗ НА МИКРОБИОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА НА КОЛИЕНТЕРИТИ В БЪЛГАРИЯ. КЪДЕ ГРЕШИМ?.....	62
ANALYSIS OF THE MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF <i>E. COLI</i> ENTERITIS IN BULGARIA. WHERE ARE WE WRONG?.....	63
СЕРОТИПИРАНЕ НА ЩАМОВЕ <i>SALMONELLA</i> ENTERITIS ЧРЕЗ ЦЕЛОГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНЕ И СОФТУЕЪРА SISTR.....	64
SEROTYPING OF <i>SALMONELLA</i> ENTERITIS STRAINS BY WHOLE GENOME SEQUENCING AND SISTR SOFTWARE.....	65
АНТИ- <i>SALMONELLA</i> ПОТЕНЦИАЛ НА ЛАКТОБАЦИЛИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ КЪРМА, ВАГИНАЛНИ СЕКРЕТИ И МЛЕЧНИ ПРОДУКТИ.....	65
ANTI- <i>SALMONELLA</i> POTENTIAL OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM BREAST MILK, VAGINAL SWABS AND DAIRY PRODUCTS.....	66
<b>СЕСИЯ VIII: ВЕКТОРНО-ПРЕДАВАНИ ИНФЕКЦИИ .....</b>	<b>68</b>
МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА КЪРЛЕЖИ СЪБРАНИ ОТ ПТИЦИ .....	68
MOLECULAR – GENETIC TESTING OF TICKS COLLECTED FROM BIRDS.....	68
ГРАЖДАНСКАТА НАУКА И РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА АЗИАТСКИЯ ТИГРОВ КОМАР <i>Aedes albopictus</i> В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2021 Г.....	69
CITIZEN SCIENCE AND THE SPREAD OF THE ASIAN TIGER MOSQUITO <i>Aedes albopictus</i> IN BULGARIA IN 2021.....	70
ПАРАЗИТНИТЕ БОЛЕСТИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2021 Г. ....	70
PARASITIC DISEASES IN BULGARIA IN 2021 .....	71
<b>СЕСИЯ IX: ИНФЕКЦИИ, СВЪРЗАНИ С МЕДИЦИНСКОТО ОБСЛУЖВАНЕ И ИНФЕКЦИИ. ЗООАНТРОПОНОЗИ С ЕПИДЕМИЧЕН РИСК.....</b>	<b>73</b>
ВЪЗНИКВАЩИ ПРИЧИНИТЕЛИ НА ИНФЕКЦИИ, ИДЕНТИФИЦИРАНИ С MALDI-TOF .....	73
EMERGING AGENTS OF INFECTION IDENTIFIED BY MALDI-TOF.....	73
ЦИТОКИНОВ ПРОФИЛ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТЪР БАКТЕРИАЛЕН МЕНИНГИТ .....	74

CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH ACUTE BACTERIAL MENINGITIS.....	75
РИСКЪТ ОТ БИОТЕРОРИЗЪМ И ПРОБЛЕМИ НА СИГУРНОСТТА .....	76
RISK OF BIOTERRORISM AND PROBLEMS OF SECURITY .....	77
ЗДРАВЕОПАЗВАНЕ И НАЦИОНАЛНА СИГУРНОСТ – ОБЩИ ПРОБЛЕМИ ПО ВРЕМЕ НА ПАНДЕМИЯТА ОТ COVID-19 .....	77
HEALTHCARE AND NATIONAL SECURITY - COMMON PROBLEMS DURING THE COVID-19 PANDEMIC .....	78

## СЕСИЯ I: ОТЧЕТ ЗА ДЕЙНОСТТА НА НАЦИОНАЛНИТЕ РЕФЕРЕНТНИ ЦЕНТРОВЕ ПО ИНФЕКЦИИ С ОТРАЖЕНИЕ ЗА ОБЩЕСТВЕННОТО ЗДРАВЕ ЗА 2021 Г.

### НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР „РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ И ТУБЕРКУЛОЗА” - АНАЛИЗ НА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2021-2022

*Н.Корсун, Е.Бачийска, В.Левтерова, М.Николова, И.Трифенова, В.Добринов, И.Григорова, И.Маджарова, Н.Бранкова, И.Томова, А.Дечева, С.Панайотов, А.Минкова, Н.Владиминова, Ю.Атанасова, С.Йорданова, Я.Тодорова, А.Байкова, С.Ангелова*

Обобщени са резултатите от епидемиологичния и лабораторен надзор на инфекциите на респираторния тракт с вирусна и бактериална етиология в България.

Материали и методи: Епидемиологичният анализ на заболяемостта от грип/ОРЗ бе извършен въз основа на данните от интернет-базираната Информационна система. През сезон 2021/2022 г. 1913 назофарингеални секрета на пациенти с грипоподобни заболявания/ОРЗ бяха тествани едновременно за SARS CoV-2 и грипни вируси тип А/Б. Респираторни проби на 542 пациента бяха изследвани спрямо 8 други респираторни вируса. Извършени бяха 437 рутинни изследвания за туберкулоза на 191 клинични проби и 107 потвърдителни изследвания на 66 щам, изпратени от лабораториите в страната, както 170 специализирани изследвания. Осъществена бе видова идентификация на нетуберкулозните микобактерии (NTM). Чрез PCR бяха извършени диагностични изследвания за коклюш, паракоклюш, *Chlamydia* (*C.psittaci*, *C.pneumoniae*), *M.pneumoniae*, *L.pneumophyla*, *H. influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C.burnetii*, *L.monocitogenes* и *N.meningitidis*. Проучено бе носителството на *S.pneumoniae* при 224 деца на възраст 1- 5 г.

**Резултати:** През сезон 2021/2022 г. бяха идентифицирани 93 грипни вируси, всички А(Н3N2). SARS-CoV-2 бе доказан в 385 (20%) от изследваните клинични проби. Сред останалите негрипните респираторни вируси най-често бяха идентифицирани риновируси и РСВ. Общо 28 щам бяха идентифицирани като *M.tuberculosis complex*, а 54 - като NTM. Доказани/потвърдени бяха 16 резистентни туберкулозни щам, 7 от които бяха MDR. Положителни резултати за коклюш и паракоклюш бяха получени при 6 (6,1%) и 2 (2.7%) от изследваните пациенти, съответно. *N.meningitidis* беше доказана в 45 (28,3%) от изследваните 159 проби. Носителство на *S.pneumoniae* бе установено при 73 (32,6%) изследвани деца на възраст 1-5 год.

**Заключение:** НРЦ „Респираторни инфекции и туберкулоза” интегрираше усилията на различни специалисти с цел по-пълното и комплексно проучване на респираторните инфекции и туберкулозата в България.

### NATIONAL REFERENCE CENTER “RESPIRATORY INFECTIONS AND TUBERCULOSIS” – ANALYSIS OF ACTIVITY IN 2021-2022

*N.Korsun, E.Bachiyska, V.Levterova, M.Nikolova, I.Trifonova, V.Dobrinov, I.Grigorova, I.Madzharova, N.Brankova, I.Tomova, A.Detcheva, S.Panaiotov, A.Minkova, N.Vladimirova, Y.Atanasova, S.Yordanova, Y.Todorova, A.Baykova, S.Angelova*



The results of epidemiological and laboratory surveillance of the respiratory tract infections with viral and bacterial etiology in Bulgaria are summarized.

**Materials and methods:** Epidemiological analysis of the influenza/ARI incidence was performed on the basis of data from internet-based information systems. During the 2021/2022 season, a total of 1913 nasopharyngeal swabs of patients with influenza-like illness/ARI were tested simultaneously for SARS CoV-2 and influenza type A/B viruses. Respiratory specimens of 542 patients were examined for 8 other respiratory viruses. 437 routine tuberculosis tests were performed on 191 clinical samples, as well as 107 confirmatory tests on 66 strains sent by laboratories in the country and 170 specialized investigations. Species identification of non-tuberculous mycobacteria (NTM) strains was done. PCR testing for pertussis, parapertussis, Chlamydia (*C.psittaci*, *C.pneumoniae*), *M.pneumoniae*, *L.pneumophyla*, *H. influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *C.burnetii*, *L.monocitogenes* and *N.meningitidis* was performed. Carriership of *S. pneumoniae* in 224 children aged 1-5 years was studied.

**Results:** In the 2021/2022 season, 93 influenza viruses were identified, all A (H3N2). SARS-CoV-2 was detected in 385 (20%) of the studied clinical samples. Among other respiratory viruses, rhinoviruses and RSV were most commonly identified. A total of 28 strains were identified as *M. tuberculosis* complex and 54 as NTM; 16 resistant tuberculosis strains were detected / confirmed, 7 of which were MDR. Positive results for pertussis and parapertussis were obtained in 6 (6.1%) and 2 (2.7%) of the studied patients, respectively. *N. meningitidis* was detected in 45 (28.3%) of the 159 samples tested. Carriers of *S. pneumoniae* were 73 (32.6%) studied children aged 1-5 years.

**Conclusions:** NRC "Respiratory infections and tuberculosis" integrated the efforts of various experts for a more complete and comprehensive study of respiratory infections and tuberculosis in Bulgaria.

## НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, ПРЕДАВАНИ С ХРАНИ И ВОДИ (НРЦ-ИПХВ), АНАЛИЗ НА ЗАБОЛЯЕМОСТТА, 2021 Г.

Л. Николаева-Гломб<sup>1</sup>, И. Райнова<sup>1</sup>, Х. Даскалов<sup>2</sup>, Г. Каменов<sup>1</sup>, Н. Цветкова<sup>1</sup>, М. Павлова<sup>1</sup>, А. Стоянова<sup>1</sup>, И. Георгиева<sup>1</sup>, Т. Тенев<sup>1</sup>, Н. Владимирова<sup>1</sup>, А. Минкова<sup>1</sup>, Е. Тасева<sup>1</sup>, Н. Бранкова<sup>1</sup>, Е. Гюрова<sup>2</sup>, Г. Крумова-Вълчева<sup>2</sup>, М. Миланов<sup>2</sup>, Г. Матева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София

<sup>2</sup>Национален център по безопасност на храните (НЦБХ), Национален диагностичен научно-изследователски ветеринарномедицински институт (НДНИВМИ), София

**ЦЕЛ:** Анализ на заболяемостта от инфекции с хранителен и воден произход в България за 2021 г.

**МАТЕРИАЛИ/МЕТОДИ:** Използвани са данните от годишния анализ на отдел "Епидемиология", данните на отделите "Микробиология", "Вирусология" и "Паразитология" на НЦЗПБ и данните на НЦБХ към НДНИВМИ. Анализът е по нозологични единици съгласно изискванията на Наредба № 21/18.07.2005 г. на МЗ.

**РЕЗУЛТАТИ:** През 2021 г. чревните инфекции заемат 32,68% от регистрираните случаи на остри заразни болести (без COVID-19) по хората в страната. Водеща остава групата на острите ентероколити и гастроентерити (75,6% от всички инфекциозни чревни заболявания). Регистрирани са 3 смъртни случая, 15,8% от всички починали от заразни болести (без COVID-19, грип и ОРЗ, туберкулоза, СПИН и полово предавани

инфекции). Общият леталитет за чревните инфекции е 0,1%. Заболяемостта е както следва: ботулизъм – няма регистрирани заболяели, гастроентерит/ентероколит – 42,69‰ (73,61‰ през 2020 г.), шигелоза – 0,43‰ (0,68‰ през 2020 г.), йерсиниоза – 0,07‰ (0,07‰ през 2020 г.), кампилобактериоза – 1,45‰ (1,83‰ през 2020 г.), колиентерити (ешерихиози) – 4,06‰ (4,29‰ през 2020 г.), салмонелоза – 3,47‰ (4,65‰ през 2020 г.). През 2021 г. отново няма регистрирани заболяели от инфекции, предизвикани от *E. Coli*, продуциращи *Shiga/Vero* токсини. Няма регистрирани и заболяели от коремен тиф. Заболяемостта от ротавирусна инфекция е с тенденция за намаление (4,31‰ в сравнение с 6,34‰ през 2020 г.). Заболяемостта от вирусен хепатит А също е с тенденция за намаление – 10,45 ‰ (18,70 ‰ през 2020 г.). Регистрирани са 46 случая на вирусен хепатит Е, заболяемост 0,67‰ (1,27 ‰ за 2020 г.). Екстензивността на гиардиозата е 0,22% (0,22% през 2020 г.) от общо 268373 изследвани лица. Обхванатите деца от организирани детски колективи и начална училищна възраст са общо 79178, от които 297 са диагностицирани с гиардиоза. През отчетната година са съобщени трима положителни за критоспоридиоза лица. В НЦБХ се отбелязва устойчиво нарастване на броя на пробите за изследване на някои от опасните хранителни патогени. Продължава тенденцията най-често в хранителните продукти да се изолира *S. Infantis*, следвана от *S. Derby* и *S. Typhimurium*. Значително се увеличава количеството на изследваните проби за наличие на веротоксигенни *E. coli* и стафилококов ентеротоксин. Засилва се и интересът от изследване на замразени плодове за откриване на норовируси и вируса на хепатит А в тях.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Анализът на данните показва, че през 2021 г. общият брой заболяели и заболяемостта от чревни инфекции намалява в сравнение с 2020 г. – съответно 3908 случая, заболяемост 56,50‰ през 2021 г. и 6358 случая и заболяемост 91,46‰ през 2020 г.

**Ключови думи:** инфекции предавани с храни и води, анализ, заболяемост.

#### NATIONAL REFERENCE CENTER FOR FOOD- AND WATERBORNE DISEASES (NRC FWD), MORBIDITY ANALYSIS, 2021

L. Nikolaeva-Glomb<sup>1</sup>, I. Rainova<sup>1</sup>, H. Daskalov<sup>2</sup>, G. Kamenov<sup>1</sup>, N. Tsvetkova<sup>1</sup>, M. Pavlova<sup>1</sup>, A. Stoianova<sup>1</sup>, I. Georgieva<sup>1</sup>, T. Tenev<sup>1</sup>, N. Vladimirova<sup>1</sup>, A. Minkova<sup>1</sup>, E. Taseva<sup>1</sup>, N. Brankova<sup>1</sup>, E. Gyurova<sup>2</sup>, G. Krumova-Valcheva<sup>2</sup>, M. Milanov<sup>2</sup>, G. Mateva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia

<sup>2</sup>National Centre for Food Safety (NCFS), National Diagnostic Research Veterinary Institute (NDRVI)

**OBJECTIVE.** To analyze the incidence rate of food- and waterborne infections in 2021.

**MATERIALS AND METHODS.** The annual report of the Epidemiology Department and the data obtained from the Microbiology, Virology and Parasitology Departments of NCIPD and from The National Center for Food Safety at the NDRVI were used to perform the analysis. The analysis includes the infections according to Ordinance № 21/18.07.2005 of the Ministry of Health.

**RESULTS.** In 2021, enteric infections comprised 32,68% of the totally registered acute infectious diseases among humans in Bulgaria. Acute enterocolitides and gastroenteritides remain the leading enteral infections (75.6%). In 2021, a total of 3 deaths were registered, the

same as 2019 (15.8% of all deaths of infectious diseases or 0.1% case fatality rate). Incidence rate of enteric infections is as follows: no botulism, gastroenteritis/enterocolitis 42.69‰ (73.61‰ in 2020), shigellosis 0.43‰ (0.68‰ in 2020), yersiniosis 0.07‰ (0.07‰ in 2020), campylobacteriosis 1.45‰ (1.83‰ in 2020), colienteritis (escherichiosis) 4.06‰ (4.29‰ in 2020), salmonellosis 3.47‰ (4.65‰ in 2020). Infections caused by Shiga/Vero toxin producing *E. coli* were not registered in 2021. One case of typhoid fever is registered in Varna in 2018. Incidence rate of rotaviral gastroenteritis shows a decreasing trend – 4.31‰ (6.34‰ in 2020). Incidence rate of hepatitis A also reveals a decreasing trend – 10,45 ‰ (18,70 ‰ in 2020). There were 46 HEV cases (1,27 ‰ in 2020 and 3,10 ‰ in 2019 г.). Extense invasion of giardiasis was 0.22% (0.22% in 2020) among all 268373 persons investigated for enteric parasites. The number of investigated children from kindergartens was 79178 and 297 among them were positive. Three cryptosporidiosis cases were registered. A stable increase in the number of samples sent to The NCFS is registered. *S. Infantis*, *S. Derby* and *S. Typhimurium* were the most often detected pathogens. The number of tested samples for the presence of verotoxigenic *E. coli* and staphylococcus enterotoxin significantly increased. There is also an interest in frozen soft fruit testing for norovirus and hepatitis A virus.

**CONCLUSION.** The incidence rate of enteral infections in 2021 decreases as compared to 2020 – 3908 cases and morbidity 56.50‰; and 6358 cases and morbidity 91.46‰, respectively.

**Keywords:** food- and waterborne diseases, analysis, incidence rate.

#### ДОКЛАД НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО МИКРОБНА ЛЕКАРСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И АНТИБИОТИЧНА КОНСУМАЦИЯ

И.Н. Иванов<sup>1</sup>, И. Стойков<sup>1,2</sup>, С. Лозенов<sup>1</sup>, С. Събчева<sup>2</sup>, Д. Дончев<sup>1</sup>, Н. Корсун<sup>1</sup>, И. Алексиев<sup>1</sup>, Е. Добрева<sup>1</sup>, Р. Христова<sup>1</sup>, К. Иванова<sup>1</sup>, И. Филипова<sup>1</sup>, С. Ангелова<sup>1</sup>, Т. Тенев<sup>1</sup>, Р. Харизанов<sup>1</sup>, И. Кафтанджиев<sup>1</sup>, Н. Владимирова<sup>1</sup>, Х. Даскалов<sup>3</sup>, Т. Кантарджиев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, гр. София

<sup>2</sup>Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология, гр. София

<sup>3</sup>Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт, гр. София

Националният референтен център по микробна лекарствена резистентност и антибиотична консумация интегрира задълбочени проучвания на специалисти в областта на лекарствената резистентност при бактериални, гъбични, вирусни и паразитни причинители на инфекции в обществото, болничните заведения и проблемни изолати в селското стопанство и храните. От националната система за надзор на етиологичната структура на инфекциите, бактериалната резистентност и антибиотичната консумация в България - BulSTAR ще се представят последните тенденции оформени след анализ на годишните отчети на над 150 микробиологични лаборатории в страната. Събраните данни засягат и въпроси свързани с наблюдаваните необичайни фенотипове при конкретни двойки микроорганизъм/антибиотик и правилното им интерпретиране. Анализират се възможностите за тяхното отстраняване в рутинната практика.

В тази връзка и с цел синхронизиране на работата на микробиологичните лаборатории с европейските изисквания, ще се отдели време да се разяснят повтарящите се грешки в интерпретацията (вкл. при вродена резистентност), както и неприложимостта на даден антибиотик за лечение на конкретен причинител. Ще се обсъдят повтарящите се и чести проблеми при електронното отчитане на контрола и докладването по BulSTAR. Ще се дискутират промените и новостите в европейския стандарт EUCAST.

Ще бъдат докладвани последните национални данни за нивата на антиретровирусна резистентност при HIV, резистентността към противогрипни, противохепатитни и антипаразитни и антимикотични препарати както и най-актуалните данни за консумацията на антимикробни препарати.

**Ключови думи:** BulSTAR, микробна резистентност, EUCAST

## **REPORT FROM THE NATIONAL REFERENCE CENTER FOR MICROBIAL DRUG RESISTANCE AND ANTIBIOTIC USE**

*I.N Ivanov<sup>1</sup>, I. Stoykov<sup>1,2</sup>, S. Lozenov<sup>1</sup>, S. Sabtcheva<sup>2</sup>, D. Donchev<sup>1</sup>, N. Korsun<sup>1</sup>, I. Alexiev<sup>1</sup>, E. Dobрева<sup>1</sup>, R. Hristova<sup>1</sup>, K.Ivanova<sup>1</sup>, I. Philipova<sup>1</sup>, S. Angelova<sup>1</sup>, T. Tenev<sup>1</sup>, R. Harizanov<sup>1</sup>, I. Kaftandjiev<sup>1</sup>, N. Vladimirova<sup>1</sup>, H. Daskalov<sup>3</sup>, T.Kantardjiev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia*

<sup>2</sup>*University Specialized Hospital for Active Treatment in Oncology, Sofia*

<sup>3</sup>*National Diagnostic and Research Veterinary Institute, Sofia*

The National Reference Center for Microbial Drug Resistance and Antibiotic Use integrates in-depth studies from specialists in the field of drug resistance related to bacterial, fungal, viral and parasitic infections in the community and hospitals as well as antimicrobial resistance in the agriculture and food industry. The latest trends of the etiological structure, bacterial resistance and antibiotic consumption in Bulgaria - BulSTAR will be presented after analysis of annual reports from more than 150 microbiology laboratories. Issues related to the unusual phenotypes registered in specific bug-drug combinations with respect to correct interpretation will be addressed. The means to avoid misinterpretation in routine practice will be discussed.

In this context and in order to synchronize the AMR testing in the microbiology laboratory network with European standards, the guidelines for the electronic reporting with respect External Quality Management System control will be discussed. We will elaborate on the repetitive misinterpretation of intrinsic resistance, inability of a given antibiotic to treat specific infections and what to report when there is insufficient data for a specific bug-drug combination in EUCAST. The frequent problems associated with the electronic reporting in BulSTAR will be presented and discussed. The major changes and novel categories in EUCAST will be presented and discussed.

The latest national data on the rates of antiretroviral resistance in HIV, anti-influenza and anti-hepatitis, antiparasitic and antifungal resistance will be reported as well as the most up-to-date data on antimicrobial use.

**Keywords:** BulSTAR, microbial resistance, EUCAST.

## **БАКТЕРИАЛНИ, ВИРУСНИ И ПАРАЗИТНИ ВЕКТОР-ПРЕНОСИМИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2021 Г.**

*И. Христова, Р. Харизанов, И. Трифонова, Г. Каменов, Е. Панайотова, Т. Гладнишка, П. Генова-Калу, О. Миков, В. Иванова, Е. Тасева, Н. Миткова, С. Буковска, И. Райнова*

*НЦЗПБ*

През 2021 г. бяха регистрирани 46 случая на Лаймска борелиоза (160 случая за 2020 г.) и 50 случая на Марсилска треска (83 за 2020 г.). Доказан беше 1 случай на кърлежов енцефалит (2 за 2020 г.). Нямаше доказан случай на Кримска-Конго хеморагична треска (1 случай за 2020 г.). Лабораторно са установени 68 случая на Ку-треска (107 случая за 2020 г.). При 66 пациента беше доказана остра форма на инфекция от Ку-треска, хоспитализирани в различни клиники на страната. Случаите са спорадични на територията на цялата страна. През 2021 г. в страната не са регистрирани епидемични взривове от Ку-треска. При 2 пациента (един от София и един от района на Габрово) беше доказана хронична форма на инфекцията с развитие на ендокардит. Въз основа на Споразумение между НЦЗПБ и Български Ветеринарен Съюз (БВС) в НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“ са постъпили за изследване кръвни проби на 238 ветеринарни лекари на свободна практика от 26 области, от които с остра форма на Ку-инфекция са диагностицирани 19 лица. През 2021 г. бяха регистрирани 9 случая на вносна малария - 8 с причинител *P. falciparum* и един с причинител *P. vivax*. Седем от болелите са български граждани, а двама (студент и служител на ООН) са респективно от Камерун и Русия. Два от случаите на тропическа малария са с летален изход. През годината е регистриран и един местен случай на висцерална лайшманиоза при мъж на 61 г. от село Ключ, община Петрич. Във всичките 28 области на страната беше проведен надзор за наличие на азиатския тигров комар *Aedes albopictus*. Установи се присъствието му в 25 области, 2 от които са новоинвазирани. Проведени бяха 31 лабораторни изпитвания върху инсектицидната и репелентна ефективност на биоциди с химични, микробни и етерични активни субстанции.

## **BACTERIAL, VIRAL AND PARASITIC VECTOR-BORNE INFECTIONS IN BULGARIA, 2021**

*I. Christova, R. Harizanov, I. Trifonova, G. Kamenov, E. Panayotova, T. Gladnishka, P. Genova-Kalou, O. Mikov, V. Ivanova, E. Taseva, N. Mitkova, S. Bukovska, I. Rainova*

*NCIPD*

A total of 46 cases of Lyme borreliosis (160 cases in 2020) and 50 cases of Mediterranean spotted fever (83 in 2020) were reported in 2021. A patient with tick-borne encephalitis was detected (2 cases in 2020). No cases of Crimean-Congo hemorrhagic fever were registered (1 in 2020). Q-fever was laboratory detected in 68 patients (107 cases in 2020). In 66 patients, hospitalized in different hospitals in the country, an acute form of Q fever infection was demonstrated. Cases are sporadic throughout the country. In 2021, no epidemic outbreaks of Q-fever were registered. In 2 patients (one from Sofia and one from Gabrovo region), chronic form of the infection with endocarditis was demonstrated. On the basis of an Agreement between NCIPD and Bulgarian Veterinary Association (BVA) in NRL "Cell cultures, rickettsiae and oncogenic viruses" blood samples of 238 freelance veterinarians from 26

regions were submitted for examination, of which 19 persons were diagnosed with an acute form of Q-fever. In 2021, 9 imported malaria cases were registered. Eight of them were caused by *P. falciparum* and one by *P. vivax*. Seven of the patients are Bulgarians, and two are foreigners (from Cameroon and Russia respectively). Two of the cases of tropical malaria were with fatal outcome. Indigenous visceral leishmaniasis was registered in one Bulgarian citizen, a 61-year old man from Petrich municipality. Surveillance on the presence of Asiatic tiger mosquito *Aedes albopictus* was conducted in all the 28 regions of the country. The species was found in 25 regions, with 2 of them being newly invaded. A total of 31 laboratory investigations on insecticidal and repellent efficacy of biocides with chemical, microbial and essential active compounds were conducted.

**Keywords:** vector-borne infections, Lyme borreliosis, CCHF, Mediterranean spotted fever, Q-fever, visceral leishmaniasis

### **НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ЗООАНТРОПОНОЗИ С ЕПИДЕМИЧЕН РИСК, НОВИ ИНФЕКЦИИ И УПРАВЛЕНИЕ НА БИОРИСКА -2021 (НРЦ ЗЕРНИ-УБ)**

*И. Томова, Р. Ненова, И. Райнова, И. Иванов, П. Генова, Е. Георгиева, Н. Корсун, В. Толчков, Е. Панайотова, Л. Горянова, И. Трифонова, И. Кафтанджиев, Е. Кънева, Н. Миткова, М. Николова, Т. Лазарова, В. Левтерова, И. Симеоновски, И. Христова*

*Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ)*

Зооантропонозите са голяма група инфекции, включително заболявания причиняващи епидемични взривове с последствия не само за общественото здравеопазване, но и в социално-икономически план. Актуален пример е пандемичната ситуация с COVID-19. Причинителите на някои зооантропонози са микроорганизми от Рискови Гупи 3 и 4, а част от тях биха могли да се използват като биотерористични агенти. Управлението на биориска, особено ако произтича от такива патогени е от критично значение. Процесите на глобализация от една страна, както и имиграционния натиск от друга изисква особено внимание към способността ни за диагностика и реакция на новооткрити, новопоявяващи се или внос на екзотични за България инфекции.

НРЦ ЗЕРНИ-УБ поддържа готовност за своевременна и компетентна реакция при необходимост от детекция на потенциални биотерористични агенти.

През 2021 няма потвърдени случаи на антракс, туларемия, бруцелоза и ККХТ. Доказани са 12 заболявания от ХТБС. Не са регистрирани взривове от Q-треска, но остра форма на заболяването е доказана чрез EIA при 68 пациента, а чрез PCR – при 94. През 2021 г. чрез Real Time RT-PCR са изследвани респираторни проби на 18470 пациента, от които 7833 (42.4%) са били положителни. За годината са доказани 25 случая на трихинелоза с три епидемични взрива. Диагностицирани са 89 болни с ехинококоза. Изготвен е анализ на зоонозните заболявания с епидемичен риск, регистрирани и съобщени през 2021 г.

Специалисти на НРЦ ЗЕРНИ-УБ са участвали активно в разработването на научни тематики, вкл. по проект BG05M20P001-1.002 „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“; актуализиране методични указания за мрежата, наредби на МЗ, експертни съвети. Активно е и сътрудничеството към съответните мрежи на ECDC и WHO. НРЦ в състава на НРЦ ЗЕРНИ-УБ, успешно участва в международни схеми за оценка

качеството на диагностика на зооантропонозни инфекции при хора. Във връзка с повишаване квалификацията на медицинските специалисти са проведени курсове по различни специалности в инфектологията. Разнообразната дейност на НРЦ ЗЕРНИ-УБ през изтеклата година бе популяризирана чрез редица публикации и участия в и конгреси.

**Ключови думи:** зооантропонози, новопоявяващи и отново появяващи се инфекции, управление на биориска

## **NATIONAL REFERENT CENTER OF ZOOZOSES WITH EPIDEMIC RISK, NEW INFECTIONS AND BIOHAZARD MANAGEMENT – 2021 (NRC ZERNI-BM)**

*I. Tomova, R. Nenova, I. Rainova, I. Ivanov, P. Genova, E. Georgieva, N. Korsun, V. Tolchkov, E. Panayotova, L. Goryanova, I. Trifonova, S. Angelova, I. Kaftandjiev, E. Kaneva, N. Mitkova, M. Nikolova, T. Lasarova, V. Levterova, I. Simeonovski, I. Christova*

*National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)*

Zoonoses are a large group of infections, including diseases that may cause outbreaks with severe public health and socio-economic consequences. Current example is the pandemic situation with COVID-19. The causative agents of some zoonoses are microorganisms from Risk Groups 3 and 4 and several of them could be used as bioterroristic agents. Biohazard management, especially if derived from such pathogens is crucial. The globalization and the recent immigration pressure towards our country, require special attention on the diagnostic and responding abilities of the Public Health System with focus on newly discovered, re-emerging or imported exotic infections.

In 2021, NRC ZERNI-BM maintained preparedness for timely and competent reaction for detection of potential bioterrorist agents. There were no confirmed cases of human anthrax, tularemia and CCHF. HFRS was diagnosed in 12 patients. There were no Q fever outbreaks but acute form of the disease was diagnosed in 68 patients with EIA, and in 94 – with PCR. Respiratory samples from 18470 patients with suspected SARS-CoV-2 infection, were tested with Real Time RT-PCR and 7833 (42.4%) were positive. For the year, 25 patients with trichinosis were diagnosed and 3 outbreaks were registered. There have been also 89 new cases of Echinococcosis. Analysis of zoonotic diseases with epidemic risk registered and reported in Bulgaria during 2021 was prepared.

NRC ZERNI-BM experts participated actively in the development of scientific projects, incl. project BG05M20P001-1.002 “Fundamental Translational and Clinical Investigations in Infections and Immunity”, update of guidelines for the country, Ministry of Health regulations, expert commissions, etc. They were also active collaborators to the respective networks within ECDC and WHO. NRLs from ZERNI-BM participated successfully in several international EQAs and conducted training courses for colleagues from the country. The results from various NRC ZERNI-BM activities during 2021 were presented in a number of articles and congresses.

**Keywords:** zoonoses, emerging and reemerging infections, biohazard management

**НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР „СЕКСУАЛНО-ПРЕДАВАНИ ИНФЕКЦИИ (СПИ) И ВИРУСНИ ХЕПАТИТИ”**

*И. Филипова, Т. Тенев, М. Николова, Р. Емилова, З. Иванова, Л. Боянова, И. Иванов, П. Генова-Калу, В. Левтерова, И. Симеоновски, Е. Голкочева-Маркова, И. Райнова, Н. Цветкова, А. Иванова, И. Алексиев, А. Минкова, А. Курчатова, Н. Владимирова*

Националният референтен център (НРЦ) по СПИ и вирусни хепатити е създаден през 2013 г. и функционално обединява експерти от Националната референтна лаборатория по Микози и СПИ, Националната референтна лаборатория Молекулярна микробиология, Националната референтна лаборатория по Имунология, Националната референтна лаборатория Диагностика на паразитозите, Секция епидемиология и надзор на заразните болести, Националната референтна лаборатория Хепатитни вируси, Националната референтна лаборатория Херпесни и Онкогенни вируси, Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV.

Основна цел на НРЦ по СПИ и вирусни хепатити е осигуряване на интегриран мултидисциплинарен подход (микробиолози, имунолози, вирусолози, паразитолози, епидемиолози) при контрола, диагностиката, превенцията, профилактиката и етиотропното лечение на СПИ и вирусните хепатити, както и осъществяване на ефективно взаимодействие с Министерство на Здравеопазването (МЗ), Регионалните здравни инспекции (РЗИ), Европейския Център за Контрол и Профилактика на заболяванията (ECDC) и Световната Здравна Организация (СЗО).

В тази връзка ще бъдат обобщени и анализирани резултатите от диагностичната дейност, имунологичният мониторинг и епидемиологичния надзор на най-често срещаните сексуално предавани бактериални и вирусни инфекции и паразитози през 2021, както и ще бъдат обсъдени някои от съвременните тенденции при СПИ в Европа и у нас.

#### **NATIONAL REFERENCE CENTER "SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS (STIS) AND VIRUS HEPATITIS"**

*I. Philipova, T. Tenev, M. Nikolova, R. Emilova, Z. Ivanova, I. Ivanov, E. Shikova, V. Levterova, I. Simeonovski, E. Golkolcheva-Markova, I. Rajnova, N. Tzvetkova, I. Aleksiev, A. Minkova, A. Kurchatova, N. Vladimirova*

The National Reference Center for STIs and Viral Hepatitis was established in 2013 and functionally brings together experts from the National Reference Laboratory for Mycology and STIs, the National Reference Laboratory for Molecular Microbiology, the National Reference Laboratory for Immunology, National Reference Laboratory for Diagnosis of parasitoses, Epidemiology and surveillance of infectious diseases unit, National Reference Laboratory for Hepatitis Viruses, National Reference Laboratory for Herpes and Oncogenic Viruses, National Reference confirmatory laboratory for HIV.

The main objective of the Reference Center for Sexually Transmitted Infections and Viral Hepatitis is to provide an integrated multidisciplinary approach (microbiologists, immunologists, virologists, parasitologists, epidemiologists) in the control, diagnosis, prevention, prevention and etiotropic treatment of STIs and viral hepatitis, as well as to implement effective interaction with the Ministry of Health, Regional Health Inspections (RHI), European Center for Disease Control and Prevention (ECDC) and World Health Organization (WHO).

In this regard, the results of the diagnostic activity, immunological monitoring and epidemiological surveillance of the most common sexually transmitted bacterial and viral



infections and parasitoses in 2021 will be summarized and analyzed as well as some of the current trends in STIs in Europe and in Bulgaria.

## **ДЕЙНОСТИ НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, СВЪРЗАНИ С МЕДИЦИНСКО ОБСЛУЖВАНЕ (НРЦ-ИСМО) ПРЕЗ 2021Г.**

Е. Добрева, Н. Владимирова, И. Иванов, И. Томова, М. Николова, С. Йорданова, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова, С. Крумова, Л. Николаева-Гломб, А. Дечева, Р. Христова

Национален Център по Заразни и Паразитни болести (НЦЗПБ), гр. София

Дейностите на НРЦ-ИСМО за 2021г. са организирани в ключови направления, свързани с ежегодния надзор и анализ на ИСМО; молекулярно-генетични изследвания на бактериални и вирусни причинители с рисков потенциал за здравето на пациенти и медицински персонал; проследяване на вирусно носителство сред медицински лица; провеждане на проучвания, относно процесите на стерилизация и дезинфекция в болнична среда.

През 2021г. са изследвани общо 127 пациента, чрез генетични анализи за *Clostridioides difficile*, като сред амбулаторните пациенти положителен резултат се доказва при 31.3% (15/48), а сред хоспитализираните при 55.7% (44/79).

В НРЛ-КМАР от различни болници на страната са изпратени 163 щам, с рисков потенциал за здравето на пациенти и медицински персонал, с цел идентификация и определяне на антибиотична чувствителност, като 83.2% (139/163) от изследваните са *Klebsiella pneumoniae*. При *K. pneumoniae* чрез молекулярно-генетични анализи се доказват карбапенем хидролизиращи ензими от клас В (NDM) при 26.6% (37/139); клас А (KPC) при 16.5% (23/139); клас D (OXA-48) при 7.9% (11/139), а при 2.9% (4/139) от изследваните комбинация от KPC и NDM-ензими.

През 2021г. е проследено носителството на HBsAg и anti HCV на медицински специалисти от различни здравни и лечебни заведения, и са проведени проучвания на имунитета срещу хепатит В вирусна инфекция при 31 души медицински персонал.

В изпълнението на Националната програма за контрол и лечение на ротавирусните гастроентерити през 2021г. са изследвани 70 материала, като се установява циркулация на различни генотипове, с доминиращ G9P[8]. В повече от половината от пробите се доказва смесена инфекция с повече от един генотип.

През миналата година беше проведено Национално сероепидемично проучване за наличие на колективен имунитет срещу морбили и рубеола при 4531 пациенти от всички възрастови групи от 27 области на страната. Наличие на протективен имунитет срещу морбили беше доказан при 86% (3904/4531), а срещу рубеола при 91% (4131/4531) от изследваните лица. Най-висок брой серонегативни, 14% за морбили и 14.7% за рубеола, бяха отчетени сред деца от 1 до 4 год. Беше определен имунния статус срещу морбили и рубеола на медицински персонал от инфекциозни отделения в МБАЛ. Наличие на оптимален защитен IgG титър срещу рубеола беше доказан при 90% от изследваните, а респективно срещу морбили при 95%.

През 2021г. в лаб. „Дезинфекция и стерилизация“ са извършени общо 73 изпитвания за оценяване ефективността на дезинфектанти, предназначени за хигиена на ръце и повърхности, както и апаратура, предназначена за дезинфекция на въздух и/или повърхности.

**Ключови думи:** Инфекции, свързани с медицинското обслужване (ИСМО)

## ACTIVITIES OF THE NATIONAL REFERENCE CENTER OF HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS (NRC-HAI) IN 2021

*E. Dobрева, N. Vladimirova, I. Ivanov, I. Tomova, M. Nikolova, S. Yordanova, T. Tenev, E. Golkocheva-Markova, S. Krumova, L. Nikolaeva-Glomb, A. Datcheva, R. Hristova*

*National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia*

The main activities of the NRC-HAI in 2021 are organized in key areas related to the annual surveillance and analysis of the healthcare-associated infections (HAIs); molecular-genetic approaches to bacterial and viral pathogens with potential risk for patients and medical staff; viral screening studies among healthcare specialties and performance of surveys on sterilization and disinfection in hospitals.

In 2021, 127 patients were investigated using genetic analyses for *Clostridioides difficile*, with a positive result of 31.3% (15/48) in ambulatory and 55.7% (44/79) in hospitalized patients.

In the NRL-CMAR, 163 strains with a potential risk for the patient and medical staff health from various hospitals across the country were sent for identification and determination of antibiotic resistance. The most surveyed, 83.2% (139/163) were *Klebsiella pneumoniae*, and carbapenem hydrolyzing enzymes of class B (NDM) was demonstrated by molecular analyses at 26.6 % (37/139); class A (KPC) at 16.5% (23/139); class D (OXA-48) at 7.9% (11/139) and in 2.9% (4/139) combination of KPC and NDM-enzymes.

The carriage of HBsAg and anti-HCV among medical staff and HBV immunity have been studied in 31 individuals from various healthcare facilities in the country.

In an implementation of the National Program for Control and Treatment of Rotavirus Gastroenteritis in 2021 were tested 70 materials. The circulation of various genotypes was established, but the dominant were G9P [8]. Most of 50% were detected as a mixed infection with more than one genotype.

Last year a National seroprevalence study for the presence of collective immunity against measles and rubella in the country was performed. The study included 4531 patients from all age groups collected from 27 country districts. The presence of protective immunity against measles was demonstrated in 86% (3904/4531) and against rubella in 91% (4131/4531). Among the studied age groups, the highest number of seronegative was reported among children aged 1 to 4 years, respectively 14% for measles and 14.7% for rubella. The immune status against measles and rubella on medical staff from infectious units in the Multi-profile hospitals for active treatment was determined, and the presence of optimal protective IgG titer was proven in 90% and respectively 95% of the tested.

In 2021 in a Lab. "Disinfection and sterilization" 73 tests were carried out to evaluate the effectiveness of products intended for surface disinfection and hand hygiene, as well as devices for air and surface disinfection.

**Keywords:** Healthcare-associated infections (HAI)

**НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМИ ИНФЕКЦИИ: ГОДИШЕН ДОКЛАД ЗА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2021 Г.**

*Н. Владимирова<sup>1</sup>, С. Крумова<sup>2</sup>, Л. Николаева-Гломб<sup>2</sup>, Т.Тенев<sup>2</sup>, В. Левтерова<sup>3</sup>, Н. Бранкова<sup>3</sup>, Г.Каменов<sup>1</sup>, А.Дечева<sup>3</sup>*

*НЦЗПБ, Национален референтен център по ваксинапредотвратими инфекции,*

*<sup>1</sup>Отдел Епидемиология*

*<sup>2</sup>Отдел Вирусология*

*<sup>3</sup>Отдел Микробиология*

**Цел** на годишният доклад е да представи обобщение на работата на Националния референтен център по ваксинапредотвратими инфекции (НРЦ-ВПИ) по епидемиологичния и лабораторния надзор, както и по профилактиката на ВПИ.

**Материали и методи:** обобщена е информацията относно изпълнението на противоепидемичната, научната, учебната и организационно-методичната дейност предвидени в годишните планове на НРЦ- ВПИ за 2021 г.

Резултатите са:

1. Анализи на ваксинапредотвратимите болести в България ( за 2020 г.);
2. Анализи на имунизациите и имунизационния обхват с профилактични ваксини в България (за 2020 г.) ;
3. Извършване на референтна лабораторна диагностика за доказване причинители на ВПИ, подлежащи на лабораторен надзор;
4. Подготвени и разпространени информационни материали за Европейската имунизационна седмица в България (2021 г.);
5. Подготвяне на периодична информация от надзора на ВПИ в страната и изпращане към Министерство на здравеопазването;
6. Изработване на научен проект за сероепидемиологично проучване на морбили/рубеола/ВРС според работния план на националната програма за елиминация на морбили и рубеола (2019-2022);
7. Извършване на анализ на актуалното състояние по елиминацията на морбили и рубеола за 2020 г. и предоставяне на НВК към МЗ и на ЕРБ на СЗО;
8. Работа с регионалния офис на СЗО за оценка на елиминацията на двете инфекции в България;
9. Интензивна дейност с ECDC – участие в уебинари по тема ваксини и ваксинации срещу COVID 19; докладване в TESSy по протокол на случаи на ВПИ;
10. Представяне на резултатите от научната работа по ВПИ в научни форуми;
11. Преподавателска работа на експертите от НРЦ-ВПИ в следдипломното обучение по Програмата за СДО на НЦЗПБ;
12. Предоставяне на информация за разпространението на конкретни ВПИ и за начините за предпазване от тях.
13. Организиране на ваксинации срещу хепатит Б и срещу COVID 19 на служители на НЦЗПБ.

**Заключение:** Работата на НРЦ-ВПИ е в подкрепа на здравните власти в превенцията и управлението на ВПИ.

**Ключови думи:** ваксинапредотвратими болести, надзор, имунизации

**Адрес за кореспонденция:**

д-р Надежда Владимирова  
отдел Епидемиология

Национален център по заразни и паразитни болести, гр. София  
Ел. поща: [nvladimirova@ncipd.org](mailto:nvladimirova@ncipd.org)

## **NATIONAL REFERENCE CENTER “VACCINE PREVENTABLE INFECTIONS”: ANNUAL REPORT FOR 2021**

*N. Vladimirova<sup>1</sup>, S. Krumova<sup>2</sup>, L. Nikolaeva-Glomb<sup>2</sup>, T. Tenev<sup>2</sup>, V. Levterova<sup>3</sup>, N. Brankova<sup>3</sup>,  
G. Kamenov<sup>1</sup>, A. Decheva<sup>3</sup>*

*NCIPD, National Reference Center for Vaccine Preventable Diseases,*

*<sup>1</sup>Department of Epidemiology*

*<sup>2</sup>Department of Virology*

*<sup>3</sup>Department of Microbiology*

**Aim** of this Annual Report is to present a summary of the work activities of the National Reference Center on Vaccine Preventable Infections (NRC –VPI) in the area of epidemiological and laboratory surveillance and VPI prevention.

**Materials and methods:** Information on the realization of the NRC- VPI annual plan for 2021 is summarized.

### **Results:**

1. Epidemiological analysis of all reported vaccine preventable diseases in Bulgaria (for 2020) is elaborated and published;
2. Epidemiological analysis of immunizations and immunization coverage in Bulgaria (for 2020) is elaborated and published;
3. Performance of lab diagnostics of VPI etiological agents, subject of reference lab surveillance is reported;
4. Information materials for European Immunization Week (EIW) (2021) was elaborated and distributed;
5. Preparing periodic epidemiological information coming from the VPI surveillance and sending it to the Ministry of health;
6. Elaborating of a project for seroepidemiological study of measles/rubella/CRS in accordance to the working plan of the national programme for measles and rubella elimination(2019-2022);
7. Annual measles and rubella elimination status update(2020) was performed and provided to NVC in MoH and ERB of WHO;
8. Collaboration with the regional office of WHO for assessment of measles and rubella elimination in Bulgaria is realized;
9. Collaboration with ECDC – active participation in webinars related to the vaccines, vaccinations and surveillance of COVID 19; VPI cases reported to TESSy according to the protocol;
10. Scientific work on VPI is presented at different fora;
11. Teaching activities of NRC-VPD experts in the annual NCIPD Continuous Professional Development education programme;
12. Updated information regarding VPD morbidity, prevention and control measures, was disseminated to the community;
13. Vaccinations against hepatitis B and against COVID 19 were organized for the NCIPD staff.

**Conclusions:** The NRC-VPI does support Bulgarian health authorities in their work on management and prevention of VPIs.

**Keywords:** vaccine preventable infections, surveillance, immunizations

**Corresponding author:**

Dr Nadezhda Vladimirova, M.D.

Dept. Epidemiology

National Centre of Infectious and Parasitic Diseases

e-mail: [nvladimirova@ncipd.org](mailto:nvladimirova@ncipd.org)

## СЕСИЯ II: МИКРОБНА ЛЕКАРСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ

### КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА ХЕМАТОГЕНЕН ОСТЕОМИЕЛИТ ПРИЧИНЕН ОТ *SALMONELLA* ГРУПА ОВ

Ц. Чалашканов<sup>1</sup>, М. Лесева<sup>1</sup>, Н. Цуцумански<sup>2</sup>, Е. Петкова<sup>2</sup>, М. Малчева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория по микробиология, УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, София

<sup>2</sup>Клиника по Детска ортопедия и травматология, УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, София

Тема 3: Микробна лекарствена резистентност.

#### Резюме

Представяме клиничен случай на хематогенен остеомиелит при дете на 1г. лекувано в Клиника по Детска Ортопедия и Травматология на УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“. Детето постъпва за първи път в клиниката с фебрилитет до 38.6<sup>0</sup>С, болка, оток, зачервяване и Functio laesa в областта на дясното рамо. Поставената е диагноза хематогенен остеомиелит. Изпратеният ставен пунктат взет при хирургичната интервенция беше изследван чрез мултиплекс PCR BioFire-FilmArray, изследването установява наличие на *Salmonella* група ОВ. Резултатът беше потвърден и чрез културелно изследване и посредством полуавтоматичната система Vitek2 Compact. Емпиричната терапия включваше: Ampicillin/sulbactam, Amikacin, Vancomycin, Cefepim и Cefeperezon/sulbactam без клиничен успех. Въз основа на точната микробиологична диагноза беше назначена адекватната антибиотична терапия, което в съчетание с хирургична интервенция доведе до успешното излекуване на пациента.

**Ключови думи:** хематогенен остеомиелит, *Salmonella*, BioFire-FilmArray

Адрес и телефон за кореспонденция: Лаборатория по микробиология, УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, София, тел. 029154458.

## CLINICAL CASE OF HEMATOGENIC OSTEOMYELITIS CAUSED BY SALMONELLA GROUP OB

Ts. Chalashkanov<sup>1</sup>, M. Leseva<sup>1</sup>, N. Tsutsumanski<sup>2</sup>, E. Petkova<sup>2</sup>, M. Malcheva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology, UMHATEM "N.I.Pirogov", Sofia

<sup>2</sup>Clinic of Pediatric Orthopedics and Traumatology UMHATEM "N.I.Pirogov", Sofia

### Abstract

We present a clinical case of hematogenous osteomyelitis in a 1-year-old child, treated at the Clinic of Pediatric Orthopedics and Traumatology of UMHATEM "N.I.Pirogov", Sofia. The child was admitted at the clinic for first time with a fever of up to 38.6<sup>0</sup>C, pain, swelling, redness and Functio laesa in the area of the right shoulder. Hematogenous osteomyelitis has been diagnosed. The synovial fluid taken during the surgery was examined by multiplex PCR BioFire-FilmArray. The examination revealed presence of *Salmonella* group OB. The result was confirmed both by culture and by the semi-automatic Vitek2 Compact system. Empirical therapy included: Ampicillin/sulbactam, Amikacin, Vancomycin, Cefepim and Cefeperezon/sulbactam without clinical success. Based on the accurate microbiological diagnosis, adequate antibiotic therapy was prescribed, which in combination with surgery led to the successful treatment and outcome for the patient.

**Keywords:** hematogenous osteomyelitis, *Salmonella*, BioFire-FilmArray

## ЕТИОЛОГИЧНА СТРУКТУРА И АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА ИЗОЛАТИ ОТ ПАЦИЕНТИ С ДОКАЗАНА COVID-19 ИНФЕКЦИЯ ОТ УМБАЛ "ПРОФ. Д-Р СТ. КИРКОВИЧ" АД ЗА ПЕРИОД ОТ 01.01.2021 ДО 01.06.2022 Г.

П. Георгиева<sup>1</sup>, С. Исенджик<sup>1</sup>, Х. Дженева<sup>2</sup>, Д. Руканова<sup>2</sup>, М. Тенева<sup>2</sup>, Г. Лазарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>УМБАЛ: "Проф. д-р Ст. Киркович" АД, Стара Загора

<sup>2</sup>МФ-ТУ, секция „Микробиология“, Стара Загора

### Резюме:

**Цел:** Да се проучи етиологичната структура и антимикробната резистентност на изолати от пациенти с потвърдена COVID-19 инфекция и разпространението на *C. difficile* токсин-медиирани колити за периода 01.01.2021 до 1.06.2022 г.

**Материали и методи:** Анализирани са данни от всеки първи изолат от различни материали: трахеобронхиални секрети, експекторати, гърлени секрети, урини, фецеси и др. Идентификацията на изолатите е извършена с конвенционални и полуавтоматизирани методи. Антибиотичната резистентност е определяна с фенотипни методи. Изследването за *C. difficile* токсин А/В-медиирани колити е извършено с имунохроматографски тестове.

**Резултати:** Изследвани са общо 554 материала от 462 пациенти. Анализирани са данните за идентификация и антимикробна резистентност на общо 193 изолатата. Етиологичната структура показва, че 39% са инфекции от МРБ (множествено резистентни бактериални изолати) и 61 % са причинени от *Candida spp.* Сред общо 75 бактериални изолатата преобладават Gram (-) бактерии – 88% (66/75), сред които най-често се изолира *A. baumannii* - 68% (45/66), *Enterobacterales* - 21% (14/66), *P.*

*aeruginosa* - 10% (7/66). От Грам (+) бактерии (12%), най- често се изолира *Enterococcus spp.* – 89% (8/9). Към *Candida spp* принадлежат 61 % от всички изолати, предимно *C. albicans* – 52% (62/118).

Резултатите от антибиотичната резистентност показват, че 85% от *A. baumannii* са МРБ, чувствителни на *Colistin*, а част са чувствителни на *Colistin* и *Tobramycin*.

Половината от *Enterobacterales* са продуценти на ESBLs. Не са установени *Carbapenemases* (+) *Enterobacterales*. От *Enterococcus spp.* изолатите, щамове с HLAR 38% (3/8). Няма VRE.

От 250 проби фекал изследвани за *C. difficile* A/B токсини 24% (59/250) са положителни.

**Заключение:** За посочения период преобладават микотичните инфекции – 61%. Бактериалните инфекции и усложнения са причинени от МРБ, предимно *GNNF* и *Enterobacterales*. При ¼ от пациентите с Covid-19 се установява *C. difficile* токсин-медиран колит.

**Ключови думи:** множествена резистентност, COVID-19 инфекция, *C. difficile* A/B токсин-КОЛИТ

## ETIOLOGICAL STRUCTURE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ISOLATES FROM PATIENTS WITH PROVEN COVID-19 INFECTION FROM THE UNIVERSITY HOSPITAL "PROF. DR. KIRKOVICH AD FOR THE PERIOD FROM 01.01.2021 TO 01.06.2022.

P. Georgieva <sup>1</sup>, S. Isendzhik <sup>1</sup>, H. Djeneva <sup>2</sup>, D. Rukanova <sup>2</sup>, M. Teneva <sup>2</sup>, G. Lazarova <sup>1</sup>

<sup>1</sup>University Hospital. Kirkovich" AD, Stara Zagora

<sup>2</sup>MF-TU, Microbiology Section, Stara Zagora

### Summary:

**Aim:** Investigation of the etiological structure and antimicrobial resistance of isolates from patients with proven COVID-19 infection and the spread of *C. difficile* toxin-mediated colitis for the period 01.01.2021 to 1.06.2022.

**Materials and Methods:** Data from each first isolate were analyzed from different materials: tracheobronchial swabs, expectorates, throat swabs, urine, feces, etc. The identification of the isolates was performed by conventional and semi-automated methods. Antibiotic resistance was determined by phenotypic methods. The study for *C. difficile* toxin A/B-mediated colitis was performed by immunochromatographic tests.

**Results:** Totally 554 materials were investigated from 462 patients. Identification and antimicrobial resistance data of 193 isolates were analyzed. The etiological pattern showed that 39% were infections caused by MRB (multidrug-resistant bacterial isolates) and 61% were caused by *Candida spp.* Among the total of 75 bacterial isolates, Gram (-) bacteria predominated 88% (66/75), among which *A. baumannii* - 68% (45/66), *Enterobacterales* - 21% (14/66), *P. aeruginosa* - 10% (7/66). From the Gram (+) bacteria (12%), *Enterococcus spp.* was most frequently isolated at 89% (8/9). *Candida spp* were 61% of all isolates, mainly *C. albicans* - 52% (62/118).

Antibiotic resistance results showed that 85% of *A. baumannii* were MRB susceptible to *Colistin* and some were susceptible to *Colistin* and *Tobramycin*.



Half of the Enterobacterales were producers of ESBLs. Carbapenemases (+) Enterobacterales were not detected. Of the Enterococcus spp. isolates, strains with HLAR were 38% (3/8). VRE were not identified.

From the 250 fecal samples tested for *C. difficile* A/B toxins, 24% (59/250) were positive.

**Conclusion:** Mycotic infections predominated - 61% of all infections for the mentioned period of time. Bacterial infections and complications were caused by MRD, mainly GNNF u Enterobacterales. . In ¼ from patients with COVID-19 infection *C. difficile* toxin-mediated colitis was proven.

**Keywords:** multidrug resistance, Covid-19 infection, *C. difficile* A/B toxin-associated colitis

## ОЦЕНКА НА COLISPOT ТЕСТА КАТО ЛЕСЕН ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ, РЕНТАБИЛЕН СКРИНИНГОВ ИНСТРУМЕНТ ЗА ОТКРИВАНЕ НА УСТОЙЧИВИ НА ПОЛИМИКСИНИ *ENTEROBACTEREALES* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

И. Стойков<sup>1,2</sup>, И. Иванов<sup>1</sup>, С. Лозенов<sup>1</sup>, Р. Христова<sup>1</sup>, Д. Дончев<sup>1</sup>, Е. Добрева<sup>1</sup>, С. Събчева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национален център по инфекциозни и паразитни болести, София, България,

<sup>2</sup>Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология (Национален онкологичен център), София, България

**Въведение :** В продължение на десетилетие колистинът се използва успешно за лечение на инфекции, причинени от множество резистентни бактерии, (MDR), но бързото разпространение на устойчиви клонове (CR) компрометира дори комбинаторните терапевтични алгоритми. Надеждното изпитване на чувствителност към полимиксини все още остава предизвикателство за много лаборатории, тъй като търговските AST системи често предоставят незадоволителни резултати. Тук съобщаваме за нашия опит с наскоро докладван скринингов тест за ефективно откриване на полимиксинова резистентност, който може успешно да се комбинира с рутинните антибиограми.

**Материали/методи:** Набор от 109 не-дублиращи се клинични изолати от колекцията на Националната лаборатория за контрол и мониторинг на антимикробна резистентност, включвайки *Klebsiella spp.* (n = 102), *E. coli* (n = 4) и *P. aeruginosa* (n = 3), предварително установени като устойчиви на колистин (CR), съгласно критериите на EUCAST, както и 106 колистин-чувствителни (CS) изолати (отрицателни контроли) бяха включени в проучването. С изключение на референтния щам *mcr*-позитивен *E.coli* NCTC 13846, останалите изолати бяха PCR отрицателни за *mcr*-медийрана CR. Colispot тестът бе извършен и интерпретиран по Conceição-Neto et al. 2020 г. с някои модификации. Всички изпитвания бяха извършени със съответните повторения и статистическите точност и прецизност бяха изчислени съгласно стандартните методи.

**Резултати и дискусия:** Тестът Colispot показва отлична чувствителност, коректно детектирайки 97% от CR *Klebsiella spp.* (99/102) и 100% от *E.coli* и *P.aeruginosa* изолатите. Специфичността на теста възлизаше на 96%, поради това, че седем изолата с гранични стойности на МПК бяха класифицирани в грешни категории. Изчислената стойност за категорийно съответствие между Colispot теста и референтния метод с микро-разреждания в бульон бе 96,7%.

**Изводи:** Употребата на колистин нарасна петкратно, след регистрацията му в България през 2014 г. което доведе до бързо разпространение на устойчиви клонове сред нашите

болници. Надеждното откриване на устойчивост към колистин е предпоставка освен за успешна терапия така и за ограничаване на по-нататъшното разпространение на CR. Оценката на Colispot теста показва, че той представлява надежден, рентабилен скринингов инструмент за откриване на резистентност към полимиксини и може лесно да бъде въведен във всяка лаборатория.

**Финансиране:** Проучването беше подкрепено от Фонд Научни Изследвания по проект КП-06-Н 23/5 и частично от оперативната програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014–2020, проект BG05M2OP001–1.002–0001-C04 „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология”

## EVALUATION OF THE COLISPOT TEST AS AN EASY, COST-EFFECTIVE SCREENING TOOL FOR DETECTION OF POLYMXIN RESISTANT ENTEROBACTERIALES AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA

I. Stoykov<sup>1,2</sup>, I. Ivanov<sup>1</sup>, S. Lozenov<sup>1</sup>, R. Hristova<sup>1</sup>, D. Donchev<sup>1</sup>, E. Dobрева<sup>1</sup>, S. Sabtcheva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria,

<sup>2</sup>National Oncology Center - USHATO, Sofia,

**Background:** For over a decade colistin has been used successfully for the treatment of infections caused by multi-drug resistant (MDR) bacteria, but the rapid spread of colistin resistant (CR) resistant clones have compromised even the combinatorial therapeutic algorithms. Reliable colistin susceptibility testing still remains a challenge many laboratories as the commercial AST systems often perform poorly. Herein we report our experience with a recently reported screening test for effective detection of polymyxin resistance that can be combined with the routine disk diffusion antibiograms.

**Materials/methods:** A set of 109 non-duplicate clinical isolates from the collection of the National Laboratory for Control and Monitoring of Antimicrobial Resistance including *Klebsiella spp.* (n=102), *E. coli* (n=4) and *P. aeruginosa* (n=3) previously established as colistin-resistant (CR) according to EUCAST criteria as well as 106 colistin susceptible (CS) isolates (negative controls) were selected for the study. With the exception of the referent *mcr*-positive *E.coli* NCTC 13846, the rest of the isolates were PCR negative for *mcr*-mediated CR. The Colispot test was performed and interpreted as described by Conceição-Neto et al. 2020 with slight modifications. All tests were performed in duplicates and statistical accuracy and precision were calculated according to standard methods.

**Results and Discussion:** The Colispot test has shown excellent sensitivity correctly detecting 97% of the CR *Klebsiella spp.* (99/102) and 100% of *E.coli* and *P.aeruginosa* isolates. Overall specificity reached 96% as seven isolates with borderline MIC values were classified into wrong categories. The calculated category agreement between the Colispot test and the reference broth microdilution method was 96.7%.

**Conclusions:** Colistin was registered in Bulgaria in 2014 and since its use has increased fivefold resulting in rapid spread of resistant clones among our hospitals. In addition to the outcome and therapy, the accurate detection of colistin resistance is a prerequisite for limiting further dissemination of CR. The evaluation of the Colispot test shown that it could be a feasible and cost-effective screening tool for colistin resistance adoptable by any laboratory

**Funding:** The study was supported by the Bulgarian National Science Fund under Grant KP-06-H 23/5 and partially from the Operational Programme “Science and Education for Smart

Growth” 2014–2020, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 “Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity”

**МОЛЕКУЛЯРНА ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА КАРБАПЕНЕМ-РЕЗИСТЕНТНИ ИЗОЛАТИ ОТ СЕМЕЙСТВО *ENTEROBACTERIACEAE*, ПОЛУЧЕНИ ОТ ПАЦИЕНТИ, ХОСПИТАЛИЗИРАНИ В COVID-19 КЛИНИКИ И ИНТЕНЗИВНИ КЛИНИКИ НА УМБАЛ“СВЕТА МАРИНА“, ВАРНА В ПЕРИОДА 2020 – 2021**

Д. Савова<sup>1, 2</sup>, Д. Ниязи<sup>1, 2</sup>, М. Божкова<sup>1, 2</sup>, В. Каменова<sup>2</sup>, С. Бижева<sup>2</sup>, Т. Стоева<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Катедра „Микробиология и вирусология“, Медицински университет – Варна

<sup>2</sup>Лаборатория по клинична микробиология, УМБАЛ „Света Марина“ - Варна

**Цел:** да се оцени епидемиологичната връзка между карбапенем-резистентни (CR) изолати от семейство *Enterobacteriaceae*, получени от пациенти, хоспитализирани в COVID-19 клиниките и интензивните клиники на УМБАЛ“Света Марина“, Варна в периода 2020 – 2021г. и да се проучат основните ензимни механизми на карбапенемна резистентност в тези изолати. **Материали и методи:** в настоящото проучване са включени общо 45 изолата: *K. pneumoniae* (n=37), *K. oxytoca* (n=2), *E. cloacae* complex (n= 4) и *E. coli* (n=2). За детекцията на гени, кодиращи карбапенемази от различни класове (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>) беше приложен Multiplex PCR. За целите на епидемиологично типизиране и анализ бе използван ERIC PCR, както и клинични изолати *E. cloacae* от предходно проучване, доказани като представители на 2 основни циркулиращи болнични клона в периода 2014-2017г. **Резултати:** В групата на изолатите *K. pneumoniae* бяха доказани *bla*<sub>KPC-like</sub> (n=27), *bla*<sub>NDM-like</sub> (n=13) и *bla*<sub>VIM-like</sub> (n=14) гени, като при 9 изолата беше установено наличието едновременно на *bla*<sub>KPC-like</sub> и *bla*<sub>VIM-like</sub>. Карбапенемната резистентност сред *K. oxytoca* се асоциира с наличието на *bla*<sub>KPC-like</sub>, при *E. cloacae* complex - с *bla*<sub>VIM-like</sub>, а в *E. coli* – едновременно с *bla*<sub>KPC-like</sub> и *bla*<sub>OXA-48-like</sub> гените. Епидемиологичното типизиране установи 18 ERIC профила сред *K. pneumoniae*, някои представени като клъстери от идентични и/или близкородствени изолати, от които един доминиращ. Сред изолатите *E. cloacae* complex се доказаха четири, а при *K. oxytoca* и *E. coli* по един ERIC тип. Два от изолатите *E. cloacae* complex се идентифицираха като представители на два различни клона *E. cloacae* complex с доказано широко вътреболнично разпространение в периода 2014-2017г. **Заключение:** карбапенемната резистентност сред проучваната колекция изолати се медира основно от *bla*<sub>KPC-like</sub> гена, както и от *bla*<sub>VIM-like</sub> и *bla*<sub>NDM-like</sub>. Доказва се вътреболнична дисеминация на CR *K. pneumoniae*, продуциращи карбапенемази от различни молекулярни класове, както и продължаваща циркулация на доминиращите болнични клонове MDR *E. cloacae* complex от периода 2014-2017г., но вече придобили гени за резистентност към карбапенеми.

**Ключови думи:** COVID-19 клиники, карбапенем-резистентни *Enterobacteriaceae*, вътреболнично разпространение.

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF CARBAPENEM-RESISTANT *ENTEROBACTERIACEAE* ISOLATES, OBTAINED FROM PATIENTS, HOSPITALIZED**

## IN COVID-19 WARDS AND ICUS OF UNIVERSITY HOSPITAL “SAINT MARINA”, VARNА DURING THE PERIOD 2020 – 2021

*D. Savova*<sup>1, 2</sup>, *D. Niyazi*<sup>1, 2</sup>, *M. Bozhkova*<sup>1, 2</sup>, *V. Kamenova*<sup>2</sup>, *C. Bizheva*<sup>2</sup>, *T. Stoeva*<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Virology, Medical University, Varna, Bulgaria

<sup>2</sup>Laboratory of Clinical Microbiology, University Hospital “St. Marina”, Varna, Bulgaria

**Aim:** to evaluate the epidemiological relationship between carbapenem-resistant (CR) *Enterobacteriaceae* isolates, obtained from patients hospitalized in COVID-19 wards and ICUs in Saint Marina University Hospital, Varna during the period 2020 – 2021 and to investigate the main enzyme mechanisms of carbapenem resistance in these isolates. **Material and methods:** a total of 45 isolates were studied: *K. pneumoniae* (n=37), *K. oxytoca* (n=2), *E. cloacae* complex (n= 4) and *E. coli* (n=2). For detection of genes encoding carbapenemases from different classes (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>) a multiplex PCR was used. For epidemiological typing and analysis, ERIC PCR was performed, as well as clinical *E. cloacae* isolates from a previous study, representatives of 2 main circulating hospital clones in the period 2014-2017, were used too. **Results:** three different *bla* genes were found in *K. pneumoniae* isolates: *bla*<sub>KPC-like</sub> (n=27), *bla*<sub>NDM-like</sub> (n=13), *bla*<sub>VIM-like</sub> (n=14). In 9 of these isolates the presence of both *bla*<sub>KPC-like</sub> and *bla*<sub>VIM-like</sub> was detected. Carbapenem resistance in *K. oxytoca* is associated with the presence of *bla*<sub>KPC-like</sub>, in *E. cloacae* complex - with *bla*<sub>VIM-like</sub> and in *E. coli* isolates - with both *bla*<sub>KPC-like</sub> and *bla*<sub>OXA-48-like</sub>. Epidemiological typing identified 18 ERIC profiles among *K. pneumoniae*, some presented as clusters of identical and/or closely related isolates, of which one dominant. Among the isolates of *E. cloacae* complex, *K. oxytoca* and *E. coli*, four and one ERIC types were observed respectively. Two of the *E. cloacae* complex isolates were identified as representatives of two different MDR *E. cloacae* complex clones with proven widespread intra-hospital dissemination in the period 2014-2017. **Conclusion:** carbapenem resistance in the studied collection of isolates is mediated mainly by *bla*<sub>KPC-like</sub>, as well as by *bla*<sub>VIM-like</sub> and *bla*<sub>NDM-like</sub> genes. Intra-hospital dissemination of CR *K. pneumoniae*, producing carbapenemases of different molecular classes, as well as continuing circulation of the dominant hospital clones of MDR *E. cloacae* complex, identified in the period 2014-2017, but already carrying carbapenemase genes, were found.

**Keywords:** COVID-19 wards, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, intra-hospital dissemination.

### Адрес за кореспонденция:

Гр. Варна

Ул. „Марин Дринов“ 15

Медицински Университет

Катедра Микробиология и Вирусология

Проф. д-р Теменуга Стоева, дм; Тел. 0887 614 008

[temenuga.stoeva@abv.bg](mailto:temenuga.stoeva@abv.bg)

## ЕДИН БАКТЕРИОЛОГИЧЕН ОТЧЕТ НА СБАЛ ПО ДЕТСКИ БОЛЕСТИ В УСЛОВИЯТА НА ВИРУСНА ПАНДЕМИЯ ОТ КОВИД-19

Проф. д-р Нася Хаджиева, дм<sup>1</sup>, Весела Генова, дб<sup>1</sup>, Доц. д-р Михаил М. Петров, дм, мзм<sup>2</sup>

<sup>1</sup>СБАЛ по детски болести „Проф. Иван Митев“, Гр. София

<sup>2</sup>Катедра по медицинска микробиология и имунология „Проф. д-р Елисей Янев“, Фармацевтичен факултет, Медицински Университет - Пловдив.

**ЦЕЛТА** на настоящата работа е да представи синтезиран отчет за работата на Микробиологичната лабораторията при СБАЛДБ през 2021 г. в условията на вирусната пандемия от COVID-19.

**МЕТОДИ:** Отделенията са оценявани според броя на проведените микробиологични изследвания и са класифицирани според бактериологичния индекс като интензивни или неинтензивни звена.

**РЕЗУЛТАТИ:** представените резултати се различават съществено от резултатите, получени в предишни години, поради различният контингент болни (много от тях с SARS-CoV-2 инфекция) и непрекъснатото реструктуриране на отделенията в болницата, в зависимост от епидемичната обстановка в страната през 2021 г.

Етиологичната структура на инфекциите не се различава съществено, а съотношението Грам-положителни/Грам-отрицателни микроорганизми е 55,3/44,7 %, което показва наистина добри нива на болнична хигиена в такава тежка епидемична обстановка. Единствената клинично значима разлика при микробните изолати е в големия брой изолирани патогенни гъбички, като увеличението е повече от два пъти, в сравнение с предишни години. Сред най-често изолираните микроорганизми в болницата са *S. aureus*, коагулаза-негативните стафилококи (с водещ изолат *S. epidermidis*), *Candida spp.*, *Klebsiella pneumoniae* и т.н. Забелязва се отчетливо намален брой на изолираните *S. pyogenes* и *S. pneumoniae*, вероятно поради наличието на строги противоепидемични мерки (носене на предпазни маски, спазване на дистанция и т.н.). Изолираните MRSA са 14,5%, MRSE са 83 %, 69% са резистентните на трето-генерационни цефалоспорици *Klebsiella spp.*, а карбапенем-резистентните *Pseudomonas spp.* са 52 % от всички изолати.

Според данни на болничната аптека най-често използваните антибиотици в болницата са цефтриаксон, меропенем, колистин и антимицитици. Тази изкривена картина, показва наличието на сериозни проблеми в болницата при употребата на антимицробни и противогъбични препарати, дължаща се много вероятно и на пандемията от КОВИД-19.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** анализът на данните налага няколко извода:

Интензивните клиници е необходимо да имат повече от три изследвани микробиологични материала на пациент, за да отговарят на стандарта за интензивни звена.

Необходимо е скрининг при приемането на деца до три-годишна възраст на фекална проба за цялата болница и увеличено скриниране на недоносените бебета в клиниката по Неонатология.

Прави силно впечатление чувствителното намаление броя на *S. pyogenes* и *S. pneumoniae*, което е пряк резултат от носенето на маски и спазването на дистанция, което трябва да се превърне в задължителна предпазвателна мярка, поради известните ни тежки усложнения след преболеждане от стрептококи от група-А при децата.

Изкривената картина на антибиотична консумация за 2021 година, която от целия ЕС е увеличена само в нашата страна, трябва да бъде отразена в нова антибиотична политика на болницата и в Националната стратегията на България.

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** КОВИД-19, педиатрия, антибиотична резистентност

## **A BACTERIOLOGICAL REPORT OF A SPECIALIZED PEDIATRIC HOSPITAL IN THE SETTINGS OF THE COVID-19 PANDEMIC**

*Prof. Nasya Hadjieva, MD, PhD<sup>1</sup>, I - Vesela Genova, DB.<sup>1</sup>, Assoc. Prof. Michael M. Petrov, MD, PhD, MHM.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Specialized Pediatric Hospital "Prof. Ivan Mitev", Sofia*

<sup>2</sup>*Department of Medical Microbiology & Immunology "Prof. Elissey Yanev, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv*

**THE AIM** of this study is to present a synthesized summary report of the Microbiology Laboratory at The Specialized Pediatric Hospital during the COVID-19 pandemic in 2021.

**METHODS:** Departments were evaluated according to the number of microbiological tests performed and classified according to the bacteriological index as intensive or non-intensive units.

**RESULTS:** These following results differ seriously from the results obtained in previous years due to the different contingent of patients (many of them with SARS-CoV-2 infection) and the continuous restructuring of the wards in the hospital, depending on the epidemic situation in the country in 2021.

The etiological structure of the infections did not differ significantly, and the ratio between Gram-positive and Gram-negative microorganisms was 55.33/44.67%, which shows really good hospital hygiene levels in such a severe epidemic situation.

The only clinically important difference among the number of microbial isolates was in the increased levels of isolation of pathogenic fungi, this increase being more than twofold, compared to previous years. Among the most common microbial isolates in the hospital are *S. aureus*, Coagulase-negative staphylococci (most common isolate is *S. epidermidis*), *Candida spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, etc. A clearly reduced number of isolated *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* is observed, probably due to the presence of anti-epidemic measures (masks, distance, etc.). Isolated MRSA were 14.5%, MRSE were 83%, 69% were resistant to third-generation cephalosporins *Klebsiella spp.*, and carbapenem-resistant *Pseudomonas spp.* were 52% of all isolates.

According to the data from the hospital pharmacy, the most commonly used antimicrobials in the hospital are ceftriaxone, meropenem, colistin and antifungals. This obviously distorted picture of antimicrobials and antifungals use shows the presence of serious problems in the hospital, most likely due to the COVID-19 pandemic.

**CONCLUSIONS:** The analysis of the data shows that:

All intensive units are required to have more than 3 materials per patient to meet the Intensive Care Unit standards.

There is a need for screening at the admission of children up to 3 years of age of a faecal sample for the whole hospital and increased screening of premature babies in the Neonatology department.

The significant reduction in the number of isolated *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* is very impressive, which is a direct result of wearing masks and keeping a distance, and this should become a mandatory precaution, due to our knowledge of severe complications after Group-A streptococcal infections in children.

The distorted picture of antibiotic consumption in 2021 (increased only in Bulgaria among all EU countries), should be reflected in a new antibiotic policy of the hospital and the National community strategy.

**KEYWORDS:** COVID-19, pediatrics, antimicrobial consumption and antimicrobial resistance

## СЕСИЯ III: COVID-19

### ВИРУСНА ЕТИОЛОГИЯ НА КО-ИНФЕКЦИИТЕ СЪС SARS-COV-2 И ДРУГИ РЕСПИРАТОРНИ ПАТОГЕНИ В БЪЛГАРИЯ.

И. Трифонова<sup>1</sup>, И. Маджарова<sup>1</sup>, В. Добринов<sup>1</sup>, Ч. Исмаилова<sup>1</sup>, Л. Григорова<sup>1</sup>, И. Алексиев<sup>1</sup>, С. Ангелова<sup>3</sup>, С. Волева<sup>2</sup>, Р. Йорданова<sup>2</sup>, Т. Червенякова<sup>2</sup>, Н. Корсун<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национална референтна лаборатория "Грип и ОРЗ", отдел Вирусология, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България

<sup>2</sup>СБАЛИПБ "Проф. Иван Киров" ЕАД, Медицински университет София, България

<sup>3</sup>УМБАЛ "Проф. д-р Стоян Кирович" АД, Стара Загора, България

**Въведение:** Това проучване има за цел да установи дела и вирусната етиология на ко-инфекциите на SARS-CoV-2 с други респираторни патогени в България

**Методи:** Бяха събрани назофарингеални проби от 1143 SARS-CoV-2 позитивни пациенти. Real-time PCR беше използван за доказване на SARS-CoV-2, грипен вирус А и В, респираторен синцитиален вирус (RSV), човешки метапневмовирус (HMPV), параинфлуенца вирус (PIV) 1,2,3, риновирус (RV), аденовирус (AdV), бокавируси (BoV) и 4 сезонни коронавируса: OC43, NL63, 229E и HKU-1.

**Резултати:** От октомври 2020 г. до края на май 2022 г. 1143 положителни клинични проби за SARS-CoV-2 бяха тествани за грипни и други 8 негрипни респираторни вируса и 77 (6,7%) са били ко-инфектирани с поне един от тези патогени. От тях 75 бяха инфектирани с два вируса, а двама с три вируса. Реда на доказване на ко-инфекциите беше: n= 15 (19,5%) SARS-CoV-2+RSV, n= 15 (19,5%) SARS-CoV-2+HMPV, n= 14 (18,2%) SARS-CoV-2+RV, n= 14 (18,2%) SARS-CoV-2+AdV, n=11 (14,2%) SARS-CoV-2+BoV, n=2 (2,6%) SARS-CoV-2+PIV2, n=2 (2,6%) SARS-CoV-2+PIV3, n=2 (2,6%) SARS-CoV-2+A(H3N2), n=1 (1,3%) SARS-CoV-2+RV+HMPV и n=1 (1,3%) SARS-CoV-2+RV+BoV. За доказване на смесени инфекции с 4-те сезонни коронавируса бяха изследвани 329 положителни проби за SARS-CoV-2. Доказаните комбинации бяха n=2 SARS-CoV-2+ OC43 и n=1 SARS-CoV-2+ NL63. При най-малките деца до 5 годишна възраст е установен широк етиологичен спектър на доказване на ко-инфекции, а реда на му беше съответно: n=9 SARS-CoV-2+BoV, n=5 SARS-CoV-2+RSV, n=4 SARS-CoV-2+RV, n=4 SARS-CoV-2+AdV, n=2 SARS-CoV-2+HMPV n=2 SARS-CoV-2+PIV3, n=1 SARS-CoV-2 +A(H3N2) и n=1 SARS-CoV-2+RV+BoV. В тази възрастова група процента на доказване на ко-инфекции бе най-голям 18,3% следван от групата на 6-16 годишните с 6,9% спрямо всички изследвани проби. При децата и юношите най-голям брой ко-инфекции бяха доказани в комбинацията n=7 SARS-CoV-2+RV, докато при възрастните над 65 години преобладаваха смесените инфекции на SARS-CoV-2+HMPV съответно при 9 пациенти и на SARS-CoV-2+RSV също при 9.

**Заключение:** Разпространението на ко-инфекциите на SARS-CoV-2 и други респираторни вируси по-време на COVID-19 пандемията в България беше сравнително слабо. Широк етиологичен спектър на доказване и най-голям дял на ко-инфекции включващи SARS-CoV-2 се наблюдаваше при деца ≤16 години.

**Ключови думи:** ко-инфекции, SARS-CoV-2, COVID-19.



## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е подкрепено с безвъзмездни средства от Министерството на образованието и науката, България: договори КП-06-Н43/5 /30.11.2020 г./” Молекулярно-генетични и клинични характеристики на човешкия коронавирус. Изследване на ролята на SARS-CoV-2 при коинфекции с други респираторни вируси”, и от Европейския фонд за регионално развитие чрез Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж 2014-2020, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## VIRAL AETIOLOGY OF CO-INFECTIONS WITH SARS-COV-2 AND OTHERS RESPIRATORY PATHOGENS IN BULGARIA

I. Trifonova<sup>1</sup>, I. Madzharova<sup>1</sup>, V. Dobrinov<sup>1</sup>, Ch. Ismailova<sup>1</sup>, L. Grigorova<sup>1</sup>, I. Alexiev<sup>1</sup>, S. Angelova<sup>3</sup>, S. Voleva<sup>2</sup>, R. Yordanova<sup>2</sup>, T. Tcherveniakova<sup>2</sup>, N. Korsun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Laboratory “Influenza and ARD”, Department of Virology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>Infectious Hospital “Prof. Ivan Kirov”, Medical University Sofia, Bulgaria

<sup>3</sup>University Hospital “Prof. Dr. Stoyan Kirkovich”, Stara Zagora, Bulgaria

**Introduction:** This study aims to establish the share and viral aetiology of coinfections of SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens in Bulgaria.

**Methods:** Nasopharyngeal samples of 1143 SARS-CoV-2 positive patients were collected. Real-time PCR was used to detect SARS-CoV-2, influenza virus, respiratory syncytial virus(RSV), human metapneumovirus (HMPV), parainfluenza virus (PIV)1,2,3, rhinovirus(RV), adenovirus (AdV), bocaviruses(BoV), and 4 seasonal coronaviruses: OC43, NL63, 229E and HKU-1.

**Results:** From October 2020 to May 2022, 1143 positive clinical samples for SARS-CoV-2 were tested for influenza. Another 8 non-influenza respiratory viruses and 77(6.7%) were co-infected with at least one of these pathogens. Of these, 75 were infected with two viruses and two with three viruses. The order of detection of co-infections was: n = 15 (19.5%) SARS-CoV-2+RSV, n = 15(19.5%) SARS-CoV-2 + HMPV, n=14(18.2 %) SARS-CoV-2+RV, n =14(18.2%) SARS-CoV-2+AdV, n = 11 (14.2%) SARS-CoV-2+BoV, n = 2 (2.6%) SARS-CoV-2 + PIV2, n = 2 (2.6%) SARS-CoV-2 + PIV3, n = 2(2.6%) SARS-CoV-2+A (H3N2), n = 1(1.3%) SARS-CoV-2+RV+HMPV and n = 1(1.3%) SARS-CoV-2+RV+BoV. To detect mixed infections with the 4 seasonal coronaviruses, 329 positive samples for SARS-CoV-2 were tested. The proven combinations were n =2 SARS-CoV-2+OC43, n =1SARS-CoV-2+NL63. A wide etiological spectrum of co-infections was found in the youngest children up to 5 years of age, and the order of their detection was respectively: n = 9 SARS-CoV-2+ BoV, n = 5 SARS-CoV-2+RSV, n = 4 SARS-CoV-2+RV, n = 4 SARS-CoV-2 + AdV, n =2 SARS-CoV-2+HMPV n =2 SARS-CoV-2 + PIV3, n =1 SARS -CoV-2 + A (H3N2) and n =1 SARS-CoV-2+RV+BoV. In this age group, the percentage of detection of co-infections was the highest 18.3% followed by the group of 6-16 year olds with 6.9% compared to all tested samples. In children and adolescents, the highest number of co-infections was detected in the combination n =7SARS-CoV-2+RV, while in adults over 65 years of age mixed infections of SARS-CoV-2+HMPV prevailed in 9 patients and SARS-CoV-2+RSV also at 9.

**Conclusion:** The prevalence of co-infections with SARS-CoV-2 and other respiratory viruses during the COVID-19 pandemic in Bulgaria was relatively low. A wide etiological spectrum

of evidence and the highest proportion of coinfections involving SARS-CoV-2 were observed in children  $\leq 16$  years.

**Keywords:** co-infections, SARS-CoV-2, COVID-19.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by grants from the Ministry of Education and Science, Bulgaria: contracts КП-06-H43/5 /30.11.2020/” Molecular-genetic and clinical characteristics of human coronavirus. Study of the role of SARS-CoV-2 in co-infections with other respiratory viruses”, № КП-06-DK1/7 /29.03.2021/ “Viral load, cytokines and serum antibody levels depending on the clinical severity of COVID-19 infection”, and by the European Regional Development Fund through Operational Program Science and Education for Smart Growth 2014-2020, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

### **ПЪРВИ СЛУЧАИ НА ПОСТВАКСИНАЛНА ИНФЕКЦИЯ СЪС SARS-COV-2 ALPHA (B.1.1.7) ВАРИАНТ СРЕД ЗДРАВНИ РАБОТНИЦИ В БЪЛГАРИЯ**

*Ренета Димитрова<sup>1</sup>, Ивайло Алексиев<sup>1</sup>, Иван Стойков<sup>1</sup>, Деян Дончев<sup>1</sup>, Ива Филипова<sup>1</sup>, Любомира Григорова<sup>1</sup>, Анна Ганчева<sup>1</sup>, Нели Корсун<sup>1</sup>, Ивелина Трифонова<sup>1</sup>, Веселин Добринов<sup>1</sup>, Илияна Григорова<sup>1</sup>, Тодор Кантарджиев<sup>1</sup>, Иван Иванов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Национален център по заразни и паразитни болести*

**Ключови думи:** SARS-CoV-2; поствакцинална инфекция; Алфа вариант (B.1.1.7)

#### **Цел**

В това проучване представяме комбинирани молекулярно-епидемиологични и клинични данни от март 2021 г. за двама здравни работници (ЗР), с поставени две дози от ваксината на Pfizer-BioNTech, работещи в различни болници в София, инфектирани със SARS-CoV-2 на фона на висок титър на IgG антитета.

#### **Материали и методи**

Епидемиологични и клинични данни са снети от Националната електронна система за COVID-19. Кръвни проби от здравните работници са тествани за анти-SARS-CoV-2 IgG антитета след ваксинацията (съответно на 70-ти и 23-ти ден) и преди заразяването им със SARS-CoV-2. Целогеномно секвениране е извършено чрез модифициран ARTIC v3 амплификационен метод. За определяне на принадлежност е използвана програмата Pangolin COVID-19, която извършва класификация по номенклатурата на Rambaut. Беше конструирано филогенетично дърво въз основа на секвенциите на S гените на двата генома, както и 112 други произволно избрани SARS-CoV-2 секвенции, изолирани в България и референтната секвенция от GISAID (EPI\_ISL\_402124).

#### **Резултати**

Бяха установени първите случаи на поствакцинални инфекции с вариант Алфа (B.1.1.7) в България. Анализът на секвенциите установи 7 нуклеотидни полиморфизма (SNPs), водещи до несинонимни мутации в S протеина, D614G и 6 замествания, насочващи към Алфа (B.1.1.7) варианта. В S гена бяха установени две уникални делеции за този вариант: H69\_V70del (ACATGT) и Y144del (TAT). В допълнение, в S протеина са

установени аминокиселинни замествания, докладвани и в други варианти, предизвикващи безпокойство (VOC) съгласно класификацията на СЗО, включително N501Y, който се среща в Бета и Гама линии, както и P681H в Делта.

### **Заклучение**

Появяващите се мутации могат да компрометират ваксините и да ускорят разпространението на инфекцията. Поради това е важно внимателно да се наблюдават и проучват случаите на поствакцинален COVID-19 и вирусните варианти, свързани с тях.

**Благодарности:** Проучването е финансирано по проект от Фонд научни изследвания към Министерството на образованието и науката (договор: КП-06-H43/1 27.11.2020).

### **FIRST CASES OF POSTVACCINATION INFECTION WITH SARS-COV-2 ALPHA (B.1.1.7) VARIANT AMONG HEALTHCARE WORKERS IN BULGARIA**

*Reneta Dimitrova<sup>1</sup>, Ivailo Alexiev<sup>1</sup>, Ivan Stoykov<sup>1</sup>, Deyan Donchev<sup>1</sup>, Ivva Philipova<sup>1</sup>, Lyubomira Grigorova<sup>1</sup>, Anna Gancheva<sup>1</sup>, Neli Korsun<sup>1</sup>, Ivelina Trifonova<sup>1</sup>, Veselin Dobrinov<sup>1</sup>, Iliana Grigorova<sup>1</sup>, Ivva Philipova<sup>1</sup>, Todor Kantardjiev<sup>1</sup>, Ivan Ivanov<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria*

**Keywords:** SARS-CoV-2; Postvaccination infection; Alpha (B.1.1.7)

### **Aim**

In this study we present combined molecular, epidemiological and clinical data from March 2021 on two healthcare workers (HCWs), vaccinated with two doses with Pfizer-BioNTech vaccine, from different hospitals in Sofia, who contracted SARS-CoV-2 on the background IgG antibodies.

### **Materials and methods**

Epidemiological and clinical data were obtained from the National electronic system for COVID-19. Blood samples of the two HCWs were tested for anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies 70- and 23-days post vaccination and prior to the onset of the infection. Whole genome sequencing was performed by using a modified ARTIC v3 tailed amplicon method on MiSeq platform. Pangolin COVID-19 Lineage Assigner Tool was used to determine the variant classification according to the Rambaut nomenclature. A phylogenetic tree was constructed based on the S gene sequences of both genomes, as well as 112 other randomly selected SARS-CoV-2 sequences isolated in Bulgaria and the reference sequence from GISAID (EPI\_ISL\_402124).

### **Results**

The first cases of postvaccination infections with Alpha (B.1.1.7) variant in Bulgaria have been identified. Sequence analysis indicated that the isolates exhibited single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that conferred 7 non-synonymous mutations within the spike protein: D614G and 6 other substitutions indicating of Alpha (B.1.1.7) lineage. Two deletions were found in the S gene: H69\_V70del (ACATGT) which have been reported to be associated with this variant and Y144del (TAT). In addition, amino acid substitutions were found in the spike

protein that have been reported in other variants of concern (according to the WHO), including N501Y which occurs in the Beta and Gamma lineages and also P681H in the Delta.

### Conclusion

Emerging mutations could compromise vaccines and accelerate the spread of the disease. This is why it is important to carefully monitor and investigate cases of postvaccination COVID-19 and viral variants associated with them.

**Acknowledgments:** The study was supported by the by a grant from the Ministry of Education and Science, Bulgaria (contract: КП-06-H43/1 27.11.2020).

### Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНИТЕТ СРЕЩУ SARS-COV-2: КАКВО НАУЧИХМЕ

*Мария Николова<sup>1</sup>, Милена Алексова<sup>1</sup>, Яна Тодорова<sup>1</sup>, Радослава Емилова<sup>1</sup>, Магдалена Баймакова<sup>2</sup>, Нина Янчева<sup>3</sup>, Георги Попов<sup>4</sup>, Христо Тасков<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>Отдел Имунология, Национален център по заразни и паразитни болести, София

<sup>2</sup>Клиника по Инфекциозни болести, Военномедицинска академия София

<sup>3</sup>ОПИН, СБАЛИПБ „проф. Иван Киров“, София

<sup>4</sup>УМБАЛ Софиямед, София

<sup>5</sup>Катедра Микробиология и имунология, МУ Пловдив

**Въведение:** Имунологичната памет, специфична за SARS-CoV-2, е основа за формиране на групов имунитет и ограничаване на пандемията. Открит е въпросът за продължителността и качествата на имунната защита, придобита след инфекция и/или имунизация, в условия на непрекъснато еволюиращ патоген.

**Цел:** Да се идентифицират подходящи методи и достъпни маркери за дългосрочна оценка на SARS-CoV-2-специфичния пост-експозиционен и пост-ваксинален Т-клетъчен имунитет в периферна кръв след прекарана инфекция и/или имунизация.

**Материал и методи:** Изследвани са проби от периферна кръв, 12 месеца след положителен PCR за SARS-CoV-2 (A, n=37) или след завършена имунизация с анти-SARS-CoV-2 векторна ваксина (B, n=36). За оценка на вирус-специфичните Т-клетки са използвани CD4- и CD8-специфични пептидни пулове от S1 и N антигените на SARS-CoV- и от SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2); IFN $\gamma$  ELISpot (T-Spot Covid, Oxford Immunotech) и 16-параметърна флуцитометрия (BD Aria, BD Biosciences).

**Резултати:** След стимулация с S1 и N пептиди, вирус-специфични IFN $\gamma$ +T установихме при 76 % от преболедувалите (средно, съответно, 36 и 31 спот-образуващи клетки (SFC)/ямка) и при 64% от всички имунизирани (средно, 14 и 4 SFC /ямка). Интензитетът на позитивните отговори и в двете групи беше значимо по-висок след хибридна антигенна експозиция, съответно: 48 с/у 16 и 19 с/у 9 SFC /ямка, (p<0.05 за двете сравнения). Активационно-индуцирани Т-клетъчни маркери (АИМ) след 16ч. стимулация с S1, N и SARS-CoV-2delta пептиди бяха установени при 100% от изследваните Т-spot негативни проби. Сред общите вирус-специфични Т клетки от преболедували преобладаваха delta- специфични CD4 Т, а в рамките на стволовата паметова субпопулация S1- специфични CD4 и CD8 Т в приблизително изравнено съотношение.

**Заклучение:** Т-клетъчният имуен отговор срещу SARS-CoV-2 е значително по-интензивен след хибридна експозиция. Детекцията на SARS-CoV-2 Tscm в

периферната кръв е подходящ метод за оценка на клетъчния имунен отговор повече от една година след ваксиниране/преболедуване. Антигенните специфичности и съотношението между CD4 и CD8 Т в SARS-CoV-2-специфичния пул отразяват динамиката на експозициите.

**Ключови думи:** SARS-CoV-2, Т-клетъчен имунитет, стволови паметови Т клетки

**Благодарности:** Това проучване е финансирано от ФНИ по проект КП-06-ДК1/9 от 29.03.2021, „Имунологична памет при SARS-CoV-2/COVID-19: механизми, продължителност и кръстосана реактивност”

## SARS-COV-2 SPECIFIC T-CELL IMMUNITY: THE LESSONS LEARNED

*Maria Nikolova<sup>1</sup>, Milena Aleksova<sup>1</sup>, Yana Todorova<sup>1</sup>, Radoslava Emilova<sup>1</sup>, Magdalena Baymakova<sup>2</sup>, Nina Yancheva<sup>3</sup>, Georgi Popov<sup>4</sup>, Hristo Taskov<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>*Immunology Department, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria*

<sup>2</sup>*Infectious Diseases Clinic, Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria*

<sup>3</sup>*University Hospital Sofamed, Sofia, Bulgaria*

<sup>4</sup>*Specialized Hospital for Active Treatment of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria*

<sup>5</sup>*Microbiology and Immunology Department, Medical University, Plovdiv*

**Introduction:** Immunological memory against SARS-CoV-2 is key to establishing herd immunity and limiting the pandemic. The duration and qualities of immune protection after natural exposure and/or immunization in the settings of constantly evolving pathogen remain an open question.

**Aim:** To identify suitable methods and biomarkers for long-term evaluation of post-exposure and post-vaccinal SARS-CoV-2-specific T cell immunity in peripheral blood.

**Materials and methods:** Peripheral blood samples, 12 months after a positive SARS-CoV-2 PCR test (A, n = 37) or completed immunization with a vector anti-SARS CoV-2 vaccine (n = 36) were examined. SARS-CoV-2 specific T-lymphocytes were evaluated after 16h stimulation with CD4- and CD8-specific peptide pools from SARS-CoV-2 S1 and N-antigens of SARS-CoV-2delta (B.1.617.2) variant, using IFN- $\gamma$  ELISpot (T-Spot Covid, Oxford Immunotech) and 16-parameter flow cytometry (BD Aria, BD Biosciences).

**Results:** IFN $\gamma$ +T cells specific to S1- and N-SARS-CoV-2 peptide pools were detected in 76 % from group A samples (mean 36 and 31 SFC /well respectively) and 64% from group B samples (mean 14 and 4 SFC/well). The intensity of positive reactions in both groups was significantly higher after hybrid exposure, as follows: 48 vs. 16, and 19 vs.9 SFC/well, (p<0.05 for both comparisons). Activation-induced T-cell markers (AIM) after 16h stimulation with S1, N, and SARS-CoV-2delta peptide pools were detected in 100% from the tested T-spot negative samples. Delta-specific CD4 T dominated in the general pool of virus-specific T cells from convalescent donors, while the stem cell memory T subset (Tscm) contained mostly S1-specific CD4 and CD8 T, in comparable shares.

**Conclusion:** Long-term T-cell immune response to SARS-CoV-2 is significantly stronger after hybrid exposure. The detection of peripheral blood SARS-CoV-2 specific Tscm is suitable for evaluation of T-cell immunity more than 12 months after vaccination/infection.

The epitope specificities, and the ratios between SARS-CoV-2 specific CD4 and CD8 T cells are associated with the individual dynamics of the antigenic challenges

**KeyWords:** SARS-CoV-2, T- cell immunity, T memory stem cells

**Acknowledgment:** supported by research grant KP-06-DK1/9/29.03.2021, “Immunological memory in SARS-CoV-2/COVID-19: mechanisms, duration, and cross-reactivity”  
Bulgarian National Science Fund

## ДЕТЕКЦИЯ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА SARS-COV-2 СПЕЦИФИЧНИТЕ ПАМЕТОВИ Т ЛИМФОЦИТИ 6 И 12 МЕСЕЦА СЛЕД ПРЕКАРАНА ИНФЕКЦИЯ

Милена Алексова<sup>1</sup>, Яна Тодорова<sup>1</sup>, Радослава Емилова<sup>1</sup>, Никол Кючукова<sup>2</sup>, Нина Янчева<sup>2</sup>, Магдалена Баймакова<sup>3</sup>, Христо Тасков<sup>4</sup>, Мария Николова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Отдел Имунология, Национален център по заразни и паразитни болести, София

<sup>2</sup> ОПИН, СБАЛИПБ проф. Иван Киров, София

<sup>3</sup> Клиника по Инфекциозни болести, Военномедицинска академия София

<sup>4</sup> Катедра Микробиология и имунология, МУ Пловдив

**Въведение:** Естествено придобитата имунологична памет срещу SARS-CoV-2 е ключова предпоставка за формиране на групов имунитет и ограничаване на пандемията. Продължителността на имунната памет зависи пряко от стволовите паметови Т клетки (T<sub>SCM</sub>). **Цел:** Да се идентифицират и характеризират SARS-CoV-2-специфичните паметови CD4 и CD8 Т лимфоцити и тяхната стволова субпопулация на 6<sup>-ти</sup> и 12<sup>-ти</sup> месец от прекарана инфекция. **Материали и методи:** Изследвани са периферни мононуклеарни клетки (ПМНК) от пациенти, прекарали COVID-19, на 6<sup>-ти</sup> (n=8) и 12<sup>-ти</sup> (n=13) месец след положителния PCR за SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 специфичните Т лимфоцити са идентифицирани по експресията на активационни молекули (AIM) след 16 часа стимулация с три пептидни пула (S-, N-, delta) чрез многопараметърна флуоцитометрия (комбинация от CD3, CD4, CD8, CD27, CD45RA, CD69, CD95, CD137, CD154, CD197, FACSAriaFusion, FlowJo). T<sub>SCM</sub> са дефинирани като CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>.

**Резултати:** Делът на CD4, специфични за SARS-CoV-2 [CD137<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (AIM<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)] беше по-висок в сравнение с AIM<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Шест месеца след инфекция средните проценти на AIM<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> с/у AIM<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> бяха 2,17% с/у 0,42% и 0,42% с/у 0,26%, съответно една година след инфекция. Не се установиха значими разлики в честотата на отделните субпопулации след стимулация с трите различни вирус-специфични антигена (p>0,05 one-way, ANOVA). Половин година след инфекция средните проценти на SARS-CoV-2-специфични T<sub>SCM</sub> (AIM<sup>+</sup>T<sub>SCM</sub> CD4<sup>+</sup>) спрямо AIM<sup>+</sup>T<sub>SCM</sub> CD8<sup>+</sup> бяха съответно 8,92% с/у 4,33% (p<0.05), докато година след инфекцията бяха съответно 2,62% с/у 3,36% (p>0.05). Честотите на AIM<sup>+</sup>T<sub>SCM</sub>CD4<sup>+</sup>, специфични за N и делта, намаляват значително с времето (7,68% с/у 1,11% и 10,29% с/у 0,42%, съответно на шести и дванадесети месец от инфекцията), за разлика от N- и делта-специфичните AIM<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T<sub>SCM</sub> (3,40% с/у 3,70% и 4,63% с/у 4,77%, съответно 6 и 12 месеца след инфекция). Наблюдавахме значителна отрицателна корелация между дните след положителен PCR тест и честотата на всички вирус-специфични CD4<sup>+</sup> субпопулации (AIM<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>; T<sub>SCM</sub>CD4<sup>+</sup> и AIM<sup>+</sup>T<sub>SCM</sub>CD4<sup>+</sup>; R= -0,7, p<0,001; R= -0,5, p<0,005 и съответно: R= -0,4, p<0,05). От вирус-специфичните CD8<sup>+</sup> субпопулации,

само при  $AIM^+CD8^+$  се установи отрицателна корелация с дните след инфекция ( $R = -0,4$ ,  $p < 0,05$ ).

**Заклучение:** Стволови паметови Т-лимфоцити, специфични за SARS-CoV-2, могат да се открият в периферната кръв на преболеждали до 12 месеца след инфекцията, като техните характеристики зависят силно от антигенната им специфичност.

**Ключови думи:** SARS-CoV-2, COVID-19, стволови паметови Т клетки

**Благодарности:** Това проучване е финансирано от ФНИ по проект КП-06-ДК1/9 от 29.03.2021, „Имунологична памет при SARS-CoV-2/COVID-19: механизми, продължителност и кръстосана реактивност”

## DETECTION AND CHARACTERIZATION OF SARS-COV-2 SPECIFIC MEMORY T-LYMPHOCYTES 6 AND 12 MONTHS AFTER INFECTION

Milena Aleksova<sup>1</sup>, Yana Todorova<sup>1</sup>, Radoslava Emilova<sup>1</sup>, Nikol Kuychukova<sup>2</sup>, Nina Yancheva<sup>2</sup>, Magdalena Baymakova<sup>3</sup>, Hristo Taskov<sup>4</sup>, Maria Nikolova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Immunology Department, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>Specialized Hospital for Active Treatment of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

<sup>3</sup>Infectious Diseases Clinic, Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria

<sup>4</sup>Microbiology and Immunology Department, Medical University, Plovdiv

**Introduction:** Naturally acquired immunological memory against SARS-CoV-2 is a key to the formation of herd immunity and limiting the pandemic. The duration of immune memory depends directly on T-stem cell memory ( $T_{SCM}$ ).

**Aim:** To identify and characterize SARS-CoV-2-specific memory CD4 and CD8 T-lymphocytes and their stem subpopulation 6 and 12 months after infection.

**Materials and methods:** Peripheral mononuclear cells (PMNCs) were examined at 6 ( $n = 8$ ) and 12 ( $n = 13$ ) months after SARS-CoV-2 positive PCR test. SARS-CoV-2 specific T-lymphocytes were identified by the expression of activation molecules after 16h stimulation with three peptide pools (S-, N-, delta) by multiparameter flow cytometry (combination of CD3, CD4, CD8, CD27, CD45RA, CD69, CD95, CD137, CD154, CD19, FACS Aria, FlowJo).  $T_{SCM}$  are defined as  $CD45RA^+CCR7^+CD95^+CD27^+$ .

**Results:** The frequency of SARS-Cov-2 specific  $CD137^+CD69^+CD154^+(AIM^+)$  cells among  $CD4^+$  T cells was higher compared to  $AIM^+CD8^+$ . Six months post-infection the frequency of  $AIM^+CD4^+$  vs  $AIM^+CD8^+$  was 2,17% vs 0,42%, and 0,42% vs 0,26%, respectively 12 months post-infection. No significant differences were found in the frequency of individual subpopulations after stimulation with the three different virus-specific antigens ( $p > 0,05$  one-way, ANOVA). Six months post-infection the mean frequencies of SARS-CoV-2-specific  $T_{SCM}$  ( $AIM^+T_{SCM} CD4^+$ ) vs.  $AIM^+T_{SCM} CD8^+$  were 8,92% vs. 4,33% ( $p < 0,05$ ), respectively, while 12 months post-infection were 2,62 vs 3,36% ( $p > 0,05$ ), respectively. The frequencies of  $AIM^+T_{SCM} CD4^+$ , specific for N- and delta significantly decreased with time (7,68% vs 1,11% and 10,29% vs 0,42%, respectively 6 vs. 12 months after infection), but on the contrary N- and delta-specific  $AIM^+T_{SCM} CD8^+$  were with similar frequencies (3,40% vs 3,70% and 4,63% vs 4,77%, respectively 6 vs 12 months after infection). We observed a significant negative correlation between the days after positive PCR test and the frequency of virus-specific  $AIM^+CD4^+$ ;  $T_{SCM} CD4^+$  and  $AIM^+T_{SCM} CD4^+$  ( $R = -0,7$ ,  $p < 0,001$ ;  $R = -0,5$ ,  $p < 0,005$  and  $R = -0,4$ ,  $p < 0,05$ , respectively). However, just  $AIM^+CD8^+$ , out of all analyzed

CD8<sup>+</sup> subpopulations, was negatively correlated with the days post-infection ( $R = -0.4$ ,  $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** SARS-CoV-2-specific T- stem cell memory can be detected in the peripheral blood of convalescent patients up to 12 months post-infection, and their characteristics strongly depend on their antigenic specificity.

**KeyWords:** SARS-CoV-2, T-stem cell memory

**Acknowledgment:** supported by research grant KP-06-DK1/9/29.03.2021, “Immunological memory in SARS-CoV-2/COVID-19: mechanisms, duration, and cross-reactivity”  
Bulgarian National Science Fund

## ОЦЕНКА НА БИМОЛЕКУЛНОТО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И КИНЕТИКАТА НА СВЪРЗВАНЕ НА SARS-COV-2 СТРУКТУРНИ ПРОТЕИНИ И СПЕЦИФИЧНИ АНТИТЕЛА ЧРЕЗ МЕТОДА НА ПОВЪРХНИНЕН ПЛАЗМОНЕН РЕЗОНАНС (SPR)

Петя Генова-Калу<sup>1</sup>, Георги Дянков<sup>2</sup>, Вихър Манков<sup>2</sup>, Христо Кисов<sup>2</sup>, Радослав Маринов<sup>1</sup>, Стефка Крумова<sup>1</sup>, Веселин Добринов<sup>1</sup>, Никола Малиновски<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, Отдел „Вирусология“;

<sup>2</sup>Институт по оптически материали и технологии (ИОМТ), БАН

**Въведение:** През последните години биосенсорните системи се използват все по-широко за извършване на непрекъснат контрол на биологични и синтетични процеси. За разлика от молекулните биосензори, чийто потенциал е ограничен до детекцията на действието на една прицелна молекула (лиганд), повърхностният плазмонен резонанс (SPR) е недеструктивен, специфичен метод за оценка в реално време на кинетика на взаимодействие между протеини с висока чувствителност и специфичност.

**Цел:** Целта на нашето изследване е фокусирана върху прилагането на SPR метода за проследяване на динамиката на събитията на бимолекулярно свързване между структурни SARS-CoV-2 S- и N- протеини със специфични античовешки моноклонални (МО) и поликлонални (ПО) антитела (Ab).

**Материали и методи:** Използвани са SPR слайдове, покрити със златен слой с дебелина 80 – 100 nm, отложен върху поликарбонатния субстрат чрез вакуумно термично изпаряване. Специфично античовешко МО anti-SARS-CoV-2 Ab в концентрация 2.5 µg/ml е имобилизирано върху позлатената дифракционна решетка по MAPLE метода. Така приготвените SPR чипове са обработени с SARS-CoV-2 S- и N-протеини в концентрационен диапазон 13 pM – 0.013 pM. Разликата в спектралното положение на резонансите от двете измервания дава оценка на бимолекулярните взаимодействия.

**Резултати:** На всички SPR биочипове са измерени резонансните отклонения преди и след имплементиране на МО Ab по MAPLE метода и е изчислена абсолютната грешка на измерване. Разликата в отместването на резонанса дава информация за дебелината на слоя. За удостоверяване на биоактивността на МО Ab е изследван отложеният слой чрез TEM. В резултат на измерванията се установи, че при концентрация 30 fM на SARS-CoV-2 S-протеина се регистрира спектрално отместване около 4 nm при грешка  $\pm 0.8$  nm, която е неразличима в рамките на абсолютната грешка  $\pm 1.5$  nm. Регистрацията на SARS-CoV-2 N-протеина не е така едозначна, особено при малките концентрации.



**Заключение:** Детектиран е S-/N-протеин на SARS CoV-2, чрез взаимодействие му с МО Ab, използван като биорецептор в SPR сензор. Установена е минимална детектируема концентрация от 30 fM SARS CoV-2 S-протеина. Получените резултати предоставят не само информация за количествена оценка на афинитета на свързване на прицелните молекули (аналити, специфични SARS-CoV-2 протеини) към специфични лиганди, но и фокусиране върху количествено измерване на съдържанието на анализите и проследяване на кинетиката на взаимодействие между биомолекулите.

**Благодарности:** Това проучване е проведено с финансовата подкрепа от ФНИ по Договор № КП-06-ДК 1/10 от 29.03.2021 г. на тема: „Проучване взаимодействието на специфични структурни протеини на SARS-CoV-2 с биологично активни молекули и за създаване на бързи антигенни тестове за ранна диагностика на COVID-19»

**Ключови думи:** повърхнинен плазмонен резонанс (SPR), SARS-CoV-2 S-/N- протеини, моноклонално anti-SARS-CoV-2 антитяло

### ASSESSMENT OF BIMOLECULAR INTERACTION AND BINDING KINETICS OF SARS-COV-2 STRUCTURAL PROTEINS AND SPECIFIC ANTIBODIES BY SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) METHOD

Petia Genova-Kalou<sup>1</sup>, Georgi Dyankov<sup>2</sup>, Vihar Mankov<sup>2</sup>, Hristo Kisov<sup>2</sup>, Radoslav Marinov<sup>1</sup>, Stefka Krumova<sup>1</sup>, Veselin Dobrinov<sup>1</sup>, Nikola Malinovski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Department of Virology;

<sup>2</sup>Institute of Optical Materials and Technologies (IOMT), Bulgarian Academy of Sciences (BAS)

**Introduction:** In recent years, biosensor systems have been increasingly used to perform continuous control of biological and synthetic processes. Unlike molecular biosensors, which potential is limited to the detection of the action of a single target molecule (ligand), surface plasmon resonance (SPR) is a non-destructive, specific method for real-time assessment of protein interaction kinetics with high sensitivity and specificity.

**Aim:** The aim of our research is focused on the application of the SPR method to follow the dynamics of bimolecular binding events between structural SARS-CoV-2 S- and N- proteins with specific anti-human monoclonal (MO) and polyclonal (PO) antibodies (Ab).

**Materials and methods:** SPR slides coated with 80–100 nm thick gold layer deposited on the polycarbonate substrate by vacuum thermal evaporation were used. Specific anti-human MO anti-SARS-CoV-2 Ab at a concentration of 2.5 µg/ml was immobilized on the gold-plated diffraction grating by the MAPLE method. The thus prepared SPR chips were treated with SARS-CoV-2 S- and N-proteins in a concentration range of 13 pM – 0.013 pM. The difference in the spectral position of the resonances from the two measurements gives an estimate of the bimolecular interactions.

**Results:** On all SPR biochips, resonance deviations were measured before and after implementation of MO Ab by the MAPLE method, and the absolute measurement error was calculated. The difference in resonance offset gives information about the thickness of the layer. To verify the bioactivity of the MO Ab, the deposited layer was examined by TEM. As a result of the measurements, it was found that at a concentration of 30 fM of the SARS-CoV-2 S-protein, a spectral shift of about 4 nm was registered with an error of ± 0.8 nm, which was indistinguishable within the absolute error of ± 1.5 nm. The registration of the

SARS-CoV-2 N-protein is not so unambiguous, especially at small concentrations - within the limits of measurement error.

**Conclusions:** SARS CoV-2 S-/N-proteins were detected, through its interaction with MO Ab, used as bio receptor in SPR sensor. A minimum detectable concentration of 30 fM SARS CoV-2 S-protein was found. The obtained results provide not only information for quantitative assessment of binding affinity of target molecules (analytes, specific SARS-CoV-2 proteins) to specific ligands, but also focus on quantitative measurement of analyte content and tracking of interaction kinetics between biomolecules.

**Acknowledgment:** This research was funded by Bulgarian National Science Fund, grand number KP-06-DK 1/10 from 29/03/2021 with the title: "Study of the interaction of specific structural proteins of SARS-CoV-2 with biologically active molecules and their application for the creation of rapid antigen tests for early diagnosis of Covid-19"

**Keywords:** surface plasmon resonance (SPR), SARS-CoV-2 S-/N- proteins, monoclonal anti-SARS-CoV-2 antibody

## OMICRON – УСПОКОЕНИЕ ИЛИ ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВО?

Атанасова М.<sup>1,2,3</sup>, Корсун Н.<sup>4</sup>, Комитова Р.<sup>5</sup>, Костадинов К.<sup>6</sup>, Алексиев И.<sup>4</sup>, Райчева Р.<sup>6</sup>, Иванов И.<sup>4</sup>, Гломб Л.<sup>4</sup>, Петкова Ц.<sup>2</sup>, Джозгова Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Катедра по медицинска микробиология и имунология „Проф. д-р Елисей Янев“, Медицински университет (МУ) – Пловдив

<sup>2</sup>Лаборатория по вирусология, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

<sup>3</sup>Научно-изследователски институт на Медицински университет (НИМУ) - Пловдив

<sup>4</sup>Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ) - София

<sup>5</sup>Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина, МУ-Пловдив

<sup>6</sup>Катедра по социална медицина и общественото здраве, МУ - Пловдив

**Цел:** Да се установят вариантите на SARS-CoV-2 в проби от хоспитализирани пациенти и да се потърси връзка между текущия вариант и броя на хоспитализациите и леталитета от COVID-19.

**Материали и методи:** За периода 1.7.2021-9.5.2022г. в Лабораторията по Вирусология при УМБАЛ „Св. Георги“-Пловдив чрез RT-PCR (Bioneer) е установен SARS-CoV-2 при 4000 пациенти. На 10% от тях са изпратени проби в НЦЗПБ-София за определяне вирусния вариант чрез секвениране (Pangolin COVID-19 Lineage Assigner v4.0.6), който е уточнен при 190 проби.

**Резултати:** В началото на периода се открива Alpha (8/190, 4%), заменен изцяло през август 2021г. от Delta (112/190, 59%). Delta циркулира до края на декември 2021г., когато се появява Omicron (70/190, 37%). През февруари 2022 г. Omicron измества напълно Delta, а от средата на март 2022г. доминира неговият подвариант BA.2. Отбелязват се два пика на хоспитализация (ноември 2021г. и февруари 2022г.), кореспондиращи с пиковите на пандемията с Delta и Omicron съответно. Най-висок леталитет (38,9%; 95% CI: 27,8% - 49,9%) се установява при пациентите с Delta (B.1.617.2), а най-нисък (22,69%; 95% CI: 4% - 40,53%) при тези с Omicron (BA.2). Всички подварианти на Delta (Delta B.1.617.2 и Delta AY\*) повишават леталитета с 87% в сравнение с всички останали (p=0,01). Продължителността на болничния

престой намалява при Omicron ( $p=0,04$ ). Тя е най-висока (медиана 10 дни, IQR 7–20) при пациенти с Delta (AY\*) и най-ниска (7 дни, IQR 5–19) при Omicron (BA.1/BA.1.1).

**Заключение:** Нашите резултати потвърждават установеното по-леко протичане и по-нисък леталитет при Omicron. Същевременно доминирането му поставя въпроса за промяна на терапевтичната стратегия при високорискови пациенти, особено избора на таргетна терапия.

**Ключови думи:** вирусни варианти, секвениране, леталитет.

### OMICRON – RELIEF OR CHALLENGE?

Atanasova M.<sup>1,2,3</sup>, Korsun N.<sup>4</sup>, Komitova R.<sup>5</sup>, Kostadinov K.<sup>6</sup>, Alexiev I.<sup>4</sup>, Raycheva R.<sup>6</sup>, Ivanov I.<sup>4</sup>, Glomb L.<sup>4</sup>, Petkova C.<sup>2</sup>, Dzhiglova L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical University of Plovdiv

<sup>2</sup>Laboratory of Virology, St. George University Hospital - Plovdiv

<sup>3</sup>Research Institute at Medical University of Plovdiv (RIMU)

<sup>4</sup>National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)

<sup>5</sup>Department of Infectious Diseases, Parasitology and Tropical Medicine, MU-Plovdiv

<sup>6</sup>Department of Social Medicine and Public Health, MU-Plovdiv

**Objectives:** To establish SARS-CoV-2 variants in hospitalized patients' samples and look for the relationship between the current variant and the number of COVID-19 hospitalizations and case fatality rate.

**Materials and methods:** SARS-CoV-2 was detected by RT-PCR (Bioneer) in 4000 patients in the Laboratory of Virology at St. George University Hospital-Plovdiv from July 1<sup>st</sup> 2021 to May 9<sup>th</sup> 2022. In all, 10% of samples were submitted to NCIPD-Sofia for viral variant determination by sequencing (Pangolin COVID-19 Lineage Assigner v4.0.6), established in 190.

**Results:** Alpha was detected initially (8/190, 4%) and replaced fully by Delta (112/190, 59%) in August 2021. Delta circulated until the end of December 2021, when Omicron appeared (70/190, 37%). As of February 2022, Omicron replaced completely Delta, and as of mid-March 2022 Omicron subvariant BA.2 dominates. Two hospitalization peaks were noted (November 2021 and February 2022), corresponding to the pandemic peaks of Delta, and Omicron, respectively. The highest case fatality rate (38.9%; 95% CI: 27.8% - 49.9%) was demonstrated in patients with Delta (B.1.617.2), and the lowest (22.69%; 95% CI: 4% - 40.53%) in those with Omicron (BA.2). All Delta subvariants (Delta B.1.617.2 and Delta AY\*) increased the case fatality rate by 87% compared to all others ( $p=0.01$ ). The length of hospital stay decreased with Omicron ( $p=0.04$ ). It was highest (median 10 days, IQR 7–20) in patients with Delta (AY\*) and lowest (7 days, IQR 5–19) with Omicron (BA.1/BA.1.1).

**Conclusion:** Our results confirm the established milder course and lower case fatality rate in the Omicron variant. At the same time, its dominance raises the question of changing the therapeutic strategy in high-risk patients and especially the choice of targeted therapy.

**Keywords:** viral variants, sequencing, case fatality rate.

**Адрес за кореспонденция:** Доц. д-р Мария Атанасова  
Катедра по медицинска микробиология и имунология "Проф. д-р Елисей Янев", Медицински  
Университет – Пловдив, бул. "Васил Априлов" 15-А  
тел: 0887 596 793

## **CLOSTRIDIUM DIFFICILE АСОЦИИРАНА ДИАРИЯ СЛЕД COVID 19 – ОПИТЪТ НА КЛИНИКА ПО ИНФЕКЦИОЗНИ БОЛЕСТИ КЪМ УМБАЛ „ПРОФ. СТОЯН КИРКОВИЧ“-АД, СТАРА ЗАГОРА**

Лилия Пекова<sup>1,2</sup>, Светла Ангелова<sup>1</sup>, Антоанета Йорданова<sup>3</sup>, Павлина Парушева<sup>1,2</sup>, Айше Али<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Катедра по Хигиена, Епидемиология, Микробиология, Паразитология и Инфекциозни болести, Медицински Факултет, Тракийски Университет, Стара Загора

<sup>2</sup>Клиника по Инфекциозни болести, УМБАЛ „Проф. Стоян Киркович“-АД, Стара Загора

<sup>3</sup>Катедра по Социална медицина и Здравен мениджмънт, Медицински Факултет, Тракийски Университет, Стара Загора

Доскоро считана за инфекция от вътреболничен тип Clostridium difficile – асоциираната диария (CDAD) понастоящем се наблюдава в 35-50% като придобита в обществото. През Клиника по Инфекциозни болести, УМБАЛ „Проф. Стоян Киркович“-АД, Стара Загора за период от 15 месеца са преминали 93 пациенти с това заболяване. То е възникнало в интервал от 25 до 60 дни след прекарана Covid 19 инфекция. Засегната е предимно възрастта след 75 години, преобладава мъжкият пол – 67,8%. Диаричен, астеничен и интоксикационен синдроми са водещите в клиничната картина. При 6 пациенти е наблюдавана тежка хипопротеинемия, при 2 с изявена аназарка. Изходът е благоприятен при всички с изключение на 3 пациенти, при които е летален. Предразполагащи фактори за появата на CDAD са прекомерната употреба на антибактериални средства, прекараният наскоро Covid 19 и наличието на съпътстващи хронични заболявания на сърдечно-съдовата, ендокринна и отделителна системи.

**Ключови думи:** Cl. Difficile-асоциирана диария, Covid 19

## **CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASSOCIATED DIARRHEA AFTER COVID 19 - THE EXPERIENCE OF THE CLINIC OF INFECTIOUS DISEASES AT THE UNIVERSITY HOSPITAL "PROF. STOYAN KIRKOVICH "AD, STARA ZAGORA**

Liliya Pekova<sup>1,2</sup>, Svetla Angelova<sup>1</sup>, Antoaneta Yordanova<sup>3</sup>, Pavlina Parusheva<sup>1,2</sup>, Ayshe Ali<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, Parasitology and Infectious diseases, Medical Faculty, Trakia University

<sup>2</sup>Dept. of Infectious diseases, University Multiprofile Hospital for Active Treatment "Prof. Stoyan Kirkovich", Stara Zagora

<sup>3</sup>Dept. of Social Medicine and Health Management Medical Faculty, Trakia University

Until recently, it was considered a nosocomial infection of Clostridium difficile - associated diarrhea (CDAD) is currently observed in 35-50% as acquired in society. Through the Clinic of Infectious Diseases, University Hospital "Prof. Stoyan Kirkovich "AD, Stara Zagora for a

period of 15 months passed 93 patients with this disease. It occurred between 25 and 60 days after Covid 19 infection. The age after 75 years is mainly affected, the male sex predominates - 67.8%. Diarrheal, asthenic and intoxication syndromes are leading in the clinical picture. Severe hypoproteinemia was observed in 6 patients, with pronounced anazarka in 2. The outcome was favorable in all but 3 patients, in whom it was lethal. Predisposing factors for the occurrence of CDAD are the excessive use of antibacterial agents, the recent Covid 19 and the presence of concomitant chronic diseases of the cardiovascular, endocrine and urinary systems.

**Keywords:** Cl. Difficile-associated diarrhea, Covid 19

### **ПОСТ COVID ИНФЕКЦИЯ С ВИСЦЕРАЛНА ЛАЙШМАНИОЗА – ПОТЕНЦИАЛЕН РИСК ОТ ЖИВОТОЗАСТРАШАВАЩО СЪСТОЯНИЕ: ПРЕДСТАВЯНЕ НА КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ**

Румен Харизанов<sup>1</sup>, Искра Райнова<sup>1</sup>, Тома Томов<sup>2</sup>, Искрен Кафтанджиев<sup>1</sup>, Янита Стоева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, Отдел Паразитология и Тропическа Медицина

<sup>2</sup>Александровска болница, Клинична лаборатория и клинична фармакология

<sup>3</sup>РЗИ – Благоевград, Отдел Медицински изследвания

**Цел** на настоящото проучване е установяване на клиничната насоченост на медицинските специалисти към спорадични за България заболявания, в хода на пандемията от COVID – 19 и риска от възникване на състояния застрашаващи живота на пациентите.

**Материали/методи:** Представяме клиничен случай на заболяване от висцерална лайшманиоза, непосредствено след прекарана инфекция с COVID – 19, рецидивирала след първия курс на лечение.

**Резултати:** Касае се за 63 – годишен мъж от с. Ключ, общ. Петрич, който след прекарана инфекция с COVID – 19 развива симптоматика свързана с прогресираща адинамия и персистиращ фебрилитет. На този фон се установяват значително намаляване на броя на еритроцити и левкоцити, а ехографски е установена спленомегалия. По този повод са назначени серологично и морфологично на костномозъчен пунктат изследвания за висцерална лайшманиоза извършени в НЦЗПБ. Изследванията са положителни и в двата метода и на тази база е назначено лечение с meglumine antimoniate за 20 дни. Пациентът е с добър терапевтичен отговор от приложената терапия и е дехоспитализиран, но след шест месеца развива рецидив на заболяването, налагащ повторна хоспитализация и нов курс на лечение.

**Заключение:** Добрата клинична насоченост на медицинските специалисти от болничното заведение, в което е хоспитализиран пациентът със съмнение за пост – COVID синдром, способства за добрия клиничен изход на заболяване, което без етиологично лечение завършва с летален изход за заболялия.

**Адрес за кореспонденция:** 1504 София, бул. Янко Сакъзов 26, НЦЗПБ

Отдел Паразитология и Тропическа Медицина, доц. д-р Румен Харизанов, тел. 02/9446999, вътр. 310; email: [harizanov@ncipd.org](mailto:harizanov@ncipd.org)

## **POST COVID INFECTION WITH VISCERAL LEISHMANIASIS - POTENTIAL RISK TO LIFE-THREATENING CONDITION: PRESENTATION OF A CLINICAL CASE.**

*Rumen Harizanov<sup>1</sup>, Iskra Raynova<sup>1</sup>, Toma Tomov<sup>2</sup>, Iskren Kaftandjiev<sup>1</sup>, Yanita Stoeva<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Department of Parasitology and Tropical Medicine*

<sup>2</sup>*Alexandrovska Hospital, Clinical Laboratory and Clinical Pharmacology*

<sup>3</sup>*RHI - Blagoevgrad, Department of Medical Examinations*

**The aim** of the present study is to establish the clinical focus of medical professionals on sporadic diseases in Bulgaria, in the course of the pandemic of COVID - 19 and the risk of life-threatening conditions in patients.

**Materials / methods:** We present a clinical case of visceral leishmaniasis, which occurred immediately after infection with COVID - 19, and relapsed after the first course of treatment.

**Results:** A 63-year-old man from the village of Klyuch, municipality. Petrich, who after a history of COVID-19 infection developed symptoms associated with progressive lethargy and persistent fever. Against this background, a significant decrease in the number of erythrocytes and leukocytes was found, and splenomegaly was detected by ultrasound. On this occasion, serological and morphological (bone marrow aspirate) tests for visceral leishmaniasis performed at the NCIPD. The tests were positive in both methods and on this basis meglumine antimoniate treatment was prescribed for 20 days. The patient had a good therapeutic response to the therapy and was discharged, but after six months developed a recurrence of the disease, requiring re-hospitalization and a new course of treatment.

**Conclusion:** The good clinical orientation of the medical specialists from the hospital where the patient with suspected post-COVID syndrome was hospitalized contributes to the good clinical outcome of a disease that without etiological treatment ends in death.

**Address for correspondence:** 1504 Sofia, 26 Yanko Sakazov Blvd., NCIPD; Department of Parasitology and Tropical Medicine: Assoc. Prof. Rumen Harizanov MD, PhD; phone 02/9446999, ext. 310; email: [harizanov@ncipd.org](mailto:harizanov@ncipd.org)

## СЕСИЯ IV: ИНФЕКЦИИ НА РЕСПИРАТОРНИЯ ТРАКТ И ТУБЕРКУЛОЗА

### ВИДОВО РАЗНООБРАЗИЕ НА ИЗОЛИРАНИТЕ В БЪЛГАРИЯ КЛИНИЧНО ЗНАЧИМИ НЕТУБЕРКУЛОЗНИ МИКОБАКТЕРИИ

Е. Бачийска, Ю. Атанасова, А. Байкова, С. Йорданова

Национална референтна лаборатория по туберкулоза (НРЛ ТБ), НЦЗПБ

**Въведение:** С намаление на заболяемостта от туберкулоза в глобален мащаб през последното десетилетие се наблюдава увеличение на заболяванията, предизвикани от нетуберкулозни микобактерии (NTM).

**Цел:** Да се проучи видовото разнообразие на разпространените NTM в България, асоциирани с човешката патология, 2018-2021г., допринасяйки за подобряване на етиотропната терапия на микобактериозите.

**Методи:** Културелно изследвани бяха 96 152 проби на 52 013 пациенти. NTM бяха видово идентифицирани в НРЛ ТБ, НЦЗПБ чрез LPA: Geno Type Mycobacterium CM, AS и NTM-DR, Hain Lifescience, Германия, базирани на DNA Strip технология.

**Резултати:** Изолирани бяха 295 щамове NTM от 216 пациенти. С повече от един изследван клиничен материал бяха 17,6%. В 82,4% (n=178) преобладаваше спутум. Най-често изолираните NTM бяха: MAC-31,5% (n=68), следвани от *M. goodii*-26,9% (n=58), *M. fortuitum*-10,6% (n=23), *M. chelonae*-7,8% (n=17), *Mycobacterium spp.*-6,9% (n=15), *M. abscessus*-5,1% (n=11), *M. mucogenicum*-3,7% (n=8), *M. xenopi*-2,7% (n=6), *M. lentiflavum*-1,8 (n=4), и следните видове-всеки по 0,5% (n=1): *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. interjectum* и *M. marinum*. Мъжете преобладаваха в 57,41%. Най-засегнатата възрастова група беше над 65г.-41%. Пациентите бяха концентрирани в 3 области: Пловдив, София-град и Варна-67,13% (n=145). Само 25,46% (n=55) от NTM пациентите са отговаряли на критериите на American Thoracic Society (ATS) за микробиологично потвърдена белодробна микобактериоза.

**Заключение:** Точната видова идентификация е от съществено значение при определяне на етиотропната терапия. Необходимо е придържане към критериите на ATS от страна на клиницистите, предвид дългото, трудното и не винаги успешното лечение на микобактериозите.

**Ключови думи:** нетуберкулозни микобактерии, микобактериози

**Благодарности.** Проучването е осъществено с подкрепата на Европейския фонд за регионално развитие чрез ОП „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2020, BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални, транслационни и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“

Доц. д-р Елизабета Бачийска, дм  
Зав. НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ  
1233 София  
Бул. „Ген. Н. Столетов“ № 44 А  
Тел.: 02 944 64 45  
E-mail: tb\_nrl@abv.bg

## SPECIES DIVERSITY OF CLINICALLY SIGNIFICANT NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA ISOLATED IN BULGARIA

*E. Bachiyska, Y. Atanasova, A. Baykova, S. Yordanova*

*National Reference Laboratory of Tuberculosis (NRLTB), NCIPD, Bulgaria*

**Introduction:** With the decline in the incidence of tuberculosis globally in the last decade, there has been an increase in diseases caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM).

**Objective:** To study the species diversity of common NTM in Bulgaria, associated with human pathology, 2018-2021, contributing to the improvement of etiotropic therapy of mycobacteriosis.

**Methods:** They were studied 96 152 samples of 52 013 patients for mycobacteria by cultures. NTMs were species identified in NRL TB, NCIPD by LPA: Geno Type Mycobacterium CM, AS and NTM-DR, Hain Lifescience, Germany, based on DNA Strip technology.

**Results:** Of 216 patients, 295 NTM strains were isolated. Only 17.6% had more than one samples, with sputum predominating at 82.4% (n=178). The most common isolated were: MAC-31.5% (n=68), followed by *M. gordonae*-26.9% (n=58), *M. fortuitum*-10.6% (n=23), *M. chelonae*-7.8% (n=17), *Mycobacterium spp.*-6.9% (n=15), *M. abscessus*-5.1% (n=11), *M. mucogenicum*-3.7% (n=8), *M. xenopi*-2.7% (n=6), *M. lentiflavum*-1.8 (n=4), and the following species-0,5% (n=1) each: *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. interjectum* и *M. marinum*. Men prevailed in 57.41%. The age group over 65 was the most affected-41%. Patients were concentrated in 3 districts: Plovdiv, Sofia-city and Varna-67.13% (n=145). Only 25.46% (n=55) of patients with NTM isolates met the American Thoracic Society (AST) criteria for microbiologically confirmed pulmonary disease.

**Conclusions:** Accurate species identification is significant for etiotropic therapy. Clinicians need to adhere to the ATS criteria, given the long, difficult and not always successful treatment of mycobacteriosis.

**Keywords:** nontuberculous mycobacteriae, mycobacteriosis

**Acknowledgements:** The study was carried out with the support of the European Fund for regional development through OP Science and Education for Smart Growth 2014-2020, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity.

Assoc. Prof. Elizabeta Bachiyska, MD, PhD  
NRL TB, NCIPD  
44 A, Gen. Stoletov Blvd  
1233 Sofia, Bulgaria  
Tel.: +359 2 944 64 45  
E-mail: tb\_nrl@abv.bg

ГЕНОТИПНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА РИНОВИРУСИ, ЦИРКУЛИРАЛИ В БЪЛГАРИЯ В ПЕРИОДА 2019-2021



*Ирина Георгиева<sup>1</sup>, Ася Стоянова<sup>1</sup>, Светла Ангелова<sup>2</sup>, Нели Корсун<sup>2</sup>, Любомира Николаева-Гломб<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Национална Референтна Лаборатория „Ентеровируси“, Отдел „Вирусология“, НЦЗПБ

<sup>2</sup> Национална Референтна Лаборатория „Грип и ОРЗ“, Отдел „Вирусология“, НЦЗПБ

## **ВЪВЕДЕНИЕ**

Настоящото проучване е първото по рода си молекулярно-биологично генотипиране на риновирусите, циркулиращи в България.

## **ЦЕЛ**

Да се определи генотипната характеристика на риновируси, доказани в проби на пациенти с респираторни инфекции.

## **МЕТОДИ**

Наличието на риновируси е доказано чрез real-time-RT-PCR, таргетиращ 5'UTR на вирусния геном. Генотипирането е извършено чрез секвениране на VP4/VP2 участък от вирусния геном.

## **РЕЗУЛТАТИ**

За периода 2019-2021 са изследвани общо 1813 проби за наличие на риновируси. Пробите са получени в НРЛ „Грип и ОРЗ“ на Националния център по заразни и паразитни болести и в Клиника по инфекциозни болести, УМБАЛ „Проф. Д-р Ст. Киркович“ – Стара Загора. Положителни за наличието на риновируси са 129 (129/1813; 7,1%). От положителните материали са подбрани подходящи за секвенирани по VP4/VP2 проби. Установени са риновируси от тип RV-A и RV-C. Няма доказани риновируси от тип B. Преобладават риновирусите от тип C, като са доказани следните генотипове: RV-C12, RV-C8, RV-C21, RV-C22, RV-C-SC261, RV-C29. Риновирусите от тип A попадат в следните генотипове: RV-A105, RV-A101, RV-A31, RV-A76, RV-A80.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

За първи път се доказват риновируси от новооткрития тип rhinovirus – C. Доказано е значително генотипно разнообразие на циркулиращите риновируси през изследвания период.

## **ФИНАНСИРАНЕ**

Това проучване е финансирано от Фонд „Научни изследвания“ по проект КП-06-H23/10

**Ключови думи:** риновирус, генотипиране

Кореспондиращ автор: Ирина Георгиева, Национална референтна лаборатория "Ентеровируси", НЦЗПБ, София 1233, бул. „Столетов“ 44А; тел. +359 2 831 00 42; мобилен те. : +359 878 44 85 94

**GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF RHINOVIRUSES CIRCULATED IN BULGARIA, 2019-2021.**

*Irina Georgieva<sup>1</sup>, Asya Stoyanova<sup>1</sup>, Svetla Angelova<sup>2</sup>, Neli Korsun<sup>2</sup>, Lubomira Nikolaeva-Glomb<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*National Reference Laboratory "Enteroviruses", Department of Virology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)*

<sup>2</sup>*National Reference Laboratory "Influenza and ARI", Department of Virology, NCIPD*

## **BACKGROUND**

The present study is the first attempt for molecular genotyping of rhinoviruses in Bulgaria.

## **AIM**

To determine the genotypic characteristics of rhinoviruses detected in samples from patients with respiratory infections.

## **METHODS**

The samples were screened for rhinoviruses by a real-time RT-PCR method targeting the viral 5'UTR and were genotyped by sequencing of VP4/VP2 region of the rhinovirus genome=

## **RESULTS**

A total of 1813 samples were screened for rhinoviruses during 2019-2021. Of these, 129 (7.1%) were positive for rhinovirus. From rhinovirus positive samples were selected those, suitable for Sanger sequencing. Genotypes were assigned according VP4/VP2 sequences. Rhinoviruses of type RV-A and RV-C have been identified. No rhinoviruses type B were detected. Rhinoviruses of type C predominate, and RV-C strains for each genotype were: RV-C12, RV-C8, RV-C21, RV-C22, RV-C-SC261, RV-C29. RV-A strains for each genotype were: RV-A105, RV-A101, RV-A31, RV-A76, RV-A80.

## **CONCLUSIONS**

For the first time, rhinoviruses of the newly discovered type rhinovirus - C have been detected in Bulgaria. Significant genotypic diversity of circulating rhinoviruses has been demonstrated during the study period.

## **FUNDING**

This work was supported by project KPI-06-H23/10 of the Bulgarian National Science Fund, Ministry of Education and Science, Sofia, Bulgaria

**Keywords:** rhinovirus, genotypes

Corresponding author: Irina Georgieva, National Laboratory "Enteroviruses", NCIPD, Sofia, 44A Stoletov Blvd, 1233; Tel. +359 2 831 00 42; Mobile phone: +359 878 44 85 94

## **ОСТРИ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ – СЪВРЕМЕНЕН МИКРОБИОЛОГИЧЕН ПОДХОД**

*Ангелова А.<sup>1,2,3</sup>, Кетев К.<sup>4,5</sup>, Паскалева И.<sup>5</sup>, Атанасова М.<sup>1,2,6</sup>, Комитова Р.<sup>7</sup>, Ленгерова Г.<sup>1,2,3</sup>, Калчев Й.<sup>1,2,3</sup>, Корсун Н.<sup>8</sup>, Гломб Л.<sup>8</sup>, Левтерова В.<sup>8</sup>, Димчева Т.<sup>9</sup>, Кантарджиев Т.<sup>3</sup>, Мурджева М.<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup>Катедра по медицинска микробиология и имунология „Проф. д-р Елисей Янев“, ФФ, Медицински университет – Пловдив

<sup>2</sup>Лаборатория по микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

<sup>3</sup>Научно-изследователски институт на Медицински университет - Пловдив (НИМУ)

<sup>4</sup>Медицински Симулационен Тренировъчен Център към НИМУ на МУ-Пловдив

<sup>5</sup>Клиника по педиатрия и медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

<sup>6</sup>Лаборатория по вирусология, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

<sup>7</sup>Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина, МУ-Пловдив

<sup>8</sup>Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ)

<sup>9</sup>Катедра по медицинска информатика, биостатистика и електронно обучение, ФОЗ, МУ - Пловдив.

### **Цел:**

Да се проучат възможностите на мултиплексен PCR (mPCR) за бърза микробиологична диагностика на остри респираторни инфекции (ОРИ) в детска възраст и да се очертае етиологичният им спектър.

### **Материали**

**и**

### **методи:**

За периода януари 2018 - февруари 2022г. са изследвани назофарингеални секрети на 120 хоспитализирани с ОРИ деца на средна възраст 16 месеца (IQR=92 месеца) чрез mPCR Respiratory panel (FilmArray, bioMerieux).

### **Резултати:**

При 68% (81/120) деца се установяват положителни резултати. Най-засегнати са кърмачетата (n=57), при които положителна находка има в 80%. Водещи причинители са Human Rhinovirus/Enterovirus (n=42), Respiratory syncytial virus (RSV) (n=26) и Parainfluenza virus (n=14). Най-честата диагноза е пневмония – 44% (n= 53). При пет кърмачета се открива *Bordetella pertussis*, при 4 от тях в съчетание с Human Rhinovirus/Enterovirus, Coronavirus 229E и Human bocavirus. Доказват се три случая на рабдомиолиза, свързана с парагрипни вируси. Комбинирани инфекции се установяват при 32%. Откриват се две ко-инфекции между SARS-CoV-2 и RSV, едната от които с фатален изход.

### **Заклучение:**

mPCR в осигурява бърза диагностика на ОРИ в ранна детска възраст, причинени от вируси и трудно култивиреми бактерии. Това позволява бързо назначаване на подходящо лечение и своевременен инфекциозен контрол.

**Ключови думи:** мултиплексен PCR, респираторни инфекции, педиатрични пациенти

## **ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS IN CHILDHOOD – AN ADVANCED MICROBIOLOGICAL APPROACH**

Angelova A.<sup>1,2,3</sup>, Ketev K.<sup>4,5</sup>, Paskaleva I.<sup>5</sup>, Atanasova M.<sup>1,2,6</sup>, Komitova R.<sup>7</sup>, Lengerova G.<sup>1,2,3</sup>, Kalchev Y.<sup>1,2,3</sup>, Korsun N.<sup>8</sup>, Glomb L.<sup>8</sup>, Levterova V.<sup>8</sup>, Dimcheva T.<sup>9</sup>, Kantardzhiev T.<sup>3</sup>, Murdzheva M.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical University of Plovdiv

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, St. George University Hospital - Plovdiv

<sup>3</sup>Research Institute at Medical University of Plovdiv (RIMU)

<sup>4</sup>Medical Simulation Training Center at RIMU of MU-Plovdiv

<sup>5</sup>*Clinic of Pediatrics and Medical Genetics, St. George University Hospital – Plovdiv*

<sup>6</sup>*Laboratory of Virology, St. George University Hospital - Plovdiv*

<sup>7</sup>*Department of Infectious Diseases, Parasitology and Tropical Medicine, MU-Plovdiv*

<sup>8</sup>*National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)*

<sup>9</sup>*Department of Medical informatics, Biostatistics, and e-learning, MU - Plovdiv.*

**Objective:** To study the potentiality of multiplex PCR (mPCR) for rapid microbiological diagnosis of acute respiratory infections (ARI) in childhood and to outline their etiological spectrum.

**Materials and methods:** From January 2018 to February 2022, nasopharyngeal swabs from 120 children hospitalized because of ARI with median age 16 months, IQR = 92 were tested by mPCR Respiratory panel (FilmArray, bioMerieux).

**Results:**

Positive results were found in 68% (81/120) of children. The most affected are infants (n= 57), in whom there is a positive finding in 80% of cases. The leading causative agents are Human Rhinovirus / Enterovirus (n = 42), Respiratory syncytial virus (RSV) (n = 26), and Parainfluenza viruses (n=14). The most common diagnosis is pneumonia - 44% (n = 53). Bordetella pertussis was detected in five infants, 4 of whom also had Human Rhinovirus / Enterovirus, Coronavirus 229E and Human bocavirus. Three cases of rhabdomyolysis associated with parainfluenza viruses have been reported. Combined infections were found in 32%. Two co-infections were found between SARS-CoV-2 and RSV, one of which was fatal.

**Conclusion:**

mPCR provides rapid diagnosis of ARI in early childhood, especially of ones caused by viruses and difficult-to-culture bacteria. This allows the rapid appointment of appropriate treatment and timely infection control measures.

**Keywords:** multiplex PCR, respiratory infections, pediatric patients

**Адрес за кореспонденция:**

Д-р Андреана Ангелова

Асистент към Катедра по медицинска микробиология и имунология “Проф. д-р Елисей Янев“, Медицински Университет – Пловдив, бул. "Васил Априлов" 15-А 4002, Пловдив България  
тел: 0897764494

## СЕСИЯ V: СЕКСУАЛНО ПРЕДАВАНИ ИНФЕКЦИИ

### АНАЛИЗ НА ТРАНСМИСИОННИТЕ РЕЗИСТЕНТНИ МУТАЦИИ И РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА СУБТИПОВЕТЕ НА HIV-1 В БЪЛГАРИЯ 2012-2021

*Ивайло Алексиев<sup>1</sup>, Александра Парцунева<sup>1</sup>, Любомира Григорова<sup>1</sup>, Ренета Димитрова<sup>1</sup>, Анна Ганчева<sup>1</sup>, Ася Костадинова<sup>1</sup>, Ивайло Еленков<sup>2</sup>, Нина Янчева<sup>2</sup>, Р. Гроздева<sup>2</sup>, Марияна Стойчева<sup>3</sup>, Цеца Дойчинова<sup>4</sup>, Лилия Пекова<sup>5</sup>, Минас Козмидис<sup>6</sup>, Радослава Емилова<sup>7</sup> и Мария Николова<sup>7</sup>*

<sup>1</sup>Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV (НРПЛ по HIV), НЦЗПБ, София

<sup>2</sup>Специализирана болница за инфекциозни и паразитни болести, София

<sup>3</sup>Медицински университет, Катедра по инфекциозни заболявания, Пловдив

<sup>4</sup>Медицински университет, Катедра по инфекциозни заболявания, Плевен

<sup>5</sup>Университетска болница, Клиника по инфекциозни заболявания, Стара Загора

<sup>6</sup>Медицински университет, Катедра по инфекциозни заболявания, Варна

<sup>7</sup>Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София

Email за кореспонденция: [ivoalexiev@yahoo.com](mailto:ivoalexiev@yahoo.com)

**Ключови думи:** резистентни мутации; HIV субтипове; филогенетични клъстери.

#### Цел

Трансмисионните резистентни мутации (TRM) могат да причинят вирусологичен неуспех на антиретровирусната терапия (АРТ) от първа линия. Целта на проучването е да се анализират TRM и да се идентифицират филогенетичните клъстери с тези мутации сред при лицата диагностицирани с HIV през 2012-2021 г. в България.

#### Материали и методи

В това проучване бяха използвани широк набор от най-съвременни молекулярно-биологични методи за анализ. Чрез секвениране на различни фрагменти от *pol* гена на HIV бяха анализирани TRM към различни класове антиретровирусни медикаменти. Бяха използвани набор от биоинформационни програми за молекулярно-епидемиологичен анализ, за реконструиране на филогенетични дървета и за идентифициране на филогенетични клъстери.

#### Резултати

В това проучване са включени данни от 1053 лица, регистрирани с HIV в България през периода 2012-2021 г. От тях 85,9% са мъже, 38,5% са инфектирани чрез хетеросексуални контакти, а останалите попадат в други трансмисионни групи. Идентифицирани са TRM към различни класове антиретровирусни медикаменти, включително нуклеотидни/нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза, ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза, протеазни инхибитори и инхибитори на интегразата. Редица филогенетични клъстери с TRM са установени сред новодиагностицирани наивните за АРТ лица.

#### Заклучение

Съвременната АРТ е в състояние да контролира HIV инфекцията. Въпреки това ТРМ при наивните за АРТ лица може да причинят неуспех при лечението от първа линия, поради което е необходимо да се провеждат изследвания за резистентност преди започване на АРТ. Филогенетичните клъстери с ТРМ демонстрират потенциал за ускореното им разпространение сред уязвимите групи с HIV в страната.

### **Благодарности**

Проучването е финансирано от "Национална програма за превенция и контрол на ХИВ и сексуално предавани инфекции (СПИ)". От Европейския фонд за регионално развитие чрез Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж 2014 - 2020 г.; Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекциите и имунитета“.

## **ANALYSIS OF THE TRANSMITTED DRUG RESISTANCE MUTATIONS AND DISSEMINATION OF HIV-1 SUBTYPES IN BULGARIA 2012-2021**

*Ivaylo Alexiev<sup>1</sup>, Alexandra Partsuneva<sup>1</sup>, Lyubomira Grigorova<sup>1</sup>, Reneta Dimitrova<sup>1</sup>, Anna Gancheva<sup>1</sup>, Asya Kostadinova<sup>1</sup>, Ivaylo Elenkov<sup>2</sup>, Nina Yancheva<sup>2</sup>, R. Grozdeva<sup>2</sup>, Mariana Stoycheva<sup>3</sup>, Tsetsa Doichinova<sup>4</sup>, Lilia Pekova<sup>5</sup>, Minas Kosmidis<sup>6</sup>, Radoslava Emilova<sup>7</sup> and Maria Nikolova<sup>7</sup>*

<sup>1</sup>*National Reference Confirmatory Laboratory of HIV (NRCL of HIV), NCIPD, Sofia, Bulgaria*

<sup>2</sup>*Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria*

<sup>3</sup>*Department of Infectious Diseases, Medical University, Plovdiv, Bulgaria*

<sup>4</sup>*Department of Infectious Diseases, Medical University, Pleven, Bulgaria*

<sup>5</sup>*Clinic of Infectious Diseases, Medical University, Stara Zagora, Bulgaria*

<sup>6</sup>*Clinic of Infectious Diseases, Medical University, Varna, Bulgaria*

<sup>7</sup>*National Reference Laboratory of Immunology, NCIPD, Sofia, Bulgaria*

Email for correspondence: ivoalexiev@yahoo.com

**Keywords:** resistance mutations; HIV subtypes; phylogenetic clusters

### **Introduction**

Transmitted drug resistant mutations (TDRM) can compromise the first line therapy regimen and cause treatment failure. The aim of the study was to analyze TDRM and to identify phylogenetic clusters with these mutations among people diagnosed with HIV in 2012-2021.

### **Materials and methods**

In this study a wide range of state-of-the-art molecular biology methods were applied for the analysis. By sequencing different fragments of HIV *pol* gene, resistant mutations (RM) to different classes of antiretroviral drugs were analyzed. A variety of bioinformatics software have been used to conduct molecular epidemiological analysis, to reconstruct phylogenetic trees and to identify potential phylogenetic clusters.

### **Results**

We analyzed 1053 individuals diagnosed with HIV in Bulgaria during the period 2012-2021. Of these, 85.9% were men, 38.5% were infected through heterosexual transmission and the

rest belonged to other transmission groups. RM to various classes of antiretroviral drugs have been identified, including nucleotide/nucleoside reverse transcriptase inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, protease inhibitors and integrase inhibitors. A number of phylogenetic clusters with RM have been identified in the naïve to ART individuals.

### Conclusions

Modern ART is able to control HIV infections. However, RM in naïve individuals can cause treatment failure in the first line of treatment, therefore resistance tests before initiation of therapy is required. Phylogenetic clusters with RM demonstrate the potential for accelerated dissemination of resistance mutations among the vulnerable groups.

### Acknowledgments

The study was supported by the National Program for Prevention and Control of HIV and Sexually Transmitted Infections in Bulgaria; by the European Regional Development Fund through Operational Program Science and Education for Smart Growth 2014–2020, Grant BG05M2OP001- 1.002- 0001- C04 “Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity”.

## ЕНДОМЕТРИАЛЕН МИКРОБИОМ ПРИ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ ПРОБЛЕМИ

С. Пачкова<sup>1</sup>, С. Блажева<sup>1,2</sup>, П. Иванов<sup>1,2</sup>, Т. Бодурска<sup>1</sup>, Е. Конова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Медицински Център „Клиничен институт за репродуктивна медицина“, гр. Плевен

<sup>2</sup>Медицински Университет, гр. Плевен

**Цел:** Да се изследва ендометриалния микробиом (ЕМ) при жени с имплантационни неуспехи и повтарящи се спонтанни аборти. Да се определи значението на това изследване за подобряване на диагностиката и терапията.

**Материали и методи:** За период от три години в проучването са включени 169 жени с репродуктивни неуспехи. Средната възраст е 38.4 години. Изследвани са 250 ендометриални биопсии с молекулярно диагностичния метод Femoflor 16. Флуоцитометричен метод беше използван за доказване на плазматични клетки (CD138+), като маркер за хроничен ендометрит. Биопсиите с нарушен ЕМ бяха разделени на три групи: силно нарушен ЕМ (липса на лактобацили, дисбиотични бактерии над 10%), умерено нарушен ЕМ (лактобацили под 90%, дисбиотични бактерии над 10%) и липса на лактобацили и друга бактериална флора.

**Резултати:** От всички изследвани биопсии 175 (70%) са с нарушен ЕМ. От тях 68 (38.8%) са с данни за хроничен ендометрит. Най-висок е процента на биопсиите със силно нарушен ЕМ (45.7%), следвани от тези с липса на бактериална флора (29.1%), а най-нисък е процента на умерено нарушения ЕМ (25.1%). От изолираните микроорганизми преобладават облигатно анаеробните бактерии. Най-често се доказват *G. vaginalis*, *A. vaginae* и *Mobiluncus* spp.

**Заключение:** Нарушенията в ендометриалния микробиом може да се разглеждат като една от причините за репродуктивни неуспехи. Тези изследвания могат да помогнат за изготвяне на правилна стратегия при следващи бременности.

**Ключови думи:** ендометриален микробиом, ендометриална биопсия.

**Адрес за кореспонденция:** МЦ КИРМ, бул. „ген. Скобелев“ 20Г, Плевен, д-р Светлана Пачкова, моб. тел: 0888 538 723

## ENDOMETRIAL MICROBIOME IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE PROBLEMS

*C. Pachkova<sup>1</sup>, S. Blazheva<sup>1,2</sup>, P. Ivanov<sup>1,2</sup>, T. Bodurska<sup>1</sup>, E. Konova<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>*Medical Center Clinical Institute for Reproductive Medicine, Pleven*

<sup>2</sup>*Medical University, Pleven*

**Aim:** To investigate the endometrial microbiome (EM) in women with implantation failures and recurrent miscarriages. To determine the importance of this study in improving diagnosis and therapy.

**Materials and Methods:** 169 women with reproductive failure were studied over a period of three years. The mean age was 38.4 years. 250 endometrial biopsies were investigated with the molecular diagnostic method Femoflor 16. A flowcytometric method was used to evidence plasma cells (CD138+) as a marker for chronic endometritis. Biopsies with abnormal EM were divided into three groups: highly abnormal EM (no lactobacilli, dysbiotic bacteria over 10%), moderately abnormal EM (lactobacilli under 90%, dysbiotic bacteria over 10%), and no lactobacilli and other bacterial flora.

**Results:** 175 (70%) of all biopsies had abnormal EM. Of these, 68 (38.8%) had evidence of chronic endometritis. The highest percentage of biopsies had severely disturbed EM (45.7%), followed by those with absent bacterial flora (29.1%), and the lowest percentage had moderately disturbed EM (25.1%). Of the microorganisms isolated, obligately anaerobic bacteria predominated. The most frequently detected bacteria were *G. vaginalis*, *A. vaginae* and *Mobiluncus* spp.

**Conclusion:** Abnormalities in the endometrial microbiome can be considered as one of the causes of reproductive failure. These investigations can help to develop a appropriate strategy for subsequent pregnancies.

**Keywords:** endometrial microbiome, endometrial biopsy.



## СЕСИЯ VI: ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМИ ИНФЕКЦИИ

### ПНЕВМОКОКОВО НОСИТЕЛСТВО И РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА СЕРОТИПОВЕТЕ ПРИ ЗДРАВИ ДЕЦА ДО 6 ГОДИШНА ВЪЗРАСТ В БЪЛГАРИЯ СЛЕД ВЪВЕЖДАНЕ НА PCV10 В НАЦИОНАЛНИЯ ВАКСИНАЦИОНЕН КАЛЕНДАР

В. Левтерова<sup>1</sup>, И. Симеоновски<sup>1</sup>, Н. Бранкова<sup>1</sup>, М. Иванова, М. Малчева<sup>2</sup>, И. Филипова<sup>1</sup>, З. Иванова<sup>1</sup>, Л. Боянова<sup>1</sup>, Т. Кантарджиев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ)

<sup>2</sup>УМБАЛСМ "Н.И.Пирогов"

**Увод:** *Streptococcus pneumoniae* представлява сериозен проблем за общественото здраве в световен мащаб. Боледуват хора от всички възрасти, но децата под двегодишна възраст и възрастните над 65 години са в особено висок риск. По настоящем, на основата на химически различия в строежа на капсулните полизахариди, на пневмококите се причисляват вече над 100 серотипа. В България е въведена 10-валентна пневмококова конюгирана ваксина (PCV10). В периода 2011-2017 г., тя е била с над 90% покритие (оценка на СЗО и УНИЦЕФ за националните имунизации през 2010 г.). Ваксиналните серотипове (серотип 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F и 23F), които са най-чести причинители на инвазивни пневмококови заболявания, след ваксинация са изолирани с по – ниска честота при деца носители на пневмококи. В момента се наблюдава относително увеличение на честотата на носителство на неваксинални серотипове.

**Цел:** Целта на това изследване беше да се проучат циркулиращите серотипове *Streptococcus pneumoniae* при назофарингеално носителство на деца в България, ваксинирани с PCV10.

**Материали и методи:** Изследвани са общо 224 деца на възраст от 3 месеца до 6 години за период от 12 месеца. Те са изследвани културелно и чрез генетични методи. Вземаха се назофарингеални секрети с два тампона, един в среда е Swab (Copan, Italy) и един сух за изолиране на ДНК. Пробите бяха култивирани на агар Columbia CNA с 5% овча кръв, като се поставяше оптохинов диск, за да бъдат разграничени пневмококите от друга микробна флора. От сухите тампони беше паралелно изолирана ДНК и културелно отрицателните проби бяха подложени на скрининг с RT-PCR за наличие на пневмококова ДНК. Изолати, които бяха положителни по *cpsA* и *lytA* гени бяха типизирани чрез полимеразно верижна реакция и след това с алелна хибридизация за 75 серотипа.

**Резултати:** Носителство беше установено в голям процент от пробите. За период от 1 година бяха изследвани 224 броя проби от деца от възрастови групи: <1г. (9бр. ), 1-2г. (25бр.), 3-4г. (70бр.), 5-6г. (120бр.). Изследвани бяха общо 103 (46%) момичета и 121 (54%) момчета. Положителни за *Streptococcus pneumoniae* бяха общо 73 проби (33%), а културелно положителни бяха 17 проби (8%) от всички изследвани материали. От директно изолираната ДНК бяха установени някои проби с повече от един серотип – два, три и четири серотипа/сегроупи, колонизиращи назофаринкса по едно и също време. Установено е преобладаващо носителство на 19В/19С, 23В, 15В/15С и нетипабилни. Няколко неваксинални серотипа (19В/19С, 23В и 15В/15С) са се увеличили значително повече при изолати от горни дихателни пътища при

ваксинирани деца. Разпространението на ваксинални серотипове е с ниска честота, като дял от всички положителни резултати и са под 10%.

**Заклучение:** Проведените лабораторни изследвания в НРЛ „Молекулярна микробиология” показаха, че при деца до 6 годишна възраст в България има висок процент носителство, характеризиращо се основно с неваксинални серотипове. Колонизацията с ваксинални серотипове при деца е силно намаляла, но въпреки това остава налична десет години след въвеждането на PCV10.

**Ключови думи:** пневмококово носителство, типизиране, PCV10

**Благодарности:** Това проучване е финансирано от ФНИ по проект № КП-06Н43/4 от 30.11.2020г. "Молекулярно-генетична идентификация и създаване на архивна геномна банка на циркулиращите *S. pneumoniae* при деца, както и анализ на разпространените серотипове, свързани с въвеждане на пневмококовите ваксини в Р. България"

## **PNEUMOCOCCAL CARRIAGE AND PREVALENCE OF SEROTYPES IN HEALTHY CHILDREN UP TO 6 YEARS OF AGE IN BULGARIA AFTER INTRODUCTION OF PCV10 IN THE NATIONAL VACCINATION CALENDAR**

V. Levterova<sup>1</sup>, I. Simeonovski<sup>1</sup>, N. Brankova<sup>1</sup>, I. Filipova<sup>1</sup>, Z. Ivanova<sup>1</sup>, L. Boyanova<sup>1</sup>, M. Malcheva<sup>2</sup>, T. Kantardzhiev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Center for Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)

<sup>2</sup>UMBALSM "NIPirogov"

**Introduction:** *Streptococcus pneumoniae* is one of the most common causes of diseases that are globally prevalent. Currently, based on chemical differences in the structure of capsular polysaccharides, pneumococci are already more than 100 serotypes.

A 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) has been introduced in Bulgaria. In the period 2011-2017, it had over 90% coverage (based on WHO and UNICEF data for national immunizations in 2010). Vaccine serotypes (serotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F), most common causes of invasive pneumococcal disease, were isolated with a lower incidence in children after vaccination. There is currently a relative increase in the number of non-vaccine serotypes.

**Objective:** The aim of this study was to investigate the circulating serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal children carriers in Bulgaria vaccinated with PCV10.

**Materials and methods:** The research covered 224 children aged 3 months to 6 years for a period of 12 months. They have been tested culturally and by genetic methods. Nasopharyngeal secretions were taken with two swabs, one in eSwab medium (Copan, Italy) and one dry to isolate DNA. Samples were cultured on Columbia CNA agar with 5% sheep blood using an optochin disk to separate pneumococci from other microbial flora. DNA was isolated from the dry swabs. Culture-negative samples were screened by RT-PCR for pneumococcal DNA. The positive isolates for *cpsA* and *lytA* genes were typed by polymerase chain reaction and then by allelic hybridization for 75 serotypes.

**Results:** Carriage was found in a large percentage of samples. For a period of 1 year, 224 samples of children from age groups were examined: <1 year. (9 items), 1-2 years. (25 pcs.), 3-4 years. (70 pcs.), 5-6 years. (120 pcs.). A total of 103 (46%) girls and 121 (54%) boys were studied. A total of 73 samples (33%) were positive for *Streptococcus pneumoniae*, and 17 samples (8%) were culture positive from all examined materials. From the directly

isolated DNA, some samples with more than one serotype were found - two, three and four serotypes/serogroups colonizing the nasopharynx at the same time. Predominant carriage of 19B/19C, 23B, 15B/15C and untypeable was found. Several nonvaccine serotypes (19B/19C, 23B, and 15B/15C) increased significantly more in upper respiratory tract isolates from vaccinated children. The prevalence of vaccine serotypes is low in frequency, as a proportion of all positive results and is less than 10%.

**Conclusion:** The tests in NRL "Molecular Microbiology" showed that in children up to 6 years of age in Bulgaria there is a high percentage of carriage, characterized mainly by non-vaccine serotypes. Colonization with vaccine serotypes in children has greatly decreased, but ten years after introduction of PCV10 still remains.

**Keywords:** pneumococcal carriage, typing, PCV10

**Acknowledgment:** Supported by Research grant № КП-06Н43/4 от 30.11.2020г., Bulgarian National Science Fund

## ЛАБОРАТОРНО ДОКАЗВАНЕ НА ПЪРВИ СЛУЧАИ НА ВИРУСА НА МАЙМУНСКА ВАРИОЛА В БЪЛГАРИЯ

Ст. Крумова<sup>1</sup>, Р. Стефанова<sup>1</sup>, Р. Михайлова<sup>2</sup>, Т. Червенякова<sup>3</sup>, Л. Николаева-Гломб<sup>1</sup>, И. Христова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София, България

<sup>2</sup>Военномедицинска академия (ВМА), София, България

<sup>3</sup>Специализирана болница по активно лечение на паразитни и инфекциозни болести (СБАЛИПБ) „Проф. Иван Киров“, София, България

### РЕЗЮМЕ

Човешкият маймунски поксвирус (MPXV) е двойноверижен ДНК вирус, представител на род Ортопоксвируси, семейство Поксвируси. Доказани са две вирусни генетични групи: Западно и Централноафриканска. От м. май 2022 г., е регистриран взрив на MPXV в неендемични за него държави, като до 29 юни 2022 г. общият брой на докладваните случаи в Европейския регион е 4178. Най-засегнати са Обединеното Кралство, Германия, Испания и Португалия.

**ЦЕЛ:** Да се оптимизират протоколите за вирусно доказване и лабораторно да бъдат проучени всички възможни случаи на маймунска вариола в страната, с цел недопускане на ендемично разпространение на вируса.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ:** До 30 юни 2022 г., в България са лабораторно потвърдени и проучени три случая на маймунска вариола. Заболелите са мъже на възраст 29, 41 и 44 години, които се определят като мъже, които правят секс с мъже (MSM). Изследваните клинични материали са: 3 проби везикуларно съдържимо, 3 – пустула и 3 назофарингиални секрети. Използвани са молекулярно генетични методи за доказване на G2R (TNF рецепторен ген) регион от генома на MPXV.

**РЕЗУЛТАТИ:** При проучените три случая на MPXV, вирусна ДНК е доказана при 6 взети първични проби, от които 3 проби от везикуларно съдържимо, 1 пустула и 2 носогърлени секрета. Заболелите лица са в добро клинично състояние и поставени под медицинско наблюдение.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Въпреки, познатата епидемиология и клиника на MPXV, необичайното разпространение на вируса след м. май 2022 год., сезира Световната

здравна организация към по-задълбочено проучване на генетиката на вируса и степента на неговата мутагенност. Опасността от трайно разпространение на MPXV в различни региони на света, класифицирани като неендемични, води до необходимостта от засилено епидемиологично и лабораторно наблюдение на инфекцията, особено сред определени рискови групи от населението.

**Ключови думи:** MPXV, real time PCR, ДНК

## LABORATORY DETECTION OF FIRST CASES OF MONKEYPOX VIRUS IN BULGARIA

St. Krumova<sup>1</sup>, R. Stefanova<sup>1</sup>, R. Mihailova<sup>2</sup>, T. Tcherveniakova<sup>3</sup>, L. Nikolaeva-Glomb<sup>1</sup>, I. Christova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria

<sup>3</sup>University Hospital for Infectious and Parasitic Diseases "Prof. Iv. Kirov", Sofia, Bulgaria

### Abstract

Human monkeypox virus (MPXV) is a doublestranded DNA virus of the *Orthopoxvirus* genus of the *Poxviridae* family. Two genetic MPXV clades have been characterised: West African and Central African. Human monkeypox virus (MPXV) is a doublestranded DNA virus of the *Orthopoxvirus* genus of the *Poxviridae* family. Two genetic MPXV clades have been characterised: West African and Central African. Since May 2022, an outbreak of MPXV has been registered in non-endemic countries, and by June 29, 2022, the total number of reported cases in the European region was 4178. The most affected countries are the United Kingdom, Germany, Spain and Portugal.

**AIM:** To optimize the protocols for viral detection and to laboratory study of all possible cases of MPXV in the country, in order to prevent endemic spread of the virus.

**MATERIAL AND METHODS:** By June 30, 2022, three cases of MPXV were laboratory confirmed in Bulgaria. The infected were men aged 29, 41 and 44, who are defined as men who have sex with men (MSM). The tested clinical materials were: 3 samples of vesicle contents, 3 - pustules and 3 nasal swabs. Molecular genetic methods to detection of G2R (TNF receptor gene) region of the MPXV genome were used.

**RESULTS:** In the three cases of MPXV studied, viral DNA was detected in six primary samples taken, of which three samples of vesicle contents, one pustule and two nasal swabs. The patients were in good clinical condition and placed under medical supervision.

**CONCLUSION:** Despite the well-known epidemiology and clinic of MPXV, the unusual spread of the virus after May 2022, referred the World Health Organization to a more in-depth study of viral genome and its mutation. The risk of persistent spread of MPXV in different regions of the world, classified as non-endemic, leads to the need for enhanced epidemiological and laboratory monitoring of the infection, especially among certain risk groups of the population.

**Keywords:** MPXV, real time PCR, DNA

## СЕСИЯ VII: ИНФЕКЦИИ, ПРИЧИНЯВАНИ ОТ ХРАНИ И ВОДИ

### ДИАГНОСТИЧНИ ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА ПРИ ИНФЕКЦИИ С НЕПОЛИОМИЕЛИТНИ ЕНТЕРОВИРУСИ

Любомира Николаева-Гломб<sup>1</sup>, Ирина Георгиева<sup>1</sup>, Ася Стоянова<sup>1</sup>, Стефка Крумова<sup>1</sup>, Радостина Стефанова<sup>1</sup>, Иван Балтаджиев<sup>2</sup>, Милена Панайотова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София

<sup>2</sup>УМБАЛ “Св. Георги”, Пловдив, <sup>3</sup>РЗИ-Пловдив

#### РЕЗЮМЕ

Неполиомиелитните ентеровируси са повсеместно разпространени причинители на широка гама от клинични синдроми и инфекциозни заболявания у човека, вариращи по тежест от безсимптомно носителство до тежко инвалидизиращи и дори смъртоносни болести. Една от честите клинични прояви на ентеровирусната инфекция е болестта ръка-крак-уста, която понякога, особено при по-големи деца и възрастни индивиди, може да доведе до диференциално диагностични затруднения.

**ЦЕЛ:** Представяне на клиничен случай на болестта ръка-крак-уста, първоначално диагностициран като маймунска вариола.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ:** През месец юли 2022 г. в лабораторията постъпват материали от пustuли на две деца, брат и сестра, съответно на 6 и 16 г., хоспитализирани със съмнение за маймунска вариола.

**РЕЗУЛТАТИ:** Проведено е молекулярно биологично изследване чрез *real-time PCR*, което не открива вируса на маймунската вариола и първоначалната диагноза се отхвърля. Макуло-папуло-везикулозният характер на обрива, както и възрастта на пациентите, насочва към суспектна ентеровирусна инфекция с проява на болестта ръка-крак-уста. Във взетите в последствие фекални проби чрез *real-time RT-PCR* се доказва наличие на ентеровирусна РНК. Поради относително по-късното вземане на пробите изолирането в клетъчни култури на жизнеспособни неполиомиелитни ентеровируси е неуспешно. Независимо от това, доказването на ентеровирусна РНК във фецеса на пациентите, наред с характерната клинична картина и наблюденията макуло-папуло-везикулозен обрив потвърждават болестта ръка-крак-уста с етиологичен причинител неполиомиелитен ентеровирус.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Регистрираното след месец май 2022 г. разпространение на вируса на маймунската вариола в неендемични региони фокусира вниманието в тази посока и по-тривиални инфекции, протичащи с обривен синдром, могат да останат етиологично недиагностицирани и съответно епидемиологично неконтролирани, ако техните причинители не се търсят активно.

**Ключови думи:** неполиомиелитни ентеровируси, обрив, ръка-крак-уста

### DIAGNOSTIC CHALLENGES IN INFECTIONS WITH NON-POLIOMYELITIS ENTEROVIRUSES

Lubomira Nikolaeva-Glomb<sup>1</sup>, Irina Georgieva<sup>1</sup>, Asya Stoyanova<sup>1</sup>, Stefka Krumova<sup>1</sup>, Radostina Stefanova<sup>1</sup>, Ivan Baltadzhiev<sup>2</sup>, Milena Panayotova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>National Center for Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia

<sup>2</sup>UMBAL St. Georgi, Plovdiv, <sup>3</sup>RHI-Plovdiv

## SUMMARY

Non-polio enteroviruses are ubiquitous pathogens causing a number of clinical syndromes and infectious diseases in humans, ranging in severity from asymptomatic infections to severely debilitating and even fatal diseases. One of the frequent clinical manifestations of the enterovirus infection is hand-foot-mouth disease, which sometimes, especially in elder children and adults, can provoke differential diagnostic challenges.

**OBJECTIVE:** To present a clinical case of hand-foot-mouth disease initially diagnosed as monkeypox.

**MATERIAL AND METHODS:** In July 2022, clinical specimens from pustules of two children, a brother and a sister, aged 6 and 16, respectively, who had been hospitalized with suspected monkey pox were received in the laboratory.

**RESULTS:** A molecular biological study by real-time PCR was performed, which did not detect monkey pox virus, and the initial diagnosis was rejected. The maculo-papulo-vesicular nature of the rash, as well as the age of the patients, suspected an enterovirus infection with the manifestation of hand-foot-mouth disease. The presence of enterovirus RNA was detected by real-time RT-PCR in the subsequently received fecal samples. Because of the relatively late sampling, isolation of viable non-polio enteroviruses in cell cultures was unsuccessful. Nevertheless, the detection of enterovirus RNA in the patients' feces, along with the characteristic clinical presentation and the observed maculo-papulo-vesicular rash, confirmed hand-foot-mouth disease caused by a non-polio enterovirus.

**CONCLUSION:** The spread of monkey pox virus following May 2022 in non-endemic regions focused the attention in this direction, and more trivial infections occurring with a rash syndrome could remain etiologically undiagnosed and, accordingly, epidemiologically uncontrolled, if their causative agents were not actively sought.

**Keywords:** non-polio enteroviruses, rash, hand-foot-mouth

## АНАЛИЗ НА МИКРОБИОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА НА КОЛИЕНТЕРИТИ В БЪЛГАРИЯ. КЪДЕ ГРЕШИМ?

Мария Павлова<sup>1</sup>, Екатерина Александрова<sup>1</sup>, Валери Веле<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести, София

<sup>2</sup>СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“, София, Медицински университет- София

**Въведение.** За последното десетилетие се отчита попада в микробиологичната диагностика на колиентерити в България, като при възрастни лица тя е силно занижена. Ранната диагностика и профилактика на бактериални черни инфекции се negliжи а , а напоследък липсва в редица области в страната. Що се касае за откриване на шига - токсин продуциращи *Escherichia coli* и доказване на Хемолитично-уремичен синдром (ХУС), дължащ се на O157:N7 *E. coli*, диагностиката е рядко прилагана и в някои случаи погрешно интерпретирана. **Материали и методи** . Задачата на нас е да анализираме резултатите за последните пет години (2017 -2021г) от изследване на изолирането на диарогени *E. coli* (DEC), изпратено в НРЛ по Червни инфекции,

патогенни коки и дифтерии от микробиологични лаборатории в страната за потвърждаване на бактериалната диагноза, и да оценим качеството на микробиологичната диагностика на колиентерити в България. **Резултати и обсъждане**. Обърнете оценките значителни разлики в прилаганите микробиологични методи и ниво на компетентност на лабораториите. Като най-честата грешка отбелязваме неправилната идентификация на DEC с Род *Citrobacter sp.*, както и лактозо-отрицателните *E. coli* са погрешно идентифицирани като Род *Shigella sp.* Значително се следи в диференцирането на различни подходящи групи на DEC. Прилагането на различни по качество комплексни анти-коли серуми демонстрира неточна диагностика, епидемиологично маркиране и пропускане в откриването на значими за страната на серотипа *E. coli*. Не на последното място микробиологична диагностика на O157 и доказване на шига-токсина експресията на шига-токсините в нормалната серотипа DEC е критично за страната с ниските нива на успеваемостта и липсата на прилагане в повечето лаборатории. **Заключение**. За да се използва качествена микробиологична диагностика при колентерити и превенция от епидемични взривове в страната, трябва бързо да се изготви и унифицира актуални инструктивни материали, съобразени с международни утвърдени протоколи. **Благодарности**. Това проучване е финансирано от проект към ФНИ № КР 06-М43/2, Ноември 2020.

**Ключови думи:** колиентерит, микробиологична диагностика.

## ANALYSIS OF THE MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF *E. COLI* ENTERITIS IN BULGARIA. WHERE ARE WE WRONG?

Maria Pavlova<sup>1</sup>, Ekaterina Alexandrova<sup>1</sup>, Valeri Velev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Center for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

<sup>2</sup>SBALIPB "Prof. Iv. Kirov", Sofia, Medical University - Sofia

**Introduction.** For the last decade there has been a decline in the microbiological diagnosis of *E. coli* enteritis in Bulgaria, and in adults it is greatly reduced. Early diagnosis and prevention of bacterial intestinal infections is neglected, and has recently been lacking in a number of areas in the country. As for the detection of shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and proving Haemolytic uraemic syndrome (HUS) due to O157: H7 *E. coli*, has been rarely diagnosed and in most cases misinterpreted. **Materials and methods.** The task of our study is to analyze the results for the last five years (2017 -2021) of the examination of diarrhoeagenic *E. coli* isolates (DEC) sent to the NRL for Intestinal infections, pathogenic cocci and diphtheria from microbiological laboratories in the country to confirm the bacterial diagnosis, and to evaluate the quality of the microbiological diagnosis of *E. coli* enteritis in Bulgaria. **Results and discussion.** The summarized results show significant differences in the applied microbiological methods and the level of competence of the laboratories. As the most common mistake we note the incorrect identification of DEC with the genus *Citrobacter*, as well as lactose-negative *E. coli* are incorrectly identified as genus *Shigella*. A significant difference is observed in the differentiation of the different pathogenic groups of DEC. The use of different quality complex anti-*E. coli* sera demonstrates inaccurate diagnosis,

epidemiological typing and omissions in the detection of significant for the country serotype *E. coli*. Last but not least, the microbiological diagnosis of O157: H7 and proving the expression of STEC serotypes is critical for the country with low success rates and lack of application in most laboratories. **Conclusion.** In order to achieve quality microbiological diagnostics of *E. coli* enteritis and prevention of epidemic outbreaks in the country, it is urgent to prepare and unify up-to-date instructional materials in accordance with internationally approved protocols. **Acknowledgements.** *This work is funded by the Research Fund, Ministry of Education, Bulgaria. Project № KP 06-M43/2, Noe 2020.*

**Keywords:** *E. coli* enteritis, microbiological diagnosis.

## СЕРОТИПИРАНЕ НА ЩАМОВЕ *SALMONELLA* ENTERITIS ЧРЕЗ ЦЕЛОГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНЕ И СОФТУЕЪРА *SISTR*

*Владимир Толчков, Екатерина Александрова, Мария Павлова*

*Отдел Микробиология, Национален център по заразни и паразитни болести, София*

**Ключови думи:** *Salmonella* Enteritis, целогеномно секвениране, серотипиране

**Увод:** *Salmonella* Enteritis е причинител на хранителни инфекции. Описани са около 3000 серовара в световен мащаб. Салмонелните серотипове са пряко свързани с нивото на тяхната патогенност и заразност. Серотипирането в това проучване е извършено както чрез фенотипен метод, така и с използването на целогеномно секвениране. Последно време целогеномния анализ на човешки изолати на *S. Enteritis* показва че чрез него серотипирането на микроорганизмите може да бъде извършено прецизно, като за целта са създадени редица видове софтуер.

**Целта** на нашето проучване бе бъде приложено целогеномно секвениране за серотипиране на серотипирани преди това фенотипно български щамове *S. Enteritis*, да се определи серотипа на генетично ниво, да се сравнят данните от фенотипното проучване с данните за същите щамове с използване на секвенатор от следващо поколение тип Illumina.

**Материали и методи:** Секвенирани са целогеномно 12 щама *S. Enteritis* от три различни взрива, предизвикани от храни през 2018 година. Резултатите от секвенирането са получени под форма на FASTQ файлове, които бяха сканирани за всички известни днес антигени използвани за серотипирането на *S. Enteritis* чрез използването софтуерния инструмент *SISTR* (*salmonella in silico typing resource*).

**Резултат:** Серогрупите на 12 български щама *S. Enteritis* от колекцията на Националната референтна лаборатория по Чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия бяха определени фенотипно и чрез целогеномно секвениране и представени в настоящия доклад.

**Заклучение:** Бионформатичния анализ дава прецизна информация за всички антигени описани при *S. Enteritis* и притежава не-малка чувствителност от стандартния фенотипен тест.

**Благодарности:** Настоящото проучване е финансирано от Европейския фонд за регионално развитие чрез оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж 2014-2020 по договор BG05M2OP001-1.002-0001-C04.



## SEROTYPING OF SALMONELLA ENTERITIS STRAINS BY WHOLE GENOME SEQUENCING AND SISTR SOFTWARE

*Vladimir Tolchkov, Ekaterina Aleksandrova, Maria Pavlova*

*Department of Microbiology, National Center of Infectious Diseases, Sofia, Bulgaria*

**Keywords:** *Salmonella* Enteritis, whole genome sequencing, serotyping

**Introduction:** *Salmonella* Enteritis is a causative agent of food-borne infections. Around 3000 serovars are described in the world. The serotyping is related to the level of pathogeny and contagiousness. Serotyping in this study was performed using both phenotypic methods and whole genome sequencing<sup>1</sup>. Recently whole genome sequencing analysis of *S. Enteritis* human isolates demonstrated that serotyping can be accurately performed. Software tools were developed for serotyping of microorganisms.

The **aim** of our study was to perform whole genome sequencing on phenotypically serotyped Bulgarian *S. Enteritis* strains, to determine the serotype on the genetic level and to compare data with previous phenotypic determined serotypes of the same strains using Illumina next-generation sequencer.

**Materials and Methods:** We sequenced whole genomes of 12 *S. Enteritis* Bulgarian strains from three different food-borne outbreaks in 2018. FASTQ files were the output of sequencers. They were analyzed for all antigens used today in the *S. Enteritis* serotyping with help of the software tool predictor SISTR (*salmonella in silico typing resource*).

**Result:** Serogroups of 12 Bulgarian *Salmonella* Enteritis strains from the collection of National Referent Laboratory of Enteric Infections, Pathogenic Cocci and Diphtheria were determined both phenotypic and with whole genome sequencing and presented in this report.

**Conclusion:** Bioinformatics assays give detailed information about all antigens present in *S. Enteritis* and have no less sensitivity than standard phenotypic tests.

**Acknowledgement:** This research was funded by European Fund for Regional Development through the Operational Program Science and Education for Smart Growth 2014 to 2020, grant no. BG05M2OP001-1.002-0001-C04.

## АНТИ-SALMONELLA ПОТЕНЦИАЛ НА ЛАКТОБАЦИЛИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ КЪРМА, ВАГИНАЛНИ СЕКРЕТИ И МЛЕЧНИ ПРОДУКТИ

*Миглена Копринарова<sup>2,3</sup>, Лили Добрева<sup>1</sup>, Василена Георгиева<sup>2</sup>, Савина Георгиева<sup>1</sup>, И. Христова<sup>3</sup>, И. Трифонова<sup>3</sup>, Т. Гладнишка<sup>3</sup>, В. Иванова<sup>3</sup>, Е. Панайотова<sup>3</sup>, Е. Тасева<sup>3</sup> и Светла Данова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Българска академия на науките, София, България, ул. „Акад. Г. Бончев“ Българска академия на науките, София, България

<sup>2</sup>Институт по молекулярна биология „Румен Цанев“, Българска академия на науките, София, България, +359 888 346 104

<sup>3</sup>Национален център по заразни и паразитни болести, Национална референтна лаборатория по векторни инфекции, бул. Янко Сакъзов 26, София, България

**ЦЕЛ:** В това проучване 45 български щамове *Lactobacillus* от човешки и млечен произход и 4 мултибактериални формули, като прототип на пробиотични продукти, бяха оценени за антагонистична активност срещу *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар Typhimurium.

**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:** За антимикробните *in vitro* тестове беше използван дифузионен метод в агарови ямки в различни моделни системи – мляко, соево мляко, среда на De Man Rogose Sharp (MRS). Използван беше и *in situ* анализ на инхибиране на *S. Typhimurium* от предварително подбрани активни щамове *Lactobacillus*, съвместно култивирани със *Salmonella*.

**РЕЗУЛТАТИ:** Най-висока антагонистична активност се наблюдаваше при безклетъчни супернатанти на експоненциални MRS култури на щамовете, изолирани от кърма, следвани от лактобацили от бяло саламурено и зелено сирене. Откритата антимикробна активност срещу патогена беше щам-специфична и зависеше от условията на култивиране. Бактериоциногенният щам *Ligilactobacillus salivarius* намаляваше броя на живите патогенни клетки при съвместното им култивиране в пълномаслено мляко. Инхибирането беше значително само при предоминантно, спрямо патогена, инокулиране с *L. salivarius*. При инокулиране с еднакъв брой патогенни и млечнокиселите бактерии се наблюдаваше свръхрастеж на *S. Typhimurium*. Осем лактобацила в комбинация като мултибактериална култура проявиха синергичен антагонистичен ефект срещу *Salmonella*.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Получените резултати показаха, че лактобацили, изолирани от кърма, вагинални секрети и млечни продукти, са обещаващи анти-салмонелни агенти *in vitro* и *in situ*.

**Ключови думи:** *Lactobacillus* spp., *Salmonella*, антимикробна активност

**БЛАГОДАРНОСТИ:** Благодарност към Национален фонд „Научни изследвания“, България за финансовата подкрепа чрез научноизследователски проект KP-06-OPR 03/16.

#### ANTI-SALMONELLA POTENTIAL OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM BREAST MILK, VAGINAL SWABS AND DAIRY PRODUCTS

Miglena Koprinarova<sup>2,3</sup>, Lili Dobрева<sup>1</sup>, Vasilena Georgieva<sup>2</sup>, Savina Georgieva<sup>1</sup>, I. Christova<sup>3</sup>, I. Trifonova<sup>3</sup>, T. Gladnishka<sup>3</sup>, V. Ivanova<sup>3</sup>, E. Panayotova<sup>3</sup>, E. Taseva<sup>3</sup> and Svetla Danova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, 26, Acad. G. Bontchev str. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology “Roumen Tsanev”, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, +359 888 346 104

<sup>3</sup>National Center of Infectious and Parasitic Diseases, National Reference Vector-borne infections Laboratory, 26 Yanko Sakazov blvd., Sofia, Bulgaria

**AIM:** In this study 45 Bulgarian *Lactobacillus* strains of human and dairy origin, and 4 multibacterial formulas, as a prototype of probiotic products, were assessed for antagonistic activity against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium.

**MATERIALS AND METHODS:** An agar well diffusion method was used for antimicrobial *in vitro* tests performed in different model systems - milk, soymilk, De Man Rogose Sharp (MRS) medium. *In situ* assay for inhibition of *S. Typhimurium* from pre-selected active *Lactobacillus* strains co-cultivated with *Salmonella* was also used.

**RESULTS:** The highest antagonistic activity was observed with cell-free supernatants of exponential MRS broth cultures of the strains isolated from breast milk, followed by lactobacilli from white brined and green cheese. The detected antimicrobial activity against the pathogen was strain-specific and depended on the cultural conditions. A bacteriocinogenic *Ligilactobacillus salivarius* strain reduced the number of living pathogenic cells during co-cultivation in whole milk. The inhibition was significant only when the *L. salivarius* was inoculated in predominance. In case of underrepresented LAB number, *S. Typhimurium* over-growth was observed. Eight lactobacilli in combination as a multi-bacterial co-culture expressed synergic antagonistic effect against *Salmonella*.

**CONCLUSION:** The results received showed that lactobacilli isolated from different origins are promising anti-*Salmonella* agents *in vitro* and *in situ*.

**Keywords:** *Lactobaccillus spp.*, *Salmonella*, antimicrobial activity

**ACKNOWLEDGEMENTS:** Gratitude to the National Science Fund, Bulgaria for supporting this work by research grant KP-06-OPR 03/16.

## СЕСИЯ VIII: ВЕКТОРНО-ПРЕДАВАНИ ИНФЕКЦИИ

### МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА КЪРЛЕЖИ СЪБРАНИ ОТ ПТИЦИ

Н. Миткова<sup>1</sup>, И. Трифонова<sup>1</sup>, И. Христова<sup>1</sup>, Д. Димитров<sup>2</sup>, М.П. Маринов<sup>2</sup>, Е. Панайотова<sup>1</sup>, Е. Тасева<sup>1</sup>, Т. Гладнишка<sup>1</sup>, В. Иванова<sup>1</sup>, Г. Каменов<sup>1</sup>, П. Зехтинджиев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести

<sup>2</sup>Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН

**Въведение:** Птиците играят важна роля в поддържането на ензоотичния цикъл на векторно-предавани инфекции при хората. При своите прелети те са способни да разпространяват кръвосмучещи членестоноги и патогенни микроорганизми на значителни разстояния.

**Цел** на настоящата работа е да представи текущите резултати от проучване върху ролята на птиците като резервоари на Лаймска болест, на базата на изследвания на кърлежи свалени от птици.

**Материали и методи:** Уловът на птици беше проведен в град София и Биологична експериментална база „Калимок (обл. Силистра) между септември 2021 – юни 2022 г. При лабораторното изследване за *Borrelia burgdorferi* s.l., кърлежите предварително бяха разпределени в отделни пулове. Извършено беше хомогенизиране за една минута с цирконинови перли в хомогенизатор BeadBug. ДНК беше екстрахирана с готов кит за екстракция DNeasy blood & tissue. За детекция на ДНК на *B. burgdorferi* s.l. беше проведен nested PCR за амплификация. Ампликоните бяха визуализирани чрез агарозна гел-електрофореза.

**Резултати и обсъждане:** Общо 204 птици бяха уловени от двете места. Опаразитени с *Ixodes ricinus* бяха 24 птици с общо 101 кърлежа. Инфектирани кърлежи носеха 38% (9/24) от птиците. Заразеност се установи при 10% (10/101) от кърлежите, включително и при ларви. Откриването на *B. burgdorferi* s.l. при ларвите дава основание да се счита, че те са се заразили от птиците.

**Ключови думи:** птици, кърлежи, борелии

Благодарности: Това проучване е финансирано от ФНИ по проект КП-06-Н33/16/21.12.2019

### MOLECULAR – GENETIC TESTING OF TICKS COLLECTED FROM BIRDS

Mitkova N<sup>1</sup>, Trifonova I<sup>1</sup>, Christova I<sup>1</sup>, Dimitrov D<sup>2</sup>, Marinov M P<sup>2</sup>, Panayotova E<sup>1</sup>, Taseva E<sup>1</sup>, Gladnishka T<sup>1</sup>, Ivanova V<sup>1</sup>, Kamenov G<sup>1</sup>, Zehtindjiev P<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

<sup>2</sup>Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Sofia

**Introduction:** Birds play an important role in the maintenance of enzootic cycles of vector-borne infections in humans. Due to their mobility, they are capable of spreading blood-sucking arthropods and pathogens over long distances.

The **aim** of this work is to present current results from investigation of birds as reservoirs of Lyme disease by laboratory testing of ixodid ticks removed from birds.

**Materials and methods:** Birds were caught in Sofia and Biological Experimental Station Kalimok (Silistra region) between September 2021 and June 2022. During the testing for *Borrelia burgdorferi* s.l. the ticks were separated in pools. They were homogenized for one min by zirconium pearls in homogenizer BeadBug. DNA from tick samples was extracted using a commercially available kit DNeasy blood & tissue. To detect DNA of *B. burgdorferi* s.l. a nested PCR was conducted. Amplicons were visualized by agarose-electrophoresis.

**Results and discussion:** A total of 204 bird individuals were caught and examined for ticks at two sites. Twenty-four birds carried *Ixodes ricinus* (n=101) and 9 of 24 birds had infected ticks. Overall, 10% (10/101) of ticks were found infected, including larvae. Positive finding of *B. burgdorferi* in larvae give basis to think that some of bird species can infect the vector *I. ricinus*.

**Keywords:** birds, ticks, borreliae

Acknowledgement: This work is supported by research grant КП-06-Н33/16/ 21.12.2019, Bulgarian National Science Fund

## ГРАЖДАНСКАТА НАУКА И РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА АЗИАТСКИЯ ТИГРОВ КОМАР *Aedes albopictus* В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2021 Г.

Огнян Миков

Национален център по заразни и паразитни болести, София

**Цел:** Азиатският тигров комар *Aedes albopictus* е инвазивен вид, установен за пръв път в България през 2011 г. в област Бургас. Между 2012 и 2019 г. е установен в 23 области на страната, като се очаква ареалът му да се разширява.

**Материали и методи:** От юни до октомври 2021 г. в изпълнение на дейностите, заложили в програмата на проект КП-06-Н41/5 към ФНИ на тема „Биологични и молекулярно-генетични проучвания върху инсектицидната резистентност на местни и инвазивни видове комари“, са проведени полеви проучвания за събиране на материал от вида във всички области на страната. Уловът е провеждан с капани за яйцеснасяне, посредством които се установяват яйца, снесени от женските на *Ae. albopictus*. Общо 879 сбора на субстратите за яйцеснасяне са проведени в 31 локации на 28 области. От 149 от капаните са събрани ларви, които са отгледани до имаго в лабораторни условия. Възрастните комари са определяни видово по морфологични белези.

Освен тях, от май до ноември 2021 г. през платформата за гражданска наука Mosquito Alert бяха получени общо 119 доклада със снимки на комари от 19 области. Всички доклади са валидирани от по три ентомологични експерта.

**Резултати:** Присъствието на *Ae. albopictus* се потвърждава в областите Благоевград, Бургас, Варна, Велико Търново, Видин, Враца, Габрово, Добрич, Кърджали, Ловеч, Монтана, Пазарджик, Плевен, Пловдив, Разград, Русе, Силистра Сливен, Стара Загора, Търговище, Хасково, Шумен и Ямбол. За пръв път се установява в областите София и София (столица), като за втората това се постига чрез платформата Mosquito Alert. В областите Кюстендил, Перник и Смолян тигровият комар не е установен.

В областите, в които е разпространен, *Ae. albopictus* е установяван в селища с надморска височина между 10 и 560 м. Присъствието му в различни части на България

предполага разпространение както от една област в съседните ѝ, така и многобройни, независими една от друга точки на внос.

**Ключови думи:** *Aedes albopictus*, разширение на ареала, България

## **CITIZEN SCIENCE AND THE SPREAD OF THE ASIAN TIGER MOSQUITO *Aedes albopictus* IN BULGARIA IN 2021**

Ognyan Mikov

National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

**Aim:** The Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* is an invasive species found for the first time in Bulgaria in 2011 in Burgas region. Between 2012 and 2018, it has established in 21 regions of the country, and its range is expected to expand.

**Materials and methods:** From June to October in 2018, by implementing the activities planned in research plan of FSR project KP-06-N41/5 titled “Biological and molecular genetic studies on insecticidal resistance of native and invasive mosquito species”, field studies to collect samples of the species were conducted in all regions of the country. The sampling was performed by ovitraps used to detect eggs laid by the females of *Ae. albopictus*. A total of 879 oviposition substrates were collected from 31 locations in 28 regions. Mosquito larvae collected from 149 ovitraps were raised to adults under laboratory conditions. Adult mosquitoes were identified morphologically.

Moreover, a total of 119 mosquito photo reports from 19 regions were received from May to November 2021 through the Mosquito Alert citizen science platform. All reports were validated by three entomological experts.

**Results:** The establishment of *Ae. albopictus* was confirmed in the regions of Blagoevgrad, Burgas, Varna, Veliko Tarnovo, Vidin, Vratsa, Gabrovo, Dobrich, Lovech, Kardzhali, Montana, Pazardzhik, Pleven, Plovdiv, Razgrad, Ruse, Silistra, Sliven, Stara Zagora, Targovishte, Haskovo, Shumen and Yambol. For the first time it was detected in the regions of Sofia and Sofia (stolitsa), for the latter being achieved through the Mosquito Alert platform. In the regions of Kyustendil, Pernik and Smolyan, the Asian tiger mosquito was not found.

In areas where it was present, *Ae. albopictus* was found in settlements with an altitude between 10 and 560 metres above sea level. Its presence in different parts of Bulgaria suggests both distribution from one region to the neighbouring ones, and numerous independent introductions from different points of entry.

**Keywords:** *Aedes albopictus*, expansion, Bulgaria

## **ПАРАЗИТНИТЕ БОЛЕСТИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2021 Г.**

И. Райнова, Р. Харизанов, Н. Цветкова, Р. Борисова, Е. Кънева, А. Иванова, И. Кафтанджиев, О. Миков, М. Виденова

Отдел „Паразитология и тропическа медицина”

Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София

През 2021 г. въпреки пандемията от Ковид-19, честото затваряне на училища, детски градини и ясли броят на изследваните както и диагностицираните с паразитози, се запазват в сравнително високи стойности, а нивата на заболяемостта при повечето групи паразитни болести остават в границите от 2019 г. **Цел** на настоящата работа е преглед и оценка на динамиката на паразитните болести в България през 2021 г. Като материали са използвани данните от годишните отчети на паразитологичните структури от РЗИ, ЛЗ, МУ и НЦЗПБ. Общо през 2021 г. са изследвани над 596659 лица, от които диагностицирани с различни паразитози са 1.46% от посочените в отчетните форми. Регистрираните 89 случая на **кистна ехинококоза** са най-ниският брой от 80-те години на 20 век. Заболяемостта от **трихинелоза** е 0,37‰ от съобщени общо 3 епидемични взрива в три области на страната. При **геохелминтозите (аскаридоза и трихоцефалоза)** заболяемостта е съответно 7.38‰ и 0.85‰. Опаразитеността от **ентеробиоза**, засягаща предимно деца от организирани детски колективи през 2021 г. е 1.5% при изследвани 365905 лица. Вносна **малария** е регистрирана при 9 лица при изследвани общо 4571 суспектни за това заболяване.

Анализът на данните показва, че през 2021 г. значително се понижава броят на регистрирани случаи на кистна ехинококоза. Но въпреки забавянето на изследванията за чревни паразити в детските заведения поради пандемията от Ковид-19, не се наблюдава снижаване на контактните паразитози като ентеробиоза и гиардиаза.

**Ключови думи:** паразитози, заболяемост, зоонози

Адрес за кореспонденция: проф. д-р Райнова, НЦЗПБ, София 1504, бул. „Янко Сакъзов“ 26; Тел.: 02 8438002

## PARASITIC DISEASES IN BULGARIA IN 2021

*I. Rainova, R. Harizanov N. Tsvetkova, R. Borisova, E. Kaneva, A. Ivanova, I. Kaftandjiev O. Mikov, M. Videnova*

*Department of Parasitology and Tropical Medicine  
National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia*

In 2021, despite the Kovid-19 pandemic, frequent closures of schools, kindergartens and nurseries, the number of those surveyed and diagnosed with parasitoses remains relatively high, and morbidity levels in most groups of parasitic diseases remain within 2019. The **aim** of this report is to review and assess the dynamics of parasitic diseases in Bulgaria in 2021. Annual reports from parasitological structures in private diagnostic laboratories, Regional Health Inspections (RHI), Medical Universities (MU) and NCIPD were used as materials. In total, in 2021 more than 596659 persons were examined, of which 1.46% of those diagnosed with various parasitoses were indicated in the reporting forms. The 89 reported cases of **cystic echinococcosis** are the lowest number since the 1980s. The morbidity of **trichinellosis** is 0.37‰ of a total of 3 outbreaks reported in three districts of the country. In **soil transmitted** parasitoses (ascariasis and trichuriasis) the incidence is 7.38‰ and 0.85‰ respectively. The infestation of **enterobiasis**, affecting mainly children from organized children's groups in 2021 is 1.5% of 365,905 people surveyed. Imported **malaria** was registered in 9 people in a total of 4571 suspects for this disease.

The analysis of the data shows that in 2021 the number of registered cases of cystic echinococcosis will significantly decrease. However, despite the delay in testing for intestinal

*20 Национален Конгрес по Клинична микробиология и инфекции, Пловдив, Аудиторен комплекс, МУ, 16.09.-18.09.2022 г.*

parasites in childcare facilities due to the Kovid-19 pandemic, there has been no reduction in communicable diseases such as enterobiasis and giardiasis.



## **СЕСИЯ IX: ИНФЕКЦИИ, СВЪРЗАНИ С МЕДИЦИНСКОТО ОБСЛУЖВАНЕ И ИНФЕКЦИИ. ЗООАНТРОПОНОЗИ С ЕПИДЕМИЧЕН РИСК**

### **ВЪЗНИКВАЩИ ПРИЧИНИТЕЛИ НА ИНФЕКЦИИ, ИДЕНТИФИЦИРАНИ С MALDI-TOF**

*Е. Кьоляян, Ц. Механджйска, В. Кукова, В. Гиздова, М. Гачева, А. Александрова*

*УМБАЛ „Лозенец“, София*

Цел. Основна задача на проучването е анализ на идентифицираните с MALDI-tof нови, възникващи, по-редки или екзотични микроорганизми и причинените от тях инфекции, за периода септември 2021 – юни 2022 г.

Материали/Методи. С въвеждане на микробната протеомна идентификация с MALDI-tof, Brucker, De, притежаващ богата микробна библиотека, съдържаща хиляди микробни видове, възможностите за прецизна бактериална идентификация нарастнаха значително. Обект на проучването станаха няколко новоидентифицирани микроорганизми, дали повод за литературно проучване и интерпретация на ролята им при конкретните пациенти.

Резултати. За проучвания 10-месечен период от разнообразни клинични материали (рани, урокултури, ставна течност, простатен експримат, хемокултура, храчка, вагинален секрет) на хоспитализирани пациенти бяха изолирани и идентифицирани няколко по-малко познати вида: *Actinotignum sanguinis*, *Actinotignum schlaalii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arthrobacter cummingsii*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Cupriavidus gelardii*, *Dolosigranulum pigrum*, *Facklamia hominis*, *Globicatella sanguinis*, *Helcococcus kunzei*, *Paenibacillus urinalis*, *Raoutella planticola*, *Streptomyces lavendulae*. Някои от тях изискваха по-продължително култивиране, микроаерофилна атмосфера и по-специфични тестове и интерпретация за антибиотичната им чувствителност.

Заклучение. Въвеждането в микробиологичната диагностика на MALDI-tof е революционно нововедение, позволяващо не само бърза диагноза, но и значително обогатяващо спектъра на микробните причинители и възможностите за овладяване на инфекциите, предизвикани от тях.

**Ключови думи:** MALDI-tof, възникващи причинители, спектър на инфекциите

### **EMERGING AGENTS OF INFECTION IDENTIFIED BY MALDI-TOF**

*E. Keuleyan, Tz. Mehandjiyska, V. Kukova, V. Gizdova, M. Gatcheva, A. Alexandrova*

*UMBAL “Lozenetz”, Sofia*

Aim. Basic task of the study is the analysis of the newly, emerging, more rare or exotic microorganisms, identified by MALDI-tof, during the period September 2021 – June 2022.

Materials/Methods. With introduction of microbial proteomic identification by MALDI-tof, Brucker, De, owing rich microbial library of thousands of microbial species, possibilities for precise microbiological identification increased significantly. Object of the study became

several newly identified microorganisms, that gave rise to literature search and interpretation of their role in the concrete patients.

Results. During the 10-month study period from diverse clinical specimens (wound, urine culture, joint fluid, prostate secret, blood culture, sputum, vaginal secret) from hospitalized patients several less known species were isolated and identified: *Actinotignum sanguinis*, *Actinotignum schlaalii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arthrobacter cumminsii*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Cupriavidus gelardii*, *Dolosigranulum pigrum*, *Facklamia hominis*, *Globicatella sanguinis*, *Helcoccus kunzei*, *Paenibacillus urinalis*, *Raoutella planticola*, *Streptomyces lavendulae*. Some of them required a longer cultivation, microaerophile atmosphere and more specific tests, as well as interpretation for their antimicrobial susceptibility.

Conclusion. Introducing MALDI-tof in microbiological diagnostic is a revolution innovation, allowing not only rapid diagnosis, but also significantly enriching the spectrum of antimicrobial pathogens and the opportunities for management of infection caused by them.

**Keywords:** MALDI-tof, emerging pathogens, spectrum of infection

## ЦИТОКИНОВ ПРОФИЛ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТЪР БАКТЕРИАЛЕН МЕНИНГИТ

Й. Калчев<sup>1,2,6</sup>, П. Аргирова<sup>3,4</sup>, И. Боев<sup>3</sup>, Н. Ватев<sup>5</sup>, М. Стойчева<sup>3,4</sup>, М. Мурджева<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Катедра по медицинска микробиология „проф. д-р Елисей Янев“, Фармацевтичен факултет, Медицински университет – Пловдив, България;

<sup>2</sup>Лаборатория по микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив, България;

<sup>3</sup>Катедра по инфекциозни болести и тропическа медицина, Медицински факултет, Медицински университет – Пловдив, България;

<sup>4</sup>Клиника по инфекциозни болести, УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив, България;

<sup>5</sup>Катедра по епидемиология и медицина на бедствените ситуации, Медицински университет – Пловдив, България;

<sup>6</sup>Научноизследователски институт на Медицински университет – Пловдив

**Въведение:** Бактериалният менингит е животозастрашаващо заболяване, с висока смъртност и често с дълготрайни неврологични усложнения. Възпалителната реакция в субарахноидното пространство, модулирана от различни цитокини, играе водеща роля в патогенезата на острите инфекции на централната нервна система.

**Цел:** Да се изследват корелациите на серумните и ликворни концентрации на цитокините IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p40) и TNF-α с тежестта, усложненията и изхода от заболяването.

**Материал и Методи:** В проучването бяха включени 30 пациента с остър бактериален менингит/менингоенцефалит за период от 3 г. Лицата се селектираха на база на клиничния преглед и лабораторните промени. За микробиологичната диагноза се използва рахикултивиране и мултиплексен PCR. Допълнително чрез ELISA се определиха нивата на изследваните цитокини едновременно в серум и ликвор. Използва се U-теста на Mann-Whitney, като за статистически значими се приеха стойности  $p < 0.05$ .

**Резултати:** При пациенти с остър бактериален менингит всички тествани цитокини показваха по-високи нива в ликвор спрямо серум. Концентрацията на ликворния протеин корелира с ликворния IL-12 (p40), а глюкозата в ликвор корелира с ликворния IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , както и серумния IL-6. Установи се, че повишените нива на IL-10 в ликвор ( $U = 60$ ;  $p = 0.033$ ) и IL-8 ( $U = 54$ ;  $p = 0.019$ ) в серум се свързват с по-тежкото клинично протичане. Серумният IL-8 корелира едновременно с по-тежко протичане и фатален край. Серумният IL-6 също е значително увеличен при пациентите с фатален изход. По този начин, тези биомаркери може да се използват за отграничаването на пациенти в повишен риск и неблагоприятна прогноза.

**Ключови думи:** бактериален менингит, цитокини, ликвор

### CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH ACUTE BACTERIAL MENINGITIS

Y. Kalchev<sup>1,2,6</sup>, P. Argirova<sup>3,4</sup>, I. Boev<sup>3</sup>, N. Vatev<sup>5</sup>, M. Stoycheva<sup>3,4</sup>, M. Murdjeva<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology “Prof. Elisey Yanev”, Faculty of Pharmacy, Medical University – Plovdiv, Bulgaria

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, University Hospital St. George – Plovdiv, Bulgaria

<sup>3</sup>Department of Infectious Diseases and Parasitology, Faculty of Medicine, Medical University – Plovdiv, Bulgaria

<sup>4</sup>Clinic of Infectious Diseases, University Hospital St. George – Plovdiv, Bulgaria

<sup>5</sup>Department of Epidemiology and Disaster Medicine, Faculty of Public Health, Medical University - Plovdiv, Bulgaria

<sup>6</sup>Research Institute at Medical University – Plovdiv, Bulgaria

**Background:** Bacterial meningitis is a life-threatening disease with high mortality and common long-term neurological sequelae. The inflammatory response in the subarachnoid space, modulated by different cytokines, plays a major role in the pathogenesis of acute central nervous system infections.

**Objectives:** This study aimed to examine correlations of both serum and cerebrospinal fluid IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), and TNF- $\alpha$  level with disease severity, complications, and outcome.

**Material and Methods:** The study involved 30 patients with acute bacterial meningitis/meningoencephalitis over a period of 3 years. Patients were selected based on clinical examination and laboratory abnormalities. The microbiological diagnosis included CSF culture and multiplex PCR. Further analyses were based on ELISA for simultaneous evaluation of the studied cytokines in both CSF and serum of the patients during the acute stage of the disease. Mann-Whitney U test was used, considering  $p < 0.05$  statistically significant.

**Results:** In patients with acute bacterial meningitis CSF levels of all cytokines were higher when compared to serum. CSF protein levels correlated with IL-12 (p40) in CSF, and CSF glucose concentrations correlated with CSF IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , and serum IL-6. It was

found that increased CSF IL-10 ( $U = 60$ ;  $p = 0.033$ ) and serum IL-8 ( $U = 54$ ;  $p = 0.019$ ) were related to more severe clinical condition. Serum IL-8 correlates both with diseases severe and fatal outcomes. Serum IL-6 is also significantly increased in patients with fatal outcome. Therefore, these biomarkers can serve as prognostic factors delineating patients at increased risk for poor prognosis.

**Keywords:** bacterial meningitis, cytokines, cerebrospinal fluid

## РИСКЪТ ОТ БИОТЕРОРИЗЪМ И ПРОБЛЕМИ НА СИГУРНОСТТА

*Галин Каменов, Живка Гецова, Николай Богданов*

*Национален център по заразни и паразитни болести*

Биологичната атака от терористи или умишлено използване на инфекциозни причинители от национални структури все още се разглеждат като нереалистична заплаха. Днес, в условията на водена война на Европейския континент тази представа се сменя бързо. В условията на ескалиране може да се стигне до използване на оръжия за масово поражение, а биологичното оръжие поради евтиното и просто производство е потенциален кандидат номер едно, със способност да предизвика тежки епидемии и дори пандемии. Рискът става още по-голям от близостта ни с държави с развита терористична мрежа.

Предварителната подготовка за отговор може да смекчи или предотврати тежки последствия от биологична атака за населението. Националната сигурност при развитие с умишлено използване на биологични агенти ще зависи именно от успеха на подготовката срещу използване на биологично оръжие.

В настоящия доклад се оценява реалният риск от употребата на биологични агенти на основа на историческа хронология и тежестта на последствията от използване на биологично оръжие. Разглеждат се основните потенциални патогени, които могат да се използват като инструмент за биологична атака. Дава се оценка на най-вероятните микроорганизми, които могат да се използват. Обсъждат се типове биологични атаки и потенциалните сценарии за използване на биологично оръжие и съответните последствия.

Разглеждат се принципните възможности на общественото здраве за отговор на терористична опасност като епидемиологичен надзор, ранно диагностично откриване, използване на изолация, карантина и други нефармацевтични мерки, укрепване на лечебната мрежа, осигуряване на запас от антибиотици и ефективни ваксини, планиране и обучение на специалисти и осигуряване на риск комуникация. Подчертава се ролята на НЦЗПБ в цялостния процес на подготовка на отговор.

Обсъждат се възможностите за подобряване на планирането и отговора у нас, възможностите за оптимизиране на надзора, включително и с нови технологии, подобряване на диагностичния капацитет, осигуряване запас от антибиотици и ефективни ваксини и предварително планиране на риск комуникацията с населението.

**Ключови думи:** биотероризъм, биологично оръжие

## **RISK OF BIOTERRORISM AND PROBLEMS OF SECURITY**

*Galin Kamenov, Zhivka Getsova, Nikolai Bogdanov*

*National Centre of Infectious and Parasitic Diseases*

The odds of a biological attack by terrorists or deliberate use of infectious agents by national structures are still seen as an unrealistic threat. Today, in the context of a war on the European continent, this notion is changing rapidly. In the conditions of escalation, weapons of mass destruction can be used, and biological weapons, due to their cheap and simple production, are a potential candidate number one, with the ability to cause severe epidemics and even pandemics. The risk becomes even greater from our proximity to countries with a developed terrorist network.

Preliminary preparation for a response can mitigate or prevent severe consequences of a biological attack on the population. National security in the event of deliberate use of biological agents will depend on the success of training against the use of biological weapons.

This report measures the real risk of use of biological agents on the basis of historical chronology and the severity of the consequences of the use of biological weapons. The main potential pathogens that can be used as a tool for biological attack are considered. An assessment of the most likely micro-organisms that can be used is given. The types of biological attacks and potential scenarios for the use of biological weapons and the corresponding consequences are discussed.

Main possibilities of public health to respond to a terrorist threat such as epidemiological surveillance, early diagnostic detection, use of isolation, quarantine and other non-pharmaceutical measures, strengthening the treatment network, providing a stock of antibiotics and effective vaccines, planning and training of specialists and ensuring risk communication are reviewed. The role of the NCIPD in the overall process of preparing a response is emphasized.

Possibilities for improving planning and response in our country are considered, tools for optimizing the surveillance, including with new technologies, improving the diagnostic capacity, providing a stock of antibiotics and effective vaccines and preliminary planning of risk communication with the population are discussed.

**Key words: bioterrorism, biological weapons**

## **ЗДРАВЕОПАЗВАНЕ И НАЦИОНАЛНА СИГУРНОСТ – ОБЩИ ПРОБЛЕМИ ПО ВРЕМЕ НА ПАНДЕМИЯТА ОТ COVID-19**

*Ж. Гецова<sup>1</sup>, Н. Богданов<sup>1</sup>, Н. Владимирова<sup>1</sup>, И. Попиванов<sup>2</sup>, Д. Димов<sup>2</sup>, А. Галев<sup>2</sup>, Д. Шаламанов<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни дейности,

<sup>2</sup>Военномедицинска академия

Подобряването на здравните грижи изисква вникване в същността на социалните процеси – урбанизация, дигитализация и други, свързани с промени в обществото. Във връзка с това, за да се подобри здравното обслужване и медицинското осигуряване, е

необходимо осъвременяване на разбирането за здравна сигурност. За целта то трябва да се адаптира пропорционално на промените във външната среда и начина на живот. Докладът използва наблюденията и опита от пандемичната ситуация през 2020-2022 г., за да отчете основните проблеми пред здравната система в най-натоварените моменти и причините, довели до тяхната поява. Високата заболяемост и смъртност по време на вълните от COVID-19 се разглеждат в контекста на националната сигурност на Република България. Оценява се ефективността на предприетите мерки за противодействие на отчетените проблеми и гарантиране на сигурността. Наред със заплахите, причинени от различни по мащаб и същност дефицити – човешки или логистични, се дискутират възможностите за подобряване на готовността на база на придобития опит. Обсъждат се достойнствата и недостатъците на разработения от държавата Национален план за готовност при пандемия. Обособени са основните насоки на военномедицинското осигуряване в тази област. В заключение докладът предлага препоръки за подобряване на наличната система за защита на националната сигурност.

**Ключови думи:** национална сигурност, COVID-19, заплахи, заболяемост, смъртност, Национален план за готовност при пандемия

## HEALTHCARE AND NATIONAL SECURITY - COMMON PROBLEMS DURING THE COVID-19 PANDEMIC

Z. Getsova<sup>1</sup>, N. Bogdanov<sup>1</sup>, N. Vladimirova<sup>1</sup>, I. Popivanov<sup>2</sup>, D. Dimov<sup>2</sup>, A. Galev<sup>2</sup>, D. Shalamanov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>National Centre of Infectious and Parasitic Diseases,

<sup>2</sup>Military Medical Academy

Improving health care requires insight into the nature of social processes - urbanization, digitalization and others related to changes in society. In this context, in order to improve health services and medical support, it is necessary to update the understanding of health security. To this end, it must be adapted in proportion to changes in the external environment and the lifestyle.

The report uses observations and experience from the pandemic situation from 2020-2022 to take into account the main problems the health system faces in the busiest moments and the reasons that led to their occurrence. High morbidity and mortality during the COVID-19 waves are interpreted in the context of national security of the Republic of Bulgaria. The effectiveness of the measures taken to address the reported problems and ensure security is assessed. Along with the threats caused by deficits of different scale and nature - human or logistical, the possibilities for improving preparedness based on the experience gained are discussed. The advantages and disadvantages of the National Plan for Pandemic Preparedness developed by the state are reviewed. The main directions of medical support to military formations in this area are highlighted.

In conclusion, the report offers recommendations for improving the existing system of national security protection.

**Keywords:** national security, COVID-19, threats, incidence rate, death rate, National Plan for Pandemic Preparedness