



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

---

## СЕМИНАР „ФУНДАМЕНТАЛНИ, ТРАНСЛИРАЩИ И КЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ В ОБЛАСТТА НА ИНФЕКЦИИТЕ И ИНФЕКЦИОЗНАТА ИМУНОЛОГИЯ“

**Пловдив, 16.09–18.09.2022 г.**  
**Аудиторен комплекс, Медицински университет-Пловдив**

**СЕМИНАРЪТ Е ЧАСТ ОТ НАУЧНАТА ПРОГРАМА НА XX ЮБИЛЕЕН  
НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС  
ПО КЛИНИЧНА МИКРОБИОЛОГИЯ И ИНФЕКЦИИ**

*Семинарът се реализира по проект № BG05M2OP001-1.002-0001 „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“, ОП НОИР  
БЛ*



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## Съдържание

<b>ПОСТЕРНА СЕСИЯ I.....</b>	<b>8</b>
КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА КО-ИНФЕКЦИИТЕ НА SARS-COV-2 С ДРУГИ РЕСПИРАТОРНИ ПАТОГЕНИ.....	8
CLINICAL SIGNIFICANCE OF SARS-COV-2 COINFECTIONS WITH OTHER RESPIRATORY PATHOGENS.....	9
ОЦЕНКА НА ИМУННАТА ПАМЕТ СЛЕД ВАКСИНАЦИЯ СРЕЩУ SARS-CoV-2: ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ.....	10
EVALUATION OF IMMUNE MEMORY AFTER VACCINATION AGAINST SARS-CoV-2: A PILOT STUDY .....	11
КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНО ПРЕДСТАВЯНЕ И БОЛНИЧНА СМЪРТНОСТ ПРИ ХОСПИТАЛИЗИРАНИ ПАЦИЕНТИ $\geq 60$ ГОДИНИ С COVID-19 .....	12
CLINICAL - LABORATORY PRESENTATION AND IN-HOSPITAL MORTALITY IN HOSPITALIZED PATIENTS AGED $\geq 60$ YEARS WITH COVID-19.....	12
СРАВНИТЕЛНО ПРОУЧВАНЕ НА ДВА ГАМАИНТЕРФЕРОН-БАЗИРАНИ ТЕСТА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СПЕЦИФИЧЕН Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР ПРИ ТУБЕРКУЛОЗА: ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ.....	13
COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO GAMMA INTERFERON-BASED TESTS TO EVALUATE A SPECIFIC T-CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN TUBERCULOSIS: A PILOT STUDY .....	14
ИНФЕКЦИИ НА РЕСПИРАТОРНИЯ ТРАКТ И ТУБЕРКУЛОЗА. КРИЗА, МИГРАЦИЯ, ТУБЕРКУЛОЗА.....	14
RESPIRATORY INFECTIONS AND TUBERCULOSIS. CRISIS, MIGRATION, TUBERCULOSIS .....	15
ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА НЕТУБЕРКУЛОЗНИ МИКОБАКТЕРИИ В БЪЛГАРИЯ ЧРЕЗ MALDI-TOF MS .....	16
IDENTIFICATION OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN BULGARIA BY MALDI-TOF MS .....	17
РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ ВАНКОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНИ ЕНТЕРОКОКИ И РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ НА ХЕМОДИАЛИЗА .....	18
PREVALENCE OF INTESTINAL VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI AND RISK FACTORS FOR COLONIZATION IN PATIENTS UNDERGOING HEMODYALYSIS .....	19



ИЗПИТВАНЕ НА АНТИБИОТИЧНАТА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ ЧРЕЗ HB&L UROQUATTRO АПАРАТ НА БАКТЕРИАЛНИ ИЗОЛАТИ, АСОЦИИРАНИ С УРОИНФЕКЦИИ В АМБУЛАТОРНИ ПАЦИЕНТИ .....	19
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING BY HB&L UROQUATTRO OF MOST FREQUENTLY ISOLATED PATHOGENS, ASSOCIATED WITH URINARY TRACT INFECTIONS IN AMBULATORY PATIENTS .....	20
ЛАБОРАТОРНО-ДИАГНОСТИЧЕН СКРИНИНГ И КЛИНИЧНА ЗНАЧИМОСТ НА <i>COXIELLA BURNETII</i> ИНФЕКЦИЯТА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ЕНДОКАРДИТ И МИОКАРДИТ В ПЕРИОДА НА COVID-19 ПАНДЕМИЯТА.....	21
LABORATORY-DIAGNOSTIC SCREENING AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF <i>COXIELLA BURNETII</i> INFECTION IN PATIENTS WITH ENDOCARDITIS AND MYOCARDITIS DURING THE COVID-19 PANDEMIC .....	23
СРАВНИТЕЛНА ОЦЕНКА НА ЕФЕКТИВНОСТТА НА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИТЕ И МОРФОЛОГИЧНИ АНАЛИЗИ В ДИАГНОСТИКАТА НА ПНЕВМОЦИСТОЗАТА.....	24
COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF PCR ASSAYS AND OPTICAL MICROSCOPY FOR THE DIAGNOSIS OF <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECHII</i> PNEUMONIA.....	25
КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА МИГРИРАЩА КОЖНА ЛАРВА ПРИ ЗАВЪРНАЛ СЕ ОТ ТРОПИЧЕСКА СТРАНА ПАЦИЕНТ .....	26
CLINICAL CASE OF CUTANEOUS LARVA MIGRANS IN A PATIENT RETURNED FROM A TROPICAL COUNTRY .....	27
ФИЛОГЕНЕТИЧНИ ТРАНСМИСИОННИ КЛЪСТЕРИ НА HIV-1 СУБТИП В, С И CRF01_AE В БЪЛГАРИЯ .....	27
PHYLOGENETIC TRANSMISSION CLUSTERS OF HIV-1 SUBTYPE B, C AND CRF01_AE IN BULGARIA.....	29
СВОБОДНИТЕ КИСЛОРОДНИ РАДИКАЛИ (ROS) В CD4+ И CD8+ Т-КЛЕТКИ КАТО ПОТЕНЦИАЛЕН БИОМАРКЕР ЗА МОНИТОРИНГ НА HIV ИНФЕКЦИЯ .....	30
THE REACTIVE OXIGEN SPECIES (ROS) IN CD4+ AND CD8+ T-CELLS AS A POTENTIAL BIOMARKER FOR MONITORING OF HIV INFECTION.....	31
КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА ХРОНИЧЕН ЕНДОМЕТРИТ И ПОВТАРЯЩИ СЕ СПОНТАННИ АБОРТИ.....	32
CLINICAL CASE REPORT: CHRONIC ENDOMETRITIS AND RECURRENT PREGNANCYLOSS.....	33
<b>ПОСТЕРНА СЕСИЯ II .....</b>	<b>34</b>



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

ПРОУЧВАНЕ УРЕТРАЛНИЯ МИКРОБИОМ С ANDROFLOR® SCREEN ПРИ МЪЖЕ С НЕСПЕЦИФИЧНА ГЕНИТАЛНА СИМПТОМАТИКА В УСЛОВИЯ НА COVID-19 ПАНДЕМИЯ .....	34
STUDY OF THE URETHRAL MICROBIOME WITH ANDROFLOR® SCREEN IN MEN WITH NONSPECIFIC GENITAL SYMPTOMS IN A COVID-19 PANDEMIC .....	35
ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ СПЕЦИФИЧНИТЕ ТИПОВЕ АНТИТЕЛА, ВИРУСНИЯ ТОВАР И ПРОЯВАТА НА РАЗЛИЧНИ СИМПТОМИ В ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕЖЕСТТА НА COVID-19.....	36
A STUDY ON SPECIFIC ANTIBODY TYPES, VIRAL LOAD AND THE MANIFESTATION OF DIFFERENT SYMPTOMS DEPENDING ON THE SEVERITY OF COVID-19 .....	37
СЕРОЕПИДЕМИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА НАЛИЧИЕ НА ЗАЩИТЕН ИМУНИТЕТ СРЕЩУ ПАРОТИТЕН ВИРУС ПРИ ДЕЦА В БЪЛГАРИЯ .....	38
SERO-EPIDEMIC STUDY FOR THE PRESENCE OF PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST MUMPS VIRUS IN CHILDREN IN BULGARIA .....	39
ГП.17 KAWASAKI ОТНОВО ПРИЧИНИТЕЛ НА ЕПИДЕМИЧЕН ВЗРИВ У НАС .....	40
ГП.17 KAWASAKI AGAIN CAUSES AN EPIDEMIC OUTBREAK.....	41
ЧОВЕШКИ ЕНТЕРОВИРУС – СЛУЧАЙНА НАХОДКА ИЛИ ПРИЧИНИТЕЛ НА ЗАБОЛЯВАНЕ: КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ.....	41
HUMAN ENTEROVIRUS – AN ACCIDENTAL FINDING OR THE CAUSATIVE AGENT: A CLINICAL CASE.....	42
МАРКЕРИ ЗА ХЕПАТИТ Е ВИРУС И ДРУГИ ХЕПАТИТНИ КОИНФЕКЦИИ ПРИ ХЕМОДИАЛИЗНИ ПАЦИЕНТИ.....	43
MARKERS OF HEPATITIS E VIRUS AND OTHER HEPATITIS COINFECTIONS IN HEMODIALYSIS PATIENTS .....	45
ОЦЕНКА НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА АНТИТЕЛА СРЕЩУ ХЕПАТИТ Е В СБОРНИ ПЛАЗМИ – НАЧАЛНО ПРОУЧВАНЕ И ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА .....	46
ASSESSMENT OF PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST HEPATITIS E VIRUS IN PLASMAS – PILOT RESEARCH AND LITRETURE REVIEW .....	47
ВЛИЯНИЕ НА СЛЮНЧЕНАТА КОЛОНИЗАЦИЯ НА <i>S. AREUS</i> ПРИ ТЕЖКИ АСТМАТИЦИ .....	48
INFLUENCE OF SALIVARY <i>S. AREUS</i> COLONIZATION IN SEVERE ASTHMATICS .....	49
ПРОБЛЕМЪТ <i>V.VULNIFICUS</i> В АКВАТОРИЯТА НА БЪЛГАРСКОТО ЧЕРНОМОРИЕ .	49
THE <i>V.VULNIFICUS</i> PROBLEM IN WATERS FROM THE BULGARIAN BLACK SEA COAST.....	50



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

<b>ПОСТЕРНА СЕСИЯ III.....</b>	<b>52</b>
РАЗРАБОТВАНЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОД ЗА ГЕНЕТИЧНА ДЕТЕКЦИЯ НА <i>ENTEROBIUS VERMICULARIS</i> В ПРОБИ НА ПАЦИЕНТИ С ЕНТЕРОБИОЗА .....	52
DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A METHOD FOR GENETIC DETECTION OF <i>ENTEROBIUS VERMICULARIS</i> IN SAMPLES OF PATIENTS WITH ENTEROBIASIS .....	53
ЕНТЕРОБИОЗАТА В БЪЛГАРИЯ ЗА ПЕРИОДА 2017 – 2021 ГОДИНА .....	54
ENTEROBIASIS IN BULGARIA FOR THE PERIOD 2017 – 2021 .....	55
РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ПНЕВМОЦИСТОЗАТА СРЕД ЛИЦА С РАЗЛИЧЕН ИМУНЕН СТАТУС.....	56
COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF MICROSCOPIC METHODS IN THE DIAGNOSTIC APPROACHES IN PNEUMOCYSTOSIS .....	57
ЗАВИСИМОСТ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА В-KLOTНО И ДЕЛА НА CD27-CD57+ CD8+T КЛЕТКИ ПРИ ЗДРАВИ ЛИЦА .....	58
$\beta$ - KLOTNO INVERSELY CORRELATED WITH CD27-CD57+ CD8+T CELLS IN HEALTHY SUBJECTS .....	59
СЕРОПРЕВАЛИРАНЕ НА ЛАЙМСКА БОРЕЛИОЗА И ЗАПАДНО-НИЛСКА ТРЕСКА ПРИ ПТИЦИ.....	60
SEROPREVALENCE OF LYME DISEASE AND WEST NILE FEVER SPECIFIC ANTIBODIES AMONG BIRDS .....	61
ВИРУСЪТ НА КРИМСКАТА-КОНГО ХЕМОРАГИЧНА ТРЕСКА В КЪРЛЕЖИ <i>HYALOMMA AEGYPTIUM</i> , СВАЛЕНИ ОТ КОСТЕНУРКИ В БЪЛГАРИЯ .....	62
CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS IN <i>HYALOMMA AEGYPTIUM</i> TICKS, COLLECTED FROM TORTOISES IN BULGARIA.....	63
ДЕТЕКЦИЯ НА ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM С NESTED PCR В ГЛАДНИ КЪРЛЕЖИ, СЪБРАНИ ОТ РАЗЛИЧНИ ОБЛАСТИ НА БЪЛГАРИЯ .....	64
DETECTION OF ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM WITH NESTED PCR IN QUESTING TICKS, COLLECTED FROM DIFFERENT DISTRICTS OF BULGARIA .....	65
КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА ЛЕПТОСПИРОЗА, ПОТВЪРДЕН С PCR, С ФАТАЛЕН ИЗХОД .....	66
CLINICAL CASE OF LEPTOSPIROSIS CONFIRMED BY PCR WITH FATAL OUTPUT ...	67
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНО И ИМУНОЕНЗИМНО ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ХЕРПЕС ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ ПРИ ДЕЦА С НАРУШЕНИЯ НА ЦЕНТРАЛНАТА НЕРВНА СИСТЕМА (ЦНС) ЗА ПЕРИОДА ЯНУАРИ-ДЕКЕМВРИ 2021Г. ....	68



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

MOLECULAR-GENETIC AND IMMUNOENZYME RESEARCH ON THE PREVALENCE OF HERPES VIRAL INFECTIONS IN CHILDREN WITH CENTRAL NERVOUS SYSTEM (CNS) DISORDERS FOR THE PERIOD JANUARY-DECEMBER 2021 .....	69
СЪПОСТАВКА НА ДИАГНОСТИЧНИТЕ ВЪЗМОЖНОСТИ НА BIO FIRE, BIO-MERIEUX И РУТИННИТЕ КУЛТУРЕЛНИ МЕТОДИ ПРИ КРЪВНИ И КОСТНО-СТАВНИ ИНФЕКЦИИ.....	70
COMPARISON OF DIAGNOSTIC ABILITIES OF BIO FIRE, BIO-MERIEUX AND THE ROUTINE CULTURAL METHODS IN BLOOD AND BONE-JOINT INFECTIONS .....	71
РЕТРОСПЕКТИВЕН ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ЦЕЛОГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНИ ГЕНОМИ НА СЕДЕМ ИЗОЛАТА ОТ <i>BRUCELLA MELITENSIS</i> , ПОЛУЧЕНИ ОТ АВТОХТОННАТА ЕПИДЕМИЯТА НА БРУЦЕЛОЗА В БЪЛГАРИЯ ОТ 2015 Г. ....	72
RETROSPECTIVE WHOLE-GENOME SEQUENCING PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION OF SEVEN <i>BRUCELLA MELITENSIS</i> ISOLATES FROM THE 2015 BRUCellosis OUTBREAK IN BULGARIA .....	73
ДИНАМИЧЕН МОДЕЛ НА МИКРОБИОМНА ДИЗБИОЗА НА КРЪВТА ПРИ БЕЛОДРОБНА САРКОИДОЗА .....	74
A DYNAMIC MODEL OF BLOOD MICROBIOME DYSBIOSIS IN PULMONARY SARCOIDOSIS.....	75
МЕТОДОЛОГИЯ ЗА ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК И ТАРГЕТНО 16S И 18S МЕТАГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНЕ НА КРЪВНИ И БИОПСИЧНИ ПРОБИ ОТ ПАЦИЕНТИ СЪС САРКОИДОЗА.....	76
METHODOLOGY FOR DNA ISOLATION AND TARGETED 16S AND 18S METAGENOMIC SEQUENCING OF BLOOD AND BIOPSY SAMPLES FROM PATIENTS WITH SARCOIDOSIS .....	77
ОЦЕНКА НА КЛИНИЧНОТО И ИКОНОМИЧЕСКО ВЪЗДЕЙСТВИЕ НА МЕТОДИ ЗА БЪРЗА МИКРОБИОЛОГИЧНА ДИАГНОСТИКА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ИНФЕКЦИЯ НА КРЪВТА: АНАЛИЗ НА РАЗХОДИТЕ.....	78
EVALUATION OF THE CLINICAL AND ECONOMIC IMPACT OF METHODS FOR RAPID MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF BLOODSTREAM INFECTION: A COST ANALYSIS .....	79
БЪРЗА И НАВРЕМЕННА ДИАГНОСТИКА НА ПРОИЗВЕЖДАЩИ ВЕРОЦИТОТОКСИН <i>E. COLI</i> С КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ .....	79
RAPID AND TIMELY DIAGNOSIS OF CLINICALLY SIGNIFICANT VEROCYTOTOXIN <i>E. COLI</i> .....	80
МИКОТИЧНА ИНФЕКЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТКА НА ХРОНИЧНА ПЕРИТОНЕАЛНА ДИАЛИЗА .....	81



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

---

FUNGAL INFECTION IN PATIENT ON PERITONEAL DIALYSIS .....	82
НОКЪТНИ ПАТОГЕНИ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА .....	83
NAIL PATHOGENS IN THE CLINICAL PRACTICE.....	83
ТЕРЕННО ПРОУЧВАНЕ НА МИКРОБНАТА ВЪЗДУШНА КОНТАМИНАЦИЯ ПРИ ИЗПОЛЗВАНЕ НА UV СИСТЕМА В УЧИЛИЩНА КЛАСНА СТАЯ.....	84
FIELD STUDY OF MICROBIAL AIR CONTAMINATION USING AN UV SYSTEM IN A SCHOOL CLASSROOM. ....	85
ЕФЕКТИВНОСТ НА УРЕДИ ЗА ДЕЗИНФЕКЦИЯ НА ВЪЗДУХ С UVC ЛЪЧИ - ЛАБОРАТОРНИ ИЗПИТВАНИЯ 2020 - 2021 Г.....	85
EFFECTIVENESS OF DEVICES FOR UVC AIR DISINFECTION - LABORATORY TESTS 2020 - 2021.....	86





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## ПОСТЕРНА СЕСИЯ I

### КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА КО-ИНФЕКЦИИТЕ НА SARS-COV-2 С ДРУГИ РЕСПИРАТОРНИ ПАТОГЕНИ.

И. Маджарова<sup>1</sup>, И. Трифонова<sup>1</sup>, Св. Ангелова<sup>3</sup>, С. Волева<sup>2</sup>, В. Добринов<sup>1</sup>, Р. Йорданова<sup>2</sup>, Т. Червенякова<sup>2</sup>, Н. Корсун<sup>1</sup>, И. Христова<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 Киркович" АД, Стара Загора, България

**Въведение:** Това проучване имаше за цел да определи дела на ко-инфекциите на SARS CoV-2 с други респираторни вируси, съвместния профил на откриване на тези патогени както и епидемиологичните, лабораторните и клиничните характеристики на тези инфекции.

**Методи:** Бяха събрани и анализирани назофарингеални проби и клинични данни от 242 SARS-CoV-2 позитивни пациенти. Real-time PCR беше използван за детекция на SARS-CoV-2, грипни вируси, респираторно-синцитиален вирус (RSV), човешки метапневмовирус (HMPV), парагрипен вирус (PIV) 1,2,3, риновирус (RV), аденовирус (AdV), бокавируси (BoV) и сезонни коронавируси (OC43, 229E, NL63 и HKU1).

**Резултати:** От ноември 2020год. до средата на март 2022год. 242 позитивни пациенти за SARS-CoV-2 са били тествани за ко-инфекции с други респираторни вируси, от тях 221 са били хоспитализирани, а 21 са потърсили медицинска помощ в кабинети за спешна помощ. Идентифицирани бяха 24 (9,9%) случая на ко-инфекции с участието на SARS-CoV-2, съответно тяхното разпределение бе следното: HMPV (n = 6; 25%), RSV (n = 4; 16,7%), AdV (n = 4; 16,7%), BoV (n = 4; 16,7%), PIV3 (n = 2; 8,3%), грип А (H3N2) (n = 2; 8,3%), RV (n = 1; 4,62%) и RV + BoV (n = 1; 4,62%). Най-висок процент на ко-инфекции на SARS-CoV-2 беше доказан при деца на възраст 0-5 години (59%). От анализа на вирусния товар на двата ко-патогена беше установено, че вирусният товар на грипа е по-висок от този на SARS-CoV-2, а средният вирусен товар на SARS-CoV-2 е по-висок от този на други респираторни вируси. С-реактивният протеин (CRP) и броят на лимфоцитите при ко-инфектирани пациенти >65-годишна възраст бяха средно по-високи, отколкото при деца под 16-годишна възраст (средното ниво на CRP беше от  $161,8 \pm 133,1$  mg/l; среден брой на лимфоцити  $19,7 \pm 3,09\%$ , срещу  $6,9 \pm 8,9$  mg/l,  $0,9 \pm 3,1\%$ ) ( $p < 0,01$ ). Пациентите на възраст >65 години, ко-инфектирани със SARS-CoV-2 и други респираторни вируси, са имали по-дълъг болничен престой от тези на възраст <16 години (средно  $9 \pm 3,96$  дни срещу  $5,44 \pm 1,89$  дни) ( $p = 0,025$ ). Докладвани са двадесет и четири смъртни случая при пациенти с доказана SARS-CoV-2 инфекция, а смесена инфекция с AdV и SARS-CoV-2 е съобщена при един от починалите пациенти.

**Заключение:** При пациенти на възраст >65 год., имащи съпътстващи заболявания и едновременно с това са с доказана ко-инфекция на SARS CoV-2 с други респираторни вируси могат да доведат до влошаване на клиничната картина и усложнения, които да бъдат фатални за пациента.





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Ключови думи:** ко-инфекция, SARS-CoV-2, респираторен вирус.

## 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 ко-инфекции с други респираторни вируси”, № КП-06-DK1/7 /29.03.2021 г./ „Вирусен товар, цитокини и серумни нива на антитела в зависимост от клиничната тежест на COVID-19 инфекция“, 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“.

## CLINICAL SIGNIFICANCE OF SARS-COV-2 COINFECTIONS WITH OTHER RESPIRATORY PATHOGENS.

*I. Madzharova<sup>1</sup>, I. Trifonova<sup>1</sup>, S. Angelova<sup>3</sup>, S. Voleva<sup>2</sup>, V. Dobrinov<sup>1</sup>, R. Yordanova<sup>2</sup>, T. Tcherveniakova<sup>2</sup>, N. Korsun<sup>1</sup>, I. Christova<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 aimed to determine the proportion of SARS CoV-2 co-infections with other respiratory viruses, the joint detection profile of these pathogens, and the epidemiological, laboratory, and clinical characteristics of these infections.

**Methods:** Nasopharyngeal samples and clinical data of 242 SARS-CoV-2 positive patients were collected and analyzed. 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 seasonal coronaviruses (OC43, 229E, NL63, and HKU1). Viral load was determined by capillary electrophoresis.

**Results:** From November 2020 to mid-March 2022, 242 SARS-CoV-2 positive patients were tested for co-infections with other respiratory viruses, of which 221 were hospitalized and 21 sought medical attention in emergency rooms. 24 (9.9%) cases of coinfections involving SARS-CoV-2 were identified, respectively their distribution was as follows: HMPV (n = 6; 25%), RSV (n = 4; 16.7%), AdV (n = 4; 16.7%), BoV (n = 4; 16.7%), PIV3 (n = 2; 8.3%), influenza A (H3N2) (n = 2; 8.3%), RV (n = 1; 4.62%) and RV + BoV (n = 1; 4.62%). The highest rate of SARS-CoV-2 coinfections was found in children aged 0-5 years (59%). From the analysis of the viral load of both co-pathogens, it was found that the viral load of influenza is higher than that of SARS-CoV-2, and the average viral load of SARS-CoV-2 is higher than that of other respiratory viruses. C-reactive protein (CRP) and lymphocyte counts in co-infected patients > 65 years of age were on average higher than in children under 16 years of (mean CRP of  $161.8 \pm 133.1$  mg /l;  $19.7 \pm 3.09\%$  vs. mean  $6.9 \pm 8.9$  mg /l,  $38.0 \pm 3.1\%$ ) (p <0.01) (p <0.01). Patients > 65 years of age co-infected with SARS-CoV-2 and other respiratory viruses had a longer hospital stay than those <16 years of age



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

(mean  $9 \pm 3.96$  days vs.  $5.44 \pm 1.89$  days) ( $p = 0.025$ ). Twenty-four fatalities have been reported in patients with proven SARS-CoV-2 infection, and mixed AdV and SARS-CoV-2 infection has been reported in one of the deceased patients.

**Conclusion:** In patients aged  $>65$  years, coinfection with SARS CoV-2 and other respiratory viruses, together with concomitant diseases, causes worsening of the clinical picture and complications, and can be fatal.

**Keywords:** coinfection, SARS-CoV-2, respiratory virus.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by grants from the Ministry of Education and Science, Bulgaria: contracts КП-06-Н43/5 /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".

### ОЦЕНКА НА ИМУННАТА ПАМЕТ СЛЕД ВАКСИНАЦИЯ СРЕЩУ SARS-COV-2: ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ

М. Божкова<sup>1,2,3</sup>, С. Петров<sup>1,2</sup>, Т. Калфова<sup>1,2</sup>, Х. Тасков<sup>1,2,3</sup>, М. Мурджева<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup>Научно-изследователски институт, Медицински университет – Пловдив

<sup>3</sup>Лаборатория по Клинична имунология - УМБАЛ "Свети Георги" - Пловдив

**Цел:** Да се оцени имунната памет до една година след ваксинация срещу SARS-CoV-2.

**Материали и методи:** Проучването включва общо 113 напълно ваксинирани лица с иРНК ваксина срещу SARS-CoV-2, тествани през 3 периода: 2, 6 и 12 месеца след втората доза. IgG антителата срещу S1 RBD на SARS-CoV-2 бяха определени чрез VIDAS® SARS-CoV-2 IgG, а вирус-неутрализиращите антитела чрез SARS-CoV-2 sVNT кит на GenScript. Клетъчният имунитет беше оценен чрез T-Spot.COVID (Oxford Immunotec) и B-ELISpot (Mabtech).

**Резултати:** Нивата на IgG антитела намаляват със 70,4% през първите 6 месеца след ваксинацията от 489,1 до 144,7 BAU/ml ( $p < 0,001$ ) и след това до 12<sup>-ти</sup> месец понижаването е статистически незначимо - 126,6 BAU/ml ( $p > 0,05$ ). Понижаването на неутрализиращите антитела е с 16% между 2<sup>-ри</sup> и 6<sup>-ти</sup> месец след ваксинацията (от 82,7% до 69,4% инхибиране,  $p < 0,001$ ), а след това до една година промяната им е незначителна (62,8% инхибиране,  $p > 0,05$ ). Същата тенденция се наблюдава при Т-клетъчният имунитет. През първите 6 месеца броят на спотобразуващите клетки намалява с 52,5% (от 39,4 на 18,7 спота;  $p < 0,001$ ), а след това до 12<sup>-ти</sup> месец намалението е незначително (10,6 спота,  $p > 0,05$ ). Една година след ваксинация 5 индивида, с едва доловими IgG антитела, бяха тествани чрез B-Elispot, след 5



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

дни неспецифична стимулация на сепарирани В-лимфоцити с ИЛ-6 и R878. Във всички проби бяха открити специфични В-памятови клетки.

**Заключение:** Проучването показва, че специфичните параметри на имунния отговор срещу SARS-CoV-2 намаляват с времето. Въпреки това, памяти В-клетки могат да бъдат открити в циркулацията повече от година след ваксинация.

**Ключови думи:** SARS-CoV-2 ваксини, RBD IgG антитела, неутрализиращи антитела, Т-spot, В-ELISpot,

**За кореспонденция:** д-р Мартина Божкова, Медицински университет-Пловдив, бул. Васил Априлов 15А, 4002 Пловдив, тел. 0898721791, [dr.bozhkova@yahoo.com](mailto:dr.bozhkova@yahoo.com)

## EVALUATION OF IMMUNE MEMORY AFTER VACCINATION AGAINST SARS-COV-2: A PILOT STUDY

M. Bozhkova<sup>1,2,3</sup>, S. Petrov<sup>1,2</sup>, T. Kalfova<sup>1,2</sup>, H. Taskov<sup>1,2,3</sup>, M. Murdjeva<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology - "Prof. Dr. Elissay Yanev", Medical University - Plovdiv

<sup>2</sup>Research Institute, Medical University – Plovdiv

<sup>3</sup>Laboratory of Clinical immunology – University hospital "St. George" - Plovdiv

**Aim:** To evaluate the immune memory up to a year after vaccination against SARS-CoV-2.

**Materials and methods:** A total of 113 people, fully vaccinated with mRNA vaccines, were included in the study. All individuals were tested during 3 periods at 2, 6, and 12 months after second dose of the vaccine. IgG antibodies against S1 RBD of SARS-CoV-2 were detected by VIDAS® SARS-CoV-2 and virus-neutralizing antibodies by the SARS-CoV-2 sVNT kit of GenScript. Cellular immunity was determined by T-Spot.COVID (Oxford Immunotec) and B-ELISpot (Mabtech).

**Results:** IgG antibody levels decreased with 70.4% in the first 6 months after vaccination from 489.1 to 144.7 BAU/ml ( $p < 0.001$ ) and then decreased slightly until 12<sup>th</sup> month to 126.6 BAU/ml ( $p > 0.05$ ). The reduction in RBD neutralizing antibodies was by 16% between 2<sup>nd</sup> and 6<sup>th</sup> month after vaccination (from 82.7% to 69.4% inhibition,  $p < 0.001$ ), and then up to one year their change was insignificant (62.8% inhibition,  $p > 0.05$ ). The same tendency was observed in T-cell immunity. During the first 6 months, the number of spot-forming cells decreased with 52.5% (39.4 to 18.7 spots;  $p < 0.001$ ), and then until the 12<sup>th</sup> month, the reduction was insignificant (10.6 spots,  $p > 0.05$ ). One year post-vaccination 5 individuals, with barely detectible IgG antibodies, were tested by B-ELISpot after 5 days of non-specific stimulation of separated B-lymphocytes with ИЛ-6 and R878. In all samples, specific B-memory cells were detected.

**Conclusion:** The study showed that the specific parameters of the immune response against SARS-CoV-2 decrease over time. However, memory B-cells can be detected more than a year after vaccination.

**Keywords:** Humoral and cellular immunity, neutralizing antibodies, RBD IgG antibodies, Т-spot, В-Spot, SARS-CoV-2 vaccines



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНО ПРЕДСТАВЯНЕ И БОЛНИЧНА СМЪРТНОСТ ПРИ ХОСПИТАЛИЗИРАНИ ПАЦИЕНТИ $\geq 60$ ГОДИНИ С COVID-19

*Анелия Гоцева<sup>1</sup>, Методи Кунчев<sup>1</sup>, Лилия Грахльова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Лаборатория по Вирусология, Военномедицинска академия, София

<sup>2</sup>Лаборатория по цитогенетика и молекулярна биология, Военномедицинска академия, София

**Цел:** Настоящото проучване имаше за цел да опише клинично - лабораторния профил и болничната смъртност при хоспитализирани пациенти  $\geq 60$  години с COVID-19.

**Материал/методи:** Общо 132 пациенти на възраст  $\geq 60$  години, които са били приети във ВМА между 1 януари и 1 март 2021 г. с положителен резултат за SARS-CoV-2 са диагностицирани с TaqPath COVID-19 PCR тест (Thermo Fisher Scientific; САЩ). Всички данни на пациентите са получени от електронните медицински досиета.

**Резултати:** От 132 хоспитализирани пациенти  $\geq 60$  години, 75 са мъже и 57 са жени. 90% от тях ( $n = 119$ ) са имали едно или повече съпътстващи заболявания, като най - чести са артериалната хипертония, сърдечно-съдовите заболявания и диабета. Анализът показва, че 11 от по - възрастните пациенти (средна възраст 76,4 г.) са починали по време на хоспитализацията, а 121 пациенти са изписани. Водещите симптоми при постъпването в болница са отпадналост, треска, кашлица, задух и мигалгии. Основните лабораторни находки са лимфопения и повишени серумни нива на възпалителни биомаркери (ЛДХ, феритин, С-реактивен протеин).

**Заключение:** Идентифицирани са рисковите фактори, предсказващи неблагоприятни резултати. Напредналата възраст и съществуващите хронични заболявания могат да повлияят на клиничното представяне на COVID-19. В нашето проучване повечето от по - възрастните пациенти с COVID-19 имат високо ниво на коморбидност и по - тежко протичане на заболяването, като болничната смъртност е 8,3 %.

**Ключови думи:** COVID-19, хоспитализирани пациенти, болнична смъртност

## CLINICAL - LABORATORY PRESENTATION AND IN-HOSPITAL MORTALITY IN HOSPITALIZED PATIENTS AGED $\geq 60$ YEARS WITH COVID-19

*<sup>1</sup>Aneliya Gotseva, <sup>1</sup>Metodi Kunchev, <sup>2</sup>Liliya Grahlyova*

<sup>1</sup>Laboratory of Virology, Military Medical Academy, Sofia

<sup>2</sup>Laboratory of Cytogenetics and Molecular Biology, Military Medical Academy, Sofia

**Aim:** The present study aimed to describe the clinical – laboratory profile and in - hospital mortality in hospitalized patients  $\geq 60$  years with COVID-19.

**Material and methods:** Overall 132 patients aged  $\geq 60$  years, who were admitted in MMA between January 1st to March 1st, 2021 with a positive result for SARS-CoV-2 were diagnosed with TaqPath COVID- 19 PCR test (Thermo Fisher Scientific; USA). All data in patients were obtained from the electronic medical records.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Results:** Of the 132 hospitalized patients  $\geq 60$  years, 75 are males and 57 are females. 90% of them ( $n = 119$ ) had one or more chronic comorbidity, the most common being hypertension, cardiovascular disease and diabetes. The analysis shows that 11 of the older patients (median age 76.4) died during the hospitalisation and 121 were discharged. The leading symptoms at admission were weakness, fever, cough, shortness of breath and myalgia. Major laboratory findings were lymphopenia and increased serum levels of inflammatory biomarkers (LDH, Ferritin, CRP).

**Conclusion:** The risk factors predicting unfavourable outcomes have been identified. Advanced age and pre-existing chronic diseases may influence the clinical presentation of COVID-19. In our study majority of the older patients with COVID-19 had a high level of comorbidity more severe course of the disease, such as in-hospital mortality is 8.3 %.

**Keywords:** COVID-19, hospitalized patients, in-hospital mortality

## СРАВНИТЕЛНО ПРОУЧВАНЕ НА ДВА ГАМАИНТЕРФЕРОН-БАЗИРАНИ ТЕСТА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СПЕЦИФИЧЕН Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР ПРИ ТУБЕРКУЛОЗА: ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ

М. Божкова<sup>1,2,3</sup>, Т. Калфова<sup>1,2</sup>, С. Петров<sup>1,2</sup>, М. Мурджева<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup>Научно-изследователски институт, Медицински университет – Пловдив

<sup>3</sup>Лаборатория по Клинична имунология - УМБАЛ "Свети Георги" - Пловдив

**Цел:** Да се сравни чувствителността на два метода за установяване на специфичен Т-клетъчен имунен отговор при диагностика на туберкулоза.

**Материали и методи:** В проучването са включени общо 16 пациенти, съответно 9 жени и 7 мъже. Всички пациенти са изследвани паралелно чрез два гамаинтерферон-базирани теста – T-Spot.TB (Oxford Immunotec) и VIDAS® TB-IGRA (BioMerieux).

**Резултати:** Съвпадение на резултатите при използвани методи установихме в 75% от случаите ( $n=12$ ), съответно: 10 проби – отрицателни, 1 проба – положителна и 1 интермедиерна проба. При един от пациентите се установи граничен резултат чрез T-spot.TB, а чрез VIDAS® TB-IGRA – същият беше положителен, пациентът беше с анамнестични данни за плеврален излив. Три от пробите бяха отрицателни чрез T-Spot.TB, а чрез VIDAS® TB-IGRA – положителни. Един от пациентите беше с данни за пиоторакс, инкапсулат аксиларно и хистологична находка - фиброзни промени, оток и огнищна кръглоклетъчна възпалителна инфилтрация. За другите двама пациенти не е налична анамнестична информация.

**Заключение:** Между двата метода се установява умерено висок процент на съвпадение на резултатите. VIDAS® TB-IGRA се очертава с по-висока чувствителност от T-spot.TB на базата на предварителни анамнестични и клинични данни. Необходими са допълнителни изследвания за установяване на специфичността на VIDAS® TB-IGRA.

**Ключови думи:** T-Spot.TB, VIDAS® TB-IGRA, Туберкулоза





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**За кореспонденция:** д-р Мартина Божкова, Медицински университет-Пловдив, бул. Васил Априлов 15А, 4002 Пловдив, тел. 0898721791, [dr.bozhkova@yahoo.com](mailto:dr.bozhkova@yahoo.com)

## COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO GAMMA INTERFERON-BASED TESTS TO EVALUATE A SPECIFIC T-CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN TUBERCULOSIS: A PILOT STUDY

*M. Bozhkova<sup>1,2,3</sup>, T. Kalfova<sup>1,2</sup>, S. Petrov<sup>1,2</sup>, M. Murdjeva<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Medical Microbiology and Immunology - "Prof. Dr. Elissay Yanev", Medical University – Plovdiv*

<sup>2</sup>*Research Institute, Medical University – Plovdiv*

<sup>3</sup>*Laboratory of Clinical immunology – University Hospital "St. George" - Plovdiv*

**Aim:** To compare the sensitivity of two methods for specific T-cellular immune response in the diagnosis of tuberculosis.

**Materials and methods:** The study included 16 patients, 9 females and 7 males. All patients were examined in by two gamma-interferon-based tests - T-Spot.TB (Oxford Immunotec) and VIDAS® TB-IGRA (BioMerieux).

**Results:** Coincidence of the results in the two used methods was found in 75% of the cases (n = 12), respectively: 10 samples - negative, 1 sample - positive and 1 intermediate sample. In one of the patients a borderline result was established by T-spot.TB, and positive by VIDAS® TB-IGRA, the patient had anamnestic data for pleural effusion. Three of the samples were negative by T-Spot.TB and positive by VIDAS® TB-IGRA. One of the patients had evidence of pyothorax, axillary encapsulation, and histological finding - fibrosis, edema, and focal round-cellular inflammatory infiltration. No anamnestic information is available for the other two patients.

**Conclusion:** A moderately high correlation of results is found between the two methods. VIDAS® TB-IGRA appears to be more sensitive than T-spot.TB based on preliminary anamnestic and clinical data. Further studies are needed to determine the specificity of VIDAS® TB-IGRA.

**Keywords:** T-Spot.TB, VIDAS® TB-IGRA, Tuberculosis

## ИНФЕКЦИИ НА РЕСПИРАТОРНИЯ ТРАКТ И ТУБЕРКУЛОЗА. КРИЗА, МИГРАЦИЯ, ТУБЕРКУЛОЗА

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

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

**Ключови думи:** туберкулоза

**Цел.** Да се направи сравнителен анализ на заболяемостта от туберкулоза (ТБ) в Украйна и България, както и филогенетичния профил на *M.tuberculosis* в двете страни.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Материали и методи.** Използвали сме верифицирани епидемиологични данни, както и публикувани проучвания върху циркулиращите резистентни щамове в Украйна и България.

**Резултати.** Украйна е страна с висок приоритет, с 19 521 (44,6/ 100 000) регистрирани ТБ случаите за 2020г.; с високо бреме на рифампицин/мултирезистентна туберкулоза: 4177 случая (32,6%). В България ТБ случаите за същата година са били 930 (13,4/100 000), от тях 12 (5%) са били с рифампицинова резистентност. Резистентната туберкулоза в Украйна е свързана с щамове от линия 2 (Пекин) (50,3%), докато разпространението на този щам в България е оскъдно (3%).

**Заключение.** Войната в Украйна и бежанската криза представляват риск за контрола на туберкулозата в България.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## RESPIRATORY INFECTIONS AND TUBERCULOSIS. CRISIS, MIGRATION, TUBERCULOSIS

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

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

**Key words:** tuberculosis

**Aim.** To make a comparative analysis of the prevalence of tuberculosis (TB) and its phylogenetic profile in Ukraine and Bulgaria.

**Materials and methods.** We performed comparative analysis of verified epidemiological data and published researches on the resistant strains, circulating in the countries.

**Results.** Ukraine is a high priority country with 19,521 (44.6 / 100,000) notified TB cases in 2020; with high burden of RR / MDR-TB: 4177 cases (32.6%). The notified TB cases in Bulgaria for the same year were 930 (13.4/100 000), 12 of them (5%) were with rifampicin resistance. The resistant TB in Ukraine was associated with the lineage 2 (Beijing) clades (50.3%), while the distribution of this strains in Bulgaria was scarce (3%).

**Conclusion.** The war in Ukraine and the refugee crisis pose a risk to tuberculosis control in Bulgaria.

## ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА НЕТУБЕРКУЛОЗНИ МИКОБАКТЕРИИ В БЪЛГАРИЯ ЧРЕЗ MALDI-TOF MS

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

Национална референтна лаборатория по туберкулоза (НРЛ ТБ), НЦЗПБ

**Ключови думи:** нетуберкулозни микобактерии, MALDI-TOF MS

**Въведение:** За много от микроорганизмите чрез използването на MALDI-TOF MS е възможна идентификация в рамките на минути. Точното видово определяне на нетуберкулозните микобактерии (НТМ), чрез биохимични и генетични методи е трудно и времеемко. Прилагането на по-ефективни и бързи методи за идентификацията им с приложение в рутинната диагностика е от значение за навременно диагностициране и лечение на пациентите.

**Целта** на проучването е да се оценят различни методи за предварителна обработка на пробите с цел извличане на протеини за идентифициране на НТМ от твърда и течна среда при използване на MALDI-TOF MS. Сравнение на получените резултати с тези от молекулярна идентификация - GenType CM/AS, GenoType.

**Методи:** Клинични изолати на НТМ видове, са идентифицирани в НРЛ ТБ, НЦЗПБ чрез LPA. След култивиране на твърда и течна хранителна среда те се идентифицират и чрез MALDI-TOF MS, като за целта бактериалните протеини се извличат чрез на разрушаване на клетъчната стена чрез химични и механични методи.

**Резултати:** Щамовете са разпределени в две групи. В първата всички са култивирани на течна среда и добива на протеини е според препоръките на BRUKER. За втората група се използват исолати от твърда среда, а протокола за подготовката им е модифициран. 80% от НТМ видовете от втората група бяха надежно идентифицирани срещу 20% от първата.

**Заклучение:** При изолати на твърда хранителна среда, добивът на биомаса е по-голям с по-добра възможност за идентификация. Качеството на получените мас спектри и резултати от идентификация на културите обработени по оптимизирания протокол за извличане, са по-добри. Това е отразено от по-високите средни стойности на резултата (2.09 срещу <1.99).

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

Юлияна Атанасова, дм  
1233 София  
Бул. „Ген. Н. Столетов“ № 44 А  
Тел.: 02 944 64 45  
E-mail: tb\_nrl@abv.bg



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## IDENTIFICATION OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN BULGARIA BY MALDI-TOF MS

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

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

**Keywords:** non-tuberculous mycobacteria, MALDI-TOF MS.

**Introduction:** For many microorganisms, identification within minutes is possible using MALDI-TOF MS. Accurate species identification of nontuberculous mycobacteria (NTM) by biochemical and genetic methods is difficult and time consuming. Reliable application of more effective and rapid methods for their identification with application in routine practice is important for diagnosis and treatment of patients.

**Objective** of this study is to evaluate different methods of samples preparation in order to extract proteins for the identification of NTM from solid and liquid media for using MALDI-TOF MS and compare the results with those of molecular identification by GenType CM/AS, GenoType (Hain).

**Methods:** NTM clinical isolates on solid and liquid media (MGIT and Löwenstein – Jensen) were identified in NRL TB by LPA. They are also identified by MALDI-TOF MS. For this purpose, bacterial proteins are extracted by a procedure of cell wall destruction by chemical and mechanical methods.

**Results:** Strains are divided into groups. In the first all are cultured on a liquid medium and the protein yield is according to the recommendations of BRUKER. In the second group, they were grown on solid medium and a modified protocol was used for sample preparation. 80% of the NTM species from the second group were reliably identified against 20% of the first.

**Conclusions:** In solid media, the biomass yield is higher with better identification. The quality of the obtained mass spectra and the results of identification of the cultures processed according to the optimized extraction protocol are better. This is reflected in the higher score values (2.09 vs. <1.99).

**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.*

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



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ИНТЕСТИНАЛНИ ВАНКОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНИ ЕНТЕРОКОКИ И РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА КОЛОНИЗАЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ НА ХЕМОДИАЛИЗА

П. Христова<sup>1</sup>, Г. Тодорова<sup>2</sup>, Д. Георгиева<sup>1</sup>, Х. Хиткова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Катедра по Микробиология и Вирусология, Медицински университет - Плевен

<sup>2</sup>Катедра по Нефрология, Хематология и Гастроентерология, Медицински университет - Плевен

**Целта** на нашето проучване е да се определи честотата на интестинална колонизация с ванкомицин-резистентни ентерококи (VRE) и да се оценят рисковите фактори за нея при пациенти на хемодиализа.

### Материали и методи

Общо 97 пациенти на хемодиализа в УМБАЛ „Д-р. Г. Странски“-Плевен бяха скринирани за интестинални VRE. Протоколът за изолиране на VRE от фекални проби е описан преди в друго наше проучване. Ентерококовите изолати бяха идентифицирани с Vitek 2 Compact. МПК към девет антимикробни средства бяха определени чрез *E*-тест. За да се оценят рисковите фактори за колонизация с VRE бяха проучени демографски характеристики, клинични данни и употреба на антимикробни средства при пациентите. Статистическият анализ беше извършен с помощта на SPSS версия 27.0.

### Резултати

Интестинална колонизация с VRE беше установена при 27 (27.84%) от пациентите. Изолираните ентерококи включваха 14 *E. gallinarum*, 8 *E. casseliflavus* и 5 *E. faecium*. Всички *E. faecium* и 1 *E. gallinarum* експресираха МПК на ванкомицин  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$  и МПК на тейкопланин  $4\text{--}\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ . Останалите 13 *E. gallinarum* и всички *E. casseliflavus* показаха класически VanC фенотип. Статистическият анализ разкри, че продължителността на хемодиализата 13-60 месеца ( $p=0.040$ ), наличието на тунелизиран катетър ( $p=0.049$ ) и употребата на ванкомицин ( $p=0.033$ ) са рискови фактори за придобиване на VRE сред изследваната група пациенти. В допълнение, мултивариантният анализ потвърди, че употребата на ванкомицин ( $p=0.027$ ) е независим рисков фактор за колонизация с VRE.

### Заклучение

Нашите резултати показаха, че около 1/3 от пациентите на хемодиализа са колонизирани с фекални VRE. Сред анализираните рискови фактори, продължителността на хемодиализата, наличието на тунелизиран катетър и употребата на ванкомицин спомагат за придобиването на VRE.

**Ключови думи:** ванкомицин-резистентни ентерококи, интестинална колонизация, рискови фактори



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## PREVALENCE OF INTESTINAL VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI AND RISK FACTORS FOR COLONIZATION IN PATIENTS UNDERGOING HEMODYALYSIS

P. Hristova<sup>1</sup>, G. Todorova<sup>2</sup>, D. Georgieva<sup>1</sup>, H. Hitkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Virology, Medical University - Pleven

<sup>2</sup>Department of Nephrology, Hematology and Gastroenterology, Medical University - Pleven

The **aim** of our study was to determine the prevalence of intestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci (VRE) and to assess the risk factors for it in hemodialysis patients.

### Materials and methods

A total of 97 patients undergoing hemodialysis at University Hospital "Dr. G. Stranski"-Pleven were screened for intestinal VRE. The protocol for VRE isolation from fecal samples was previously described. The enterococcal isolates were identified using Vitek 2 Compact. The MICs to nine antimicrobials were examined by *E*-test. To assess the risk factors for VRE colonization of the patients, demographic characteristics, clinical findings and antimicrobial usage were studied. Statistical analysis was performed using SPSS version 27.0.

### Results

Intestinal colonization with VRE was established in 27 (27.84%) of the patients. The isolated enterococci included 14 *E. gallinarum*, 8 *E. casseliflavus* and 5 *E. faecium*. All *E. faecium* and 1 *E. gallinarum* expressed vancomycin MICs  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$  and teicoplanin MICs  $4\text{--}\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ . The rest 13 *E. gallinarum* and all *E. casseliflavus* showed a classical VanC phenotype. The statistical analysis revealed that duration of hemodialysis 13-60 months ( $p=0.040$ ), presence of tunneled catheter ( $p=0.049$ ) and vancomycin usage ( $p=0.033$ ) were risk factors for VRE acquisition among the studied group of patients. In addition, the multivariate analysis confirmed that the use of vancomycin ( $p=0.027$ ) was an independent risk factor for VRE colonization.

### Conclusion

Our results showed that about 1/3 of hemodialysis patients were colonized with fecal VRE. Among the analyzed risk factors, the duration of hemodialysis, the presence of tunneled catheter and the use of vancomycin were contributing to VRE acquisition.

**Key words:** vancomycin-resistant enterococci, intestinal colonization, risk factors

## ИЗПИТВАНЕ НА АНТИБИОТИЧНАТА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ ЧРЕЗ HB&L UROQUATRO АПАРАТ НА БАКТЕРИАЛНИ ИЗОЛАТИ, АСОЦИИРАНИ С УРОИНФЕКЦИИ В АМБУЛАТОРНИ ПАЦИЕНТИ

В. Снегарова-Тонева<sup>1,2</sup>, Н. Ерменлиева<sup>2</sup>, М. Мирошникова<sup>4</sup>, С. Стоянов<sup>4</sup>, Т. Стоева<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>СМДЛ Лаборекспрес 2000 ООД-Варна



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

<sup>2</sup> Медицински университет, Варна, Катедра „Микробиология и Вирусология“

<sup>3</sup> Лаборатория по Микробиология, УМБАЛ „Света Марина“ - Варна

<sup>4</sup> Студент, Медицински факултет, МУ-Варна

**Въведение:** Уроинфекциите са едни от най-честите инфекции в болнични и амбулаторни условия. Възможността за бърз микробиологичен резултат подобрява лечението и изхода от заболяването. **Цел:** Да се установи етиологичния спектър и да се определи антибиотичната чувствителност към набор от антибиотици чрез HB&L Uroquattro системата на най-честите уропатогени в амбулаторни пациенти в гр. Варна за седем месечен период (октомври 2020 – април 2021). **Материали и методи:** изследвани са общо 1600 уринни проби от пациенти със съмнение за уроинфекция. Скринингът за бактериален растеж и бързо определяне на чувствителността към набор от антибиотици (4 - 6 часа) бяха извършени чрез HB&L Uroquattro апарата (ALIFAX, Italy). Видовата идентификация е извършена чрез конвенционални методи и автоматизирана система VITEK 2 Compact System (bioMerieux). **Резултати:** *E. coli* е най-често изолирания уропатоген без значение от възрастовата група (48%, n=61), последван от *Enterococcus faecalis* (33%, n=42) и други представители на разред *Enterobacterales* (13.3%, n=18). Нивата на антибиотична резистентност, получени чрез HB&L апарата за Грам отрицателните изолати (n=79) в низходящ ред е както следва: ciprofloxacin, 31.6% > cefuroxime, 29.1% > trimethoprim/sulfamethoxazole, 25.3% > gentamicin, 18.9% > ceftriaxone, 16.5% > amikacin, 5%. Установената резистентност при изолатите *E. faecalis* (n=42) е както следва: ciprofloxacin, 61.9% > gentamicin HLAR, 16.7% > amoxicillin 11.9%. Не се установява резистентност към vancomycin и teicoplanin сред изолатите *Enterococcus spp.* **Заключение:** Етиологичният спектър на причинителите на уроинфекции се доминира от *E. coli*, следван от *E. faecalis*. В групата на Грам отрицателните бактерии се установяват високи нива на резистентност към trimethoprim/sulfamethoxazole и хинолони. Сред изолатите *E. faecalis* се установява също намалена чувствителност към хинолони, но аминопеницилините и гликопептидите остават високо ефективни. HB&L резултатите потвърждават, че trimethoprim/sulfamethoxazole и хинолоните не са подходящ избор за емпирична терапия на уроинфекции в нашия регион.

**Ключови думи:** уроинфекции, етиология, антибиотична резистентност, HB&L Uroquattro

Адрес за кореспонденция : [vsnegarova@abv.bg](mailto:vsnegarova@abv.bg), д-р Виктория Снегарова тел. 0887 361 381

## ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING BY HB&L UROQUATTRO OF MOST FREQUENTLY ISOLATED PATHOGENS, ASSOCIATED WITH URINARY TRACT INFECTIONS IN AMBULATORY PATIENTS

V. Snegarova<sup>1,2</sup>, N. Ermenlieva<sup>2</sup>, M. Miroshnikova<sup>4</sup>, S. Stoyanov<sup>4</sup>, T. Stoeva<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Medical Diagnostic laboratory “Laborexpres 2000” Ltd -Varna, Bulgaria

<sup>2</sup> Medical University, Varna, Department of Microbiology and Virology

<sup>3</sup> Microbiology laboratory, University Hospital “St. Marina”- Varna, Bulgaria

<sup>4</sup> Student, Faculty of Medicine, Medical University, Varna, Bulgaria





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Introduction:** Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common infections both in the community and in the hospital setting. Rapid microbiological results improve patient's treatment and disease outcome. **Aim:** The aim of this study is to investigate the etiological spectrum and antimicrobial susceptibility by HB&L Uroquattro instrument (ALIFAX, Italy) of most frequently isolated pathogens, associated with UTIs in ambulatory patients in Varna city, Bulgaria during a seven-month period (October 2020 - April 2021). **Materials and methods:** A total of 1600 urine samples, collected from patients with suspected UTIs were tested. Screening for bacterial growth and rapid antimicrobial susceptibility testing to set of antimicrobial agents (4-6 hours) were done by HB&L Uroquattro instrument (ALIFAX, Italy). Species identification was performed by conventional methods and VITEK 2 Compact System (bioMérieux). **Results:** *E. coli* was the most commonly isolated uropathogen regardless of the age group (48%, n=61), followed by *Enterococcus faecalis* (33%, n=42) and other representatives of order *Enterobacterales* (13.3%, n=18). The resistance rates to set of antimicrobial agents, determined by HB&L instrument, in the group of Gram-negative isolates (n=79) in decreasing order were as follows: ciprofloxacin, 31.6% > cefuroxime, 29.1% > trimethoprim/sulfamethoxazole, 25.3% > gentamicin, 18.9% > ceftriaxone, 16.5% > amikacin, 5%. The resistance rates among the isolates of *E. faecalis* (n=42) were as follows: ciprofloxacin, 61.9% > gentamicin HLAR, 16.7% > amoxicillin 11.9%. No resistance to glycopeptides (vancomycin, teicoplanin) was detected among *Enterococcus* spp. isolates. **Conclusion:** The etiological spectrum of UTIs in ambulatory patients was dominated by *E. coli*, followed by *E. faecalis*. In the group of Gram-negative uropathogens, high resistance rates to trimethoprim/sulfamethoxazole and quinolones were detected. Among *E. faecalis* isolates, the second most commonly isolated bacterial species, a decreased activity of quinolones was found too, but aminopenicillins and glycopeptides remained highly active. The HB&L results indicate that trimethoprim/sulfamethoxazole and quinolones are not suitable choices for empiric antimicrobial therapy of UTIs in our region.

**Keywords:** urinary tract infection, etiology, antimicrobial resistance, HB&L Uroquattro

## ЛАБОРАТОРНО-ДИАГНОСТИЧЕН СКРИНИНГ И КЛИНИЧНА ЗНАЧИМОСТ НА *COXIELLA BURNETII* ИНФЕКЦИЯТА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ЕНДОКАРДИТ И МИОКАРДИТ В ПЕРИОДА НА COVID-19 ПАНДЕМИЯТА

Красимира Иванова<sup>1</sup>, Драгана Ангелов<sup>1</sup>, Стефка Крумова<sup>2</sup>, Радостина Стефанова<sup>2</sup>,  
Константин Симеонов<sup>3</sup>, Петя Генова-Калу<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, Отдел „Вирусология“; НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“; <sup>2</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, Отдел „Вирусология“; НРЛ „Морбили, паротит и рубеола“;

<sup>3</sup>Българска Агенция по Безопасност на Храните, Национален Диагностичен и Научноизследователски Ветеринарномедицински Институт „Проф. д-р Г. Павлов”

**Интродукция:** Ку-треската е зооантропоноза с глобално разпространение. Особено внимание заслужава персистиращата инфекция с *C. burnetii*, която може да се развие след остра форма или да започне като първично хронично заболяване. Ку-рикетсиозните



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

ендокардити и миокардити са най-честата клинична манифестация, като особено рискови са пациентите с клапни увреждания и други кардиологични усложнения.

**Цел:** Да се извърши сероепидемиологично и молекулярно-биологично проучване на *Coxiella burnetii* в лабораторни проби на пациенти с кардиологични усложнения чрез комбинация/набор от съвременни лабораторни методи (имуноензимни и PCR техники) през периода на Covid-19 пандемията.

**Материали и методи:** В периода 2019 – 2021 г. са изследвани 43 клинични проби (серуми и плазма) от амбулаторни и хоспитализирани, в различни клиники на страната пациенти с ендокардит и миокардит. Използвани бяха серологични (ELISA за доказване на специфични IgM/IgG ph. II и IgG ph. I антитела спрямо *Coxiella burnetii*) и молекулярни (конвенционален и вмъкнат PCR/nested PCR за *sodB*, *com-1* и *IS1111* региони), методи.

**Резултати:** От изследваните 43 серумни проби, първично реактивни IgM ph. II антитела спрямо *Coxiella burnetii* бяха доказани в 7 (16.2 %) проби. Защитни *C. burnetii* IgG ph. II антитела, свидетелство за прекарана инфекция, бяха открити в 8 (18.6 %) проби. Всички серумни проби бяха тествани за доказване на *C. burnetii* инфекциозна ДНК. Положителен PCR сигнал (*sodB* регион) беше получен при 7 от изследваните проби (16.2%), които имаха респективно позитивни анти-*C. burnetii* IgM ph. II антитела и анти-*C. burnetii* IgG ph. II резултат, с изключение на една проба, при която бяха установени само *C. burnetii* IgG ph. II антитела. Пробите с положителен PCR сигнал (*sodB*) са тествани чрез конвенционален и вмъкнат PCR за региони *com-1* и *IS1111*.

**Заключение:** Проучването показва участието на *Coxiella burnetii* в развитието на ендокардити и миокардити. В резултат на натрупания опит в НРЛ „Рикетсии и клетъчни култури“ е разработена диагностична схема, включваща комплекс от методи за подобряване на ранната лабораторна диагностика на *C. burnetii*, позволяваща предприемането на навременно и адекватно лечение на пациенти с кардиологични усложнения.

**Ключови думи:** *Coxiella burnetii*, кардиологични усложнения, серология, конвенционален и вмъкнат PCR/nested PCR методи

**Благодарност:** Изследванията са финансирани по научно-изследователски проект от ФНИ, Договор № КП-06-Н33/3 от 13.12.19г. на тема: „Молекулярно-генетична идентификация и създаване на архивна геномна банка на циркулиращите човешки и животински *C. burnetii* генотипове и определяне на тяхната роля като особено опасни инфекциозни агенти, причиняващи епизоотични и епидемиологични взривове на територията на Р. България”, както и по Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

Адрес за кореспонденция:

бул. „Генерал Н. Г. Столетов“ 44А, Отдел „Вирусология“  
02/9313817 Красимира Иванова





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## LABORATORY-DIAGNOSTIC SCREENING AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF *COXIELLA BURNETII* INFECTION IN PATIENTS WITH ENDOCARDITIS AND MYOCARDITIS DURING THE COVID-19 PANDEMIC

Krasimira Ivanova<sup>1</sup>, Dragana Angelov<sup>1</sup>, Stefka Krumova<sup>2</sup>, Radostina Stefanova<sup>2</sup>, Konstantin Simeonov<sup>3</sup>, P. Genova-Kalou<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), NRL "Cell cultures, Rickettsia and oncogenic viruses"; <sup>2</sup>Department of Virology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), NRL "Measles, Mumps and Rubella"; <sup>3</sup>Bulgarian Food Safety Agency (BFSA), National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute "Prof. Dr. G. Pavlov

**Introduction:** Q-fever is a zoonanthroponosis with a global distribution. Of particular note are persistent *C. burnetii* infections, that may develop after an acute form or begin as a primary chronic disease. Rickettsial endocarditis and myocarditis are the most common clinical manifestation, and patients with valvular damage and other cardiac complications are particularly at risk.

**Aim:** To perform a seroepidemiological and molecular biological study of *C. burnetii* in laboratory samples of patients with cardiac complications by a combination/set of modern laboratory methods (immunoenzyme and PCR techniques) during the period of the Covid-19 pandemic.

**Materials and methods:** In the period 2019 - 2021 were tested 43 clinical samples from patients hospitalized in different hospitals of the country with endocarditis and myocarditis. Serological (ELISA for detecting specific anti-*C. burnetii* IgM/IgG ph. II antibodies) and molecular biology (standard and nested PCR techniques for detection of *sodB* and *com-1* и *IS1111* regions) methods were used.

**Results:** Of the 43 samples included in our study anti *C. burnetii* IgM ph. II antibodies were demonstrated in 7 (16.2 %) samples. Protective anti-*C. burnetii* IgG ph. II antibodies, marker for past infection, were detected in 8 (18.6%) samples. All blood samples were examined for the presence of *C. burnetii* DNA. A positive PCR signal (*sodB* region) was obtained in 7 of the examined samples (16.2%), which had respectively positive anti-*C. burnetii* IgM ph. II antibodies and anti-*C. burnetii* IgG ph. II result, with the exception of one sample in which only *C. burnetii* IgG ph. II antibodies were detected. Samples with a positive PCR signal (*sodB*) were tested by conventional and nested PCR for *com-1* and *IS1111* regions.

**Conclusion:** The study shows the involvement of *C. burnetii* in the development of endocarditis and myocarditis. As a result of the accumulated experience, a diagnostic scheme has been developed at the NRL "Rickettsia and Cell Cultures", including a complex of methods to improve the early laboratory diagnosis of *C. burnetii*, allowing the initiation of timely and adequate treatment of patients with cardiac complications.

**Keywords:** *Coxiella burnetii*, cardiac complications, serology, conventional and nested PCR methods

**Acknowledgments:** The research was funded under a research project by the National Institute of Scientific Research, Contract No. KP-06-H33/3 dated 13.12.19. "Molecular-genetic identification and creation of an archival genome bank of circulating human and animal *C. burnetii* genotypes and determination of their role as particularly dangerous infectious agents causing epizootic and



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

epidemiological outbreaks on the territory of the Republic of Bulgaria" as well as by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

Address:

Blvd. General N. G. Stoletov 44A, Virology Department  
02/9313817 Krasimira Ivanova

## СРАВНИТЕЛНА ОЦЕНКА НА ЕФЕКТИВНОСТТА НА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИТЕ И МОРФОЛОГИЧНИ АНАЛИЗИ В ДИАГНОСТИКАТА НА ПНЕВМОЦИСТОЗАТА

Н. Цветкова, А. Иванова, И. Райнова, Р. Харизанов, Н. Янчева-Петрова, Д. Страшимиров, Р. Еникова, М. Виденова, Е. Канева, И. Кафтанджиев, В. Левтерова, И. Симеоновски

<sup>1</sup>Катедра по паразитология и тропическа медицина, НЦЗПБ, София, България

<sup>2</sup>Катедра по микробиология, НЦЗПБ, София, България

<sup>3</sup>Отделение за лечение на придобита имунна недостатъчност, Специализирана болница за активно лечение по инфекциозни и паразитни болести „Проф. Иван Киров“, София, България

**Целта** на проучването е да се сравни ефективността на микроскопските и молекулярните методи за диагностика на пневмония, причинена от *Pneumocystis jirovecii* (PCR).

**Материали и методи:** Приложени са 3 хистохимични техники за оцветяване (с боите метенамин сребърен нитрат по Гомори (MSG), толудиново синьо и Гимза) и два PCR анализа в реално време (за амплификация на фрагмент от гена, кодиращ митохондриалната рРНК за голяма рибозомна субединица (mtLSU rRNA) и от гена, кодиращ кексин-подобната серинова протеаза (Kex-1)) за откриване на *P. jirovecii* в проби от горните и долните дихателни пътища (ГДП/ДДП).

**Резултати:** Анализирани са общо 220 проби от ДДП (12 материала бронхоалвеоларен лаваж [BAL], 82 храчки) и от ГДП (трахеални аспирати (n=8) и гърлени секрети (n=118)) на HIV-инфектирани лица, неинфектирани с ХИВ имунокомпрометирани пациенти и пациенти без данни за имunosupresия, със съмнение за РСР.

При микроскопското изследване на оцветени натривки цисти на *P. jirovecii* са открити в 5 (2,27%) от 220 проби, при оцветяване с MSG. В резултат на проведените PCR анализи в реално време, ДНК на *P. jirovecii* е установена в 38 (17%) проби и с двата анализа. Пробите, положителни при оцветяването с MSG също се позитивираха и при PCR. От положителните случаи, тридесет и два (48%) са от имunosupresирани пациенти (n=67) и 6 (4%) от имунокомпетентни лица (n=153).

**Заклучение:** Молекулярните анализи, използващи PCR в реално време, са по-чувствителни от микроскопското изследване за откриване на *Pneumocystis jirovecii* в клинични проби от ГДП/ДДП на пациенти със съмнение за РСР.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Ключови думи:** *Pneumocystis jirovecii* пневмония (PCP), оцветителни методи, PCR в реално време

Работата е проведена с финансова подкрепа от Фонд „Научни изследвания“ (проект № КР-06-N33/18/21.12.2019) по „Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания - 2019“ и Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ (Проект BG05M2OP001-1.002-0001 „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“) към Министерството на образованието и науката на Република България.

## COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF PCR ASSAYS AND OPTICAL MICROSCOPY FOR THE DIAGNOSIS OF *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* PNEUMONIA

*Tsvetkova, N.<sup>1</sup>, A. Ivanova<sup>1</sup>, I. Raynova<sup>1</sup>, R. Harizanov<sup>1</sup>, N. Yancheva-Petrova<sup>3</sup>, D. Strashimirov<sup>3</sup>, R. Enikova<sup>1</sup>, M. Videnova<sup>1</sup>, E. Kaneva<sup>1</sup>, I. Kaftandjiev<sup>1</sup>, V. Levterova<sup>2</sup>, I. Simeonovski<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Parasitology and Tropical Medicine, NCIPD, Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup>Department of Microbiology, NCIPD, Sofia, Bulgaria

<sup>3</sup>Department for AIDS, Specialized Hospital for Active treatment of Infectious and Parasitic Diseases „Prof. Ivan Kirov“, Sofia, Bulgaria

The **aim** of the study was to compare the effectiveness of microscopic with molecular methods in the diagnosis of pneumonia due to *Pneumocystis jirovecii* (PCP).

**Materials and Methods:** We applied 3 histochemical staining techniques (Gomori's methenamine silver (GMS), toluidine blue and Giemza stains) and two real time PCR assays (targeting the mitochondrial large-subunit ribosomal RNA (mtLSU rRNA) and the Kexin-like serine protease (Kex-1)) genes for the detection of *P. jirovecii* in fluid samples from upper and lower respiratory tract (URT/LRT).

**Results:** A total of 220 samples from the LRT (12 bronchoalveolar lavage [BAL] fluids, 82 sputums), and from the URT (tracheal aspirates (n = 8) and throat secretions (n = 118)) of HIV-infected, non-HIV immunocompromised patients, and patients without data for immunosuppression, suspected with PCP were analyzed.

Direct microscopic examination of stained specimens in parallel revealed the presence of *P. jirovecii* in 5 (2.27%) out of 220 samples using GMS stain. Real-time PCR assays led to the detection of *P. jirovecii* DNA in 38 (17%) samples with both analyses. Samples that were GMS stain positive were found PCR positive as well. Thirty two (48%) of the positive cases were from immunosuppressed (n=67) and 6 (4%) were from immunocompetent (n=153) patients.

**Conclusion:** Molecular assays using real-time PCR are more sensitive than microscopic examination for detecting *Pneumocystis jirovecii* in clinical samples from the URT/LRT of PCP suspected patients.

**Keywords:** *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP), real-time PCR, optical microscopy



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

This work was carried out with financial support from the National Science Fund (project № KP-06-N33/18/21.12.2019) under the "Competition for funding of basic research - 2019", and from the Executive Agency "Science and Education for Smart Growth" "Operational Program for Growth (Project BG05M2OP001-1.002-0001 "Fundamental, Translational and Clinical Research in the Field of Infections and Infectious Immunology") at the Ministry of Education and Science of the Republic of Bulgaria.

## КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА МИГРИРАЩА КОЖНА ЛАРВА ПРИ ЗАВЪРНАЛ СЕ ОТ ТРОПИЧЕСКА СТРАНА ПАЦИЕНТ

И. Кафтанджиев<sup>1</sup>, Р. Харизанов<sup>1</sup>, И. Райнова<sup>1</sup>, Н. Цветкова<sup>1</sup>, Р. Борисова<sup>1</sup>, Е. Кънева<sup>1</sup>, О. Миков<sup>1</sup>, М. Виденова<sup>1</sup>, А. Иванова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Отдел по Паразитология и Тропическа Медицина към НЦЗПБ

Мигриращата кожна ларва – *larva migrans cutanea*, е паразитна инвазия, която засяга кожата на човека и протича с интензивен пруритус и развитието на еритематозно - едематозни папули, които се разпространяват по кожата със змиевиден ход със скорост от няколко милиметра до няколко сантиметра на ден. Това, е най-честото кожно заболяване сред завръщащите се от тропически страни. Причинител са филариевидните ларви (L3) на различни паразитиращи по животните нематоди от род *Ancylostoma*. Като най-чести причинители се посочват: *Ancylostoma braziliense* - паразитира по диви и домашни кучета и котки; *Ancylostoma caninum* – паразитира само по кучетата; *Ancylostoma ceylanicum* – кучета и котки; *Ancylostoma tubaeforme* – котки.

Цел на настоящата разработка е да представим клиничен случай и на мигрираща кожна ларва и подхода при неговата диагностика и лечение.

**Представяне на случая:** Турист на 27 годишна възраст пребивава около един месец на остров Занзибар. Според неговите собствени думи често е лежал на пясъка без да използва плажна кърпа, или шезлонг. По време на полета към България започва да усеща силен сърбеж в гърба в областта на лявото рамо и лявата скапула, където забелязва и появата на едематозно - еритематозни папули свързани със змиевиден обрив. Свързвайки симптомите си с пребиваването си в Занзибар той решава да потърси консултация с паразитолог в Националния център по заразни и паразитни болести в София.

Въз основа на типичната кожна екзантема и епидемиологична история за посещение в ендемичен регион е поставена диагноза "*larva migrans cutanea*". Пациента е лекуван с *albendazole*, 2 x 400 мг за 3 дни. Субективните оплаквания и сърбежа изчезват в първите 24 часа от началото на лечението, а на контролния преглед след 7 дни е установена пълна резолюция на кожния обрив.

**Заклучение.** Заболяването се регистрира рядко в България и до момента не са регистрирани автохтонни случаи. Зачестилите пътувания на хора до екзотични дестинации може да доведе до повишена честота на неендемични или рядко наблюдавани в умерените географски райони заболявания, за които лекарите трябва да бъдат информирани.

**Ключови думи:** *larva migrans cutanea*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## CLINICAL CASE OF CUTANEOUS LARVA MIGRANS IN A PATIENT RETURNED FROM A TROPICAL COUNTRY

Kaftandjiev<sup>1</sup>, R. Harizanov<sup>1</sup>, I. Raynova<sup>1</sup>, N. Tsvetkova<sup>1</sup>, R. Borisova<sup>1</sup>, E. Kaneva<sup>1</sup>, O. Mikov<sup>1</sup>, M. Videnova<sup>1</sup>, A. Ivanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Parasitology and Tropical Medicine at NCIPD

Larva migrans cutanea, is a parasitic invasion that affects human skin and proceeds with intense pruritus and development of erythematous - edematous papules, which spread on the skin with a serpentine course at a rate of several millimeters to several centimeters per day. This is the most common skin disease among those returning from tropical countries. The causative agents are filariform larvae (L3) of various parasitic nematodes of genus *Ancylostoma*. The most common causes are: *Ancylostoma braziliense* - parasitizes on wild and domestic dogs and cats; *Ancylostoma caninum* - parasitizes only on dogs; *Ancylostoma ceylanicum* - dogs and cats; *Ancylostoma tubaeforme* - cats.

**Aim** of this study was to present a case of the disease and its management in terms of diagnosis and treatment.

**Presentation of the case:** A 27-year-old tourist stays on the island of Zanzibar for about a month. In his own words, he often lay on the sand without using a beach towel or deck chair. During the flight to Bulgaria he began to feel severe itching in the back in the area of the left shoulder and the left scapula, where he noticed the appearance of edematous - erythematous papules associated with a serpentine rash. Linking his symptoms to his stay in Zanzibar, he decided to seek a consultation with a parasitologist at the National Center for Infectious and Parasitic Diseases in Sofia.

Based on the typical skin exanthema and epidemiological history of visiting an endemic region, a diagnosis of "larva migrans cutanea" was made, and the patient was treated with albendazole, 2 x 400 mg for 3 days. , and at the control examination after 7 days a full resolution of the skin rash was established.

**Conclusion.** The disease is rarely registered in Bulgaria and so far no autochthonous cases have been recorded. The increasing frequency of traveling to exotic destinations can lead to an increased incidence of non-endemic or rarely observed diseases in temperate geographical areas, about which the medical professionals should be informed.

**Key words:** larva migrans cutanea, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*

## ФИЛОГЕНЕТИЧНИ ТРАНСМИСИОННИ КЛЪСТЕРИ НА HIV-1 СУБТИП В, С И CRF01\_AE В БЪЛГАРИЯ

(Предварителен анализ)

Любомира Григорова<sup>1</sup>, Александра Парцунева<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>, Мариана Стойчева<sup>3</sup>, Цеца Дойчинова<sup>4</sup>, Лилия Пекова<sup>5</sup>, Минас Козмидис<sup>6</sup> и Ивайло Алексиев<sup>1</sup>





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

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

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

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

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

<sup>5</sup>Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Стара Загора

<sup>6</sup>Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Варна

**Ключови думи:** филогенетично дърво, трансмисионен клъстер, HIV

## Въведение

В съвременния подход за анализ на епидемични взривове участват и молекулярно-епидемиологични методи за реконструкция на филогенетични трансмисионни клъстери. Настоящото проучване цели да определи възможните връзки на предаване и образуваните трансмисионни клъстери на HIV-1 субтип В, С и CRF01\_AE в България.

## Материали и методи

Чрез анонимен цифров код, изследваните плазмени проби са свързани с демографски и клинични данни. Генът *pol* на HIV-1 беше секвениран с помощта на Viroseq и/или TruGene секвениращи системи. Автоматизираните инструменти: COMET v2.2, REGA v3.0.0 и jpHMM бяха използвани за идентификация на субтиповете. Секвенциите бяха подравнени с програмата Aliview, филогенетичното дърво беше реконструирано с програма IQ-Tree v1.6.12 и визуализирано с FigTree v1.4.4. За филогенетичен клъстер бяха приети две или повече секвенции с bootstrap  $\geq 90$ . Пълният набор от данни съдържа 663 секвенции от субтип В, 39 от С и 270 от CRF01\_AE.

## Резултати

Епидемиологичните данни показват, че трите субтипа се различават по основната трансмисионна категория, при субтип В преобладават мъжете, които правят секс с мъже (МСМ) 56,7%, при субтип С - хетеросексуалните (ХЕТ) 90,0%, а при CRF01\_AE - употребяващите, инжекционни наркотици (УИН) 52,2%. Анализът на филогенетичното дърво на субтип В установи 52 клъстера и 28 близкородствени двойки. Построеното филогенетично дърво със секвенции от субтип С показва наличието на 6 клъстера, използваните референтни секвенции от субтип С бяха включени в 2 от тях. Секвенциите от CRF01\_AE се обединиха в 6 клъстера, включително един голям клъстер, съдържащ 154 секвенции.

## Изводи

Субтип В и CRF01\_AE са двата най-разпространени субтипа в България, те включват най-засегнатите от HIV уязвими групи - МСМ и УИН. Процентно групата на ХЕТ е най-силно представена в субтип С. Съществуването на мостове на предаване на HIV инфекцията бе доказано чрез анализ на образуваните трансмисионни клъстери. Нашето проучване



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

подчертава необходимостта от детайлно молекулярно-епидемиологично наблюдение на динамиката на HIV-1 инфекцията.

### Благодарности

Това проучване е финансирано от: Националния център по заразни и паразитни болести и от Националната програма за превенция и контрол на ХИВ и сексуално предавани инфекции (СПИ), както и по Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## PHYLOGENETIC TRANSMISSION CLUSTERS OF HIV-1 SUBTYPE B, C AND CRF01\_AE IN BULGARIA

### (Preliminary analysis)

*Lyubomira Grigorova<sup>1</sup>, Alexandra Partsuneva<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>, Mariana Stoycheva<sup>3</sup>, Tsetsa Doichinova<sup>4</sup>, Lilia Pekova<sup>5</sup>, Minas Kozmidis<sup>6</sup> and Ivaylo Alexiev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*National Reference Confirmatory Laboratory of HIV, NCIPD, Sofia*

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

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

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

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

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

**Key words:** phylogenetic tree, transmission cluster, HIV

### Introduction

Molecular-epidemiological methods for reconstruction of phylogenetic transmission clusters are part of the modern approach for analysis of epidemic outbreaks. This study aims to determine the possible transmission links and the formed transmission clusters of HIV-1 subtype B, C and CRF01\_AE in Bulgaria.

### Materials and methods

By anonymous digital code, the studied plasma samples are related to demographic and clinical data. The *pol* gene of HIV-1 was sequenced using Viroseq and / or TruGene sequencing systems. Automated tools: COMET v2.2, REGA HIV-1 v3.0.0 and jpHMM were used for subtype identification. The sequences were aligned with Aliview program, the phylogenetic tree was reconstructed with IQ-Tree v1.6.12 program and visualized with FigTree v1.4.4. Two or more sequences, with bootstrap  $\geq 90$  were accepted as the phylogenetic cluster. The complete data set contains 663 sequences of subtype B, 39 of C and 270 of CRF01\_AE.

### Results





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Epidemiological data show that the three subtypes differ in the main transmission category, subtype B is dominated by men who have sex with men (MSM) 56.7%, subtype C – heterosexuals (HET) 90.0%, and CRF01\_AE - people who inject drugs (PWIDs) 52.2%. Analysis of the phylogenetic tree of subtype B identified 52 clusters and 28 closely related pairs. The constructed phylogenetic tree of subtype C showed presence of 6 clusters, the reference sequences used were included in 2 of them. The CRF01\_AE sequences were combined into 6 clusters, including one large cluster containing 154 sequences.

## Conclusions

Subtype B and CRF01\_AE are the two most common subtypes in Bulgaria, they include the most affected by HIV vulnerable groups - MSM and PWIDs. The percentage of HET is most strongly represented in subtype C. The existence of bridges of HIV transmission was shown by analysis of the formed transmission clusters. Our study emphasizes the need of detailed molecular-epidemiological monitoring of the dynamics of HIV-1 infection.

## Acknowledgment

This work was supported: By National Center of Infectious and Parasitic Diseases. By the National Program for the Prevention and Control of HIV and Sexually Transmitted Infections as well as by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

## СВОБОДНИТЕ КИСЛОРОДНИ РАДИКАЛИ (ROS) В CD4+ И CD8+ Т-КЛЕТКИ КАТО ПОТЕНЦИАЛЕН БИОМАРКЕР ЗА МОНИТОРИНГ НА HIV ИНФЕКЦИЯ

Радослава Емилова<sup>1</sup>, Яна Тодорова<sup>1</sup>, Милена Алексова<sup>1</sup>, Ивайло Алексиев<sup>2</sup>, Любомира Григорова<sup>2</sup>, Ренета Димитрова<sup>2</sup>, Нина Янчева<sup>3</sup>, Мария Николова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София

<sup>2</sup>Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV, НЦЗПБ, София

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

**Увод:** Клетъчната активация и хроничното възпаление са резултат от повишеното производство на свободни кислородни радикали (ROS) в клетките. Проучването на регулацията и патофизиологичните механизми на оксидативния стрес при HIV инфекция е може да допринесе съществено за мониторинга на антиретровирусната терапия (сART).

**Цел:** Да се изследва съдържанието на ROS в основните Т-клетъчни субпопулации на HIV+ лица на сART с трайно потиснат вирусен товар, в сравнение със здрави (HIV-) доброволци.

**Материал и методи:** Изследвани са проби от периферна кръв (Li хепарин, n=59) в хода на рутинния имунологичен мониторинг на HIV+ лица и контролна група (HIV-) здрави доброволци (n=10), съответни по пол и възраст. Количеството на вирусния товар е определено с тест Abbott Real-Time HIV-1 от плазмени проби (обхват, 40 копия/мл до 10 000 000 копия/мл). Абсолютният брой (AC) и процент на CD4+ и CD8+Т клетките са определени



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

чрез директна флуоцитометрия (Multitest, BD Trucount, FACS Canto II). Вътреклетъчното съдържание на ROS определяхме в периферни мононуклеарни клетки (ПМНК), маркирани за CD4 и CD8, след инкубация на 37°C за 30 минути в присъствието на сензор, образуващ с ROS флуоресцентен комплекс ( $\lambda_{ex} = 520/\lambda_{em} = 605\text{nm}$ ) (Sigma-Aldrich). За количествена оценка на ROS използвахме средния интензитет на флуоресценция ( $\text{MFI}/100 \pm \text{STD}$ ) определена флуоцитометрично (FACSDiva 6.1.2).

**Резултати:** CD4AC на изследваните HIV+ лица не се отличаваха от тези на здравите контроли ( $762 \pm 317$  c/y  $866 \pm 434$ ,  $p=0.51$ ), за разлика от CD4/CD8 ( $0.97 \pm 0.55$  c/y  $2.35 \pm 0.89$ ,  $p<0.001$ ).  $\text{MFI}_{\text{ROS}}$  в CD4+T бе значимо по-висока при HIV+ лица ( $27.14 \pm 12.5$  c/y  $18.35 \pm 7.9$ ,  $p<0.01$ ), докато  $\text{MFI}_{\text{ROS}}$  в CD8+T не се различаваха значимо от здравите контроли ( $27.3 \pm 10.7$  c/y  $22.9 \pm 11.6$ ,  $p>0.05$ ). Допълнително анализирахме подгрупата HIV+ лица с CD4/CD8  $>0.9$  ( $n=29$ ). Независимо от пълното имунологично възстановяване (средно CD4AC= $930 \pm 258$ , CD4/CD8= $1.39 \pm 0.47$ )  $\text{MFI}_{\text{ROS}}$  в CD4+T в тази подгрупа оставаше значимо по-високо в сравнение със здравите контроли ( $28.78 \pm 12.1$  c/y  $18.35 \pm 7.9$ ,  $p<0.01$ ), докато в CD8+T клетки не се установи такава разлика ( $30.64 \pm 11.6$  c/y  $22.95 \pm 11.7$ ,  $p>0.05$ ).

**Заключение:** Повишеното съдържание на ROS в CD4 клетки при HIV+cART лица би могло да е резултат от остатъчна имунна активация и вирусна активност на фона на неоткриваем вирусен товар.

**Ключови думи:** HIV, ROS, cART мониторинг

**Благодарности:** Това проучване е извършено с подкрепата на Европейския фонд за регионално развитие чрез Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“, договор BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални, транслаци и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“

## THE REACTIVE OXIGEN SPECIES (ROS) IN CD4+ AND CD8+ T-CELLS AS A POTENTIAL BIOMARKER FOR MONITORING OF HIV INFECTION

Radoslava Emilova<sup>1</sup>, Yana Todorova<sup>1</sup>, Milena Aleksova<sup>1</sup>, Ivaylo Alexiev<sup>2</sup>,  
Lyubomira Grigorova<sup>2</sup>, Reneta Dimitrova<sup>2</sup>, Nina Yancheva<sup>3</sup>, Maria Nikolova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Reference Laboratory of Immunology, NCIPD, Sofia

<sup>2</sup> National Reference Confirmatory Laboratory of HIV, NCIPD, Sofia

<sup>3</sup> Specialized Hospital for Active Treatment of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

**Introduction:** The cellular activation and chronic inflammation are a consequences of the increased production of ROS. Identifying and understanding the mechanisms of oxidative stress in HIV infection is an important element of an integrated approach to antiretroviral therapy (cART) monitoring.

**Aim:** A comparison of ROS levels in the two major subpopulations of T cells among healthy volunteers (HIV-) and HIV + individuals on cART and long-term suppressed viral loads.

**Material and methods:** As part of routine immunological monitoring, peripheral blood samples (Li-heparin) were collected from HIV+ individuals ( $n=59$ ) and healthy volunteers (group A,  $n=10$ )



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

of similar age and sex. The viral load was determined by the Abbott Real-Time HIV-1 assay from plasma samples (range of 40 copies/ml to 10,000,000 copies/ml).

Direct flowcytometry was used to determine the absolute number (AC) and percentage of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. We measured ROS levels in cells by incubating CD4+ and CD8+ - stained peripheral mononuclear cells (PBMC) at 37°C for 30 minutes with a sensor, forming fluorescent ROS complex ( $\lambda_{ex} = 520/\lambda_{em} = 605$  nm) (Sigma-Aldrich). To determine ROS levels, we measured the mean fluorescence intensity (MFI/100 $\pm$ STD) by flow cytometry (FACSDiva 6.1.2).

**Results:** No difference in CD4 AC was found between HIV+ individuals and healthy controls (762 $\pm$ 317 vs. 866 $\pm$ 434,  $p=0.51$ ) unlike CD4/CD8 (0.97 $\pm$ 0.55 vs. 2.35 $\pm$ 0.89,  $p<0.001$ ).

MFI<sub>ROS</sub> in CD4+T was significantly higher in HIV+ individuals (27.14 $\pm$ 12.5 c/y 18.35 $\pm$ 7.9,  $p<0.01$ ), while MFI<sub>ROS</sub> in CD8+T was not significantly different from healthy controls (27.3 $\pm$ 10.7 c/y 22.9 $\pm$ 11.6,  $p>0.05$ ). Additionally, we had an observation that, regardless of immunological restoration (mean CD4AC=930 $\pm$ 258, CD4/CD8=1.39 $\pm$ 0.47), in HIV+ individuals with CD4/CD8 $>0.9$  ( $n=29$ ), MFI<sub>ROS</sub> in CD4+T remain significantly higher compared to healthy controls (28.78 $\pm$ 12.1 vs. 18.35 $\pm$ 7.9,  $p<0.01$ ), while MFI<sub>ROS</sub> in CD8+T did not differ (30.64 $\pm$ 11.6 vs. 22.95 $\pm$ 11.7,  $p>0.05$ ).

**Conclusion:** Increased ROS levels in CD4 cells are probably a result of residual viral activity in the settings of cART and undetectable viral loads.

**Key words:** HIV, ROS, cART monitoring

**Acknowledgements:** *The study is supported by the European Fund for regional development through Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 “Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity”*

## КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА ХРОНИЧЕН ЕНДОМЕТРИТ И ПОВТАРЯЩИ СЕ СПОНТАННИ АБОРТИ

Татяна Бодурска<sup>1</sup>, Светлана Пачкова<sup>1</sup>, Ангел Йорданов<sup>2</sup>, Емилияна Конова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медицински център „Клиничен институт за репродуктивна медицина“ Плевен

<sup>2</sup>Медицински университет Плевен

Повтарящите се спонтанни аборти се определят като загуба на две или повече бременности и засягат около 0.8-4.2% от двойките. В патогенезата им са включени различни фактори-маточни аномалии, тиреоидна дисфункция, вродена и придобита тромбофилия, хромозомни аномалии, антифосфолипиден синдром. В повече от 50% от случаите етиологията остава неизяснена. Хроничният ендометрит е тихо персистиращо възпаление на маточната лигавица, много често игнорирано поради своята генерална асимптомност и трудност за диагноза. Клинично липсват специфични симптоми, често са налице леки неспецифични симптоми като абнормно маточно кървене, неясен тазов дискомфорт, левкорей. Златен стандарт за диагноза на хроничния ендометрит е хистологията с установяване и измерване на плазматичните клетки в ендометриалната строма. По-голяма честота на хроничен



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

ендометрит се наблюдава при жени с инфертилитет, повтарящи се имплантационни неуспехи и повтарящи се спонтанни аборти. При изследване на ендометриален микробиом при тези жени се открива ендометриална дисбиоза или наличие на патогенни микроорганизми. Представяме клиничен случай на пациентка на 37 г. с четири неуспешни бременности: два спонтанни аборти, тежка форма на пreeклампсия в 26 г.с. с раждане на жив, недоносен плод, починал на втори следродилчен час и четвърта ектопична бременност, разположена в маточната шийка. Последна пета бременност настъпила след проведено етиологично антибиотично лечение по повод на установен нарушен ендометриален микробиом с хроничен ендометрит и завършила с раждане на жив, доносен плод.

**Ключови думи:** ендометриален микробиом, спонтанни аборти, хроничен ендометрит

**Адрес за кореспонденция:** МЦ КИРМ, бул. „ген. Скобелев“ 20Г, Плевен, д-р Татяна Бодурска, моб. тел: 0893 319 911

## CLINICAL CASE REPORT: CHRONIC ENDOMETRITIS AND RECURRENT PREGNANCYLOSS

*Tatyana Bodurska<sup>1</sup>, Svetlana Pachkova<sup>1</sup>, Angel Jordanov<sup>2</sup>, Emiliana Konova<sup>1</sup>*

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

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

Recurrent pregnancy loss is defined as loss of two or more pregnancies and affects 0.8-4.2% of couples. In pathogenesis are included different factors: uterine anomalies, thyroid dysfunction, congenital and acquired thrombophilia, chromosomal anomalies, antiphospholipid syndrome. In more than 50% etiology remains unknown. Chronic endometritis is silent persistent inflammation of uterine mucosa which is very commonly ignored due to its generally asymptomatic and difficult diagnosis. Specific symptoms are missing and common non-specific symptoms are present: abnormal uterine bleeding, obscure pelvic discomfort, leucorrhoea. Golden standard in diagnosis of chronic endometritis is histology and measurement of plasmatic cells in endometrial stroma. Increased incidence of chronic endometritis is found in women with infertility, recurrent implantation failure and recurrent pregnancy loss. Evaluating endometrial microbiome in these cases reveals endometrial dysbiosis or presence of pathogenic bacteria. We present a clinical case: 37-year old woman, G5, P2, A3: 2 miscarriages, 1 premature delivery complicated by severe preeclampsia and severe immaturity followed by death of the newborn 2 hour later. 4-th pregnancy was a case of ectopic pregnancy-gestational sac in uterine cervix. The 5-th normal pregnancy was after etiologic antibiotic treatment indicated by abnormal uterine microbiome and chronic endometritis.

**Key words:** endometrial microbiome, recurrent pregnancy loss, chronic endometritis



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## ПОСТЕРНА СЕСИЯ II

### ПРОУЧВАНЕ УРЕТРАЛНИЯ МИКРОБИОМ С ANDROFLOR® SCREEN ПРИ МЪЖЕ С НЕСПЕЦИФИЧНА ГЕНИТАЛНА СИМПТОМАТИКА В УСЛОВИЯ НА COVID-19 ПАНДЕМИЯ

Христова Ели<sup>1,5</sup>, Дерменджиев Тихомир<sup>1,5</sup>, Рачковска Зоя<sup>1,5</sup>, Георгиева Вида<sup>2</sup>  
Костадинов Костадин<sup>3</sup>, Павлов Цветомир<sup>4</sup>, Мурджева Мариана<sup>1,5</sup>

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

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

<sup>3</sup>Катедра по социална медицина и обществено здраве, Факултет по обществено здраве, Медицински университет – Пловдив

<sup>4</sup>Лаборатория по Клинична имунология и микробиология, УМБАЛ „Пълмед“, Пловдив

<sup>5</sup>Научно-изследователски институт на Медицински университет – Пловдив

**Въведение:** Инфекциите на мъжкия генитален тракт често протичат асимптоматично или се придружават от неспецифична генитална симптоматика, което улеснява предаването към партньора. COVID-19 пандемията намали интереса към рутинно тестване на най-честите полово-предавани инфекции (ППИ) като хламидиоза и гонорея с до 69%, което увеличава риска от хронифициране и скрита трансмисия на ППИ. Едновременно доказване на облигатни и опортюнистични патогени с молекулно-биологични и конвенционални методи и количественото определяне на уретрална микрофлора са важни при полимикробна инфекция и за избора на етиотропна терапия.

**Цел:** Да се направи количествена и качествена оценка на уретралния микробиом с помощта на RT-PCR и анализират резултатите от молекулно-биологичните и културелни изследвания при мъже с неспецифична генитална симптоматика в условията на COVID-19.

**Материали и методи:** За периода от януари 2021 до март 2022 г. са изследвани общо 49 уретрални секрети от амбулаторни пациенти. Използват се клинични, молекулно-биологични (Androflor® Screen), микробиологични и статистически методи.

**Резултати и обсъждане:** Водещ патоген е *C. trachomatis* (n=6; 12%), следван от *M. genitalium* (n=3; 6%) и *N. gonorrhoeae* (n=1; 2%). От условно патогенната флора преобладават *G. vaginalis* (n=6; 12%) и *U. urealyticum* (n=3; 6%). При 7 (14%) от пациентите се намират лактобактерии. Смесени инфекции се наблюдават по-често при *U. urealyticum* и *G. vaginalis*. С конвенционални методи се доказват 4 случая на *S. agalactiae* и 1 на *S. aureus*. 34(69%) от мъжете бяха с изразена дисбиоза, 6 (12%) – с умерена, а 9 (18%) – с нормобиоза.

**Заключение:** Относителният дял на облигатни и факултативно патогенни микроорганизми при мъже с неспецифична симптоматика са сравнително нисък и за двете групи. Едновременно прилагане на конвенционални и съвременни методи дава детайлна оценка на урогениталния микробиом.





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Ключови думи:** уретрален микробиом, неспецифична симптоматика, RT PCR, Androflor® Screen.

## STUDY OF THE URETHRAL MICROBIOME WITH ANDROFLOR® SCREEN IN MEN WITH NONSPECIFIC GENITAL SYMPTOMS IN A COVID-19 PANDEMIC

Hristozova Eli<sup>1,5</sup>, Dermendzhiev Tihomir<sup>1,5</sup>, Rachkovska Zoya<sup>1,5</sup>, Georgieva Vida<sup>2</sup>, Kostadinov Kostadin<sup>3</sup>, Pavlov Tsvetomir<sup>4</sup>, Murdjeva Marianna<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical microbiology and immunology “Prof. Elissey 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 Social Medicine and Public Health, Faculty of Public Health, Medical University – Plovdiv, Bulgaria

<sup>4</sup>Laboratory of Clinical Immunology and Microbiology, Pulmed University Hospital, Plovdiv, Bulgaria

<sup>5</sup>Research Institute at Medical University – Plovdiv, Bulgaria

**Introduction:** Infections of the male genital tract are often asymptomatic or accompanied by nonspecific genital symptoms which facilitate transmission to the partner. The COVID-19 pandemic reduced interest in routine testing for the most common sexually transmitted infections (STIs) such as chlamydia and gonorrhea by up to 69%, increasing the risk of chronic and latent transmission of STIs. Simultaneous detection of obligate and opportunistic pathogens by molecular biological and conventional methods and quantification of urethral microflora are important in polymicrobial infection and the choice of etiotropic therapy.

**Objective:** To establish a quantitative and qualitative assessment of the urethral microbiome using RT-PCR and analyze the results of molecular biological and cultural studies in men with nonspecific genital symptoms during the pandemic of COVID-19.

**Materials and methods:** From January 2021 to March 2022, 49 urethral specimens from outpatients were examined. Clinical, molecular-biological (Androflor® Screen), conventional microbiological, and statistical methods were used.

**Results and discussion:** The leading pathogen was *C. trachomatis* (n = 6; 12%), followed by *M. genitalium* (n = 3; 6%) and *N. gonorrhoeae* (n = 1; 2%). The conditionally pathogenic flora is dominated by *G. vaginalis* (n = 6; 12%) and *U. urealyticum* (n = 3; 6%). Lactobacilli are found in 7 (14%) patients. Mixed infections are more common in *U. urealyticum* and *G. vaginalis*. 4 cases of *S. agalactiae* and 1 with *S. aureus* were proved by conventional methods. 34 (69%) of men had severe dysbiosis, 6 (12%) had moderate dysbiosis, and 9 (18%) - normobiosis.

**Conclusion:** The relative share of obligate and facultatively pathogenic microorganisms in men with nonspecific symptoms is relatively low for both groups. The simultaneous application of conventional and modern methods gives a detailed assessment of the urogenital microbiome.

**Keywords:** urethral microbiome, nonspecific symptoms, RT PCR, Androflor® Screen.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ СПЕЦИФИЧНИТЕ ТИПОВЕ АНТИТЕЛА, ВИРУСНИЯ ТОВАР И ПРОЯВТА НА РАЗЛИЧНИ СИМПТОМИ В ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕЖЕСТТА НА COVID-19

Т. Гладнишка<sup>1</sup>, И. Трифонова<sup>1</sup>, В. Иванова<sup>1</sup>, М. Баймакова<sup>2</sup>, Р. Михайлова<sup>2</sup>, К. Плочев<sup>2</sup>, И. Христова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НЦЗПБ, НРЛ по КПИ, лептоспироза и листериоза

<sup>2</sup>Военномедицинска академия, София

**Ключови думи:** COVID-19, антитела, симптоми.

**Цел:** Да се проучи динамиката на специфичните типове антитела, вирусния товар и проявата на различните симптоми в зависимост от формата на протичане на COVID-19.

**Материали/методи:** Изследвани бяха по пет поредни серумни и по три поредни назофарингеални проби от 12 пациенти с COVID-19, хоспитализирани във ВМА. Първите три серумни, както и назофарингеалните проби бяха взети през една седмица, четвърта серумна проба след 2 месеца, а петата - 3 месеца след предходната. Началото на заболяването при пациентите датираше между втората половина на декември 2021г. и началото на януари 2022г.

**Резултати:** Проведеното изследване върху серуми на пациентите с лека форма на COVID-19 показва най-високи стойности на ИгГ антителата при двама в третата проба, при двама в четвъртата, при един в петата, а при един изобщо не бяха установени ИгГ антитела. Най-високи стойности на ИгГ антителата при пациентите с умерена форма на заболяването бяха намерени при двама пациенти в първата, при един във втората и при един в третата серумна проба. При пациентите с тежък COVID-19, най-високи стойности на ИгГ антителата бяха установени при един във втората и при един в третата проба. Резултатите за ИгМ антителата при лека форма показаха най-високи стойности при един пациент във втората проба, при един в третата, а при четирима не бяха установени ИгМ антитела. При случаите с умерена форма - при двама от пациентите най-високи стойности на ИгМ антителата бяха установени в първата проба, а при останалите двама изобщо не бяха установени ИгМ антитела. При двамата пациенти с тежка форма най-високи стойности на ИгМ антителата се установиха във втората проба. При пациентите с лека форма най-високи стойности на ИгА антителата получихме съответно: при един в първата, при един във втората, при двама в третата и при двама в четвъртата проба. Най-високи стойности на ИгА антителата в случаите с умерена форма бяха установени при трима пациенти в четвъртата и при един в петата проба. В случаите с тежка форма и при двамата пациенти най-високи стойности на ИгА антителата бяха намерени в третата проба. Вирусният товар при леката форма варираше от  $10^2/\text{ml}$  до  $10^6/\text{ml}$ , при умерената и тежката беше между  $10^3/\text{ml}$  и  $10^6/\text{ml}$ . Симптомите, наблюдавани и при трите форми на заболяването при проведеното проучване бяха: кашлица, главоболие, отпадналост, хрема, температура, болки в гърлото, болки в мускулите, като при тежката форма имаше най-голям брой проявени симптоми (12/14).

**Заключение:** При най-много от изследваните пациенти (10/12, 83,3%) беше установено повишаване на ИгГ антителата 14-60 дни след началото на заболяването, съответно при леката форма (4/6, 66,7%) - 14-60 дни след началото, при умерената (4/4, 100%) и при тежката (2/2, 100%) - до 14 дни след началото на заболяването. При най-голям брой пациенти (6/12, 50%) ИгМ антителата достигнаха най-високи стойности до 14 дни след началото на





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

COVID-19: при леката форма (2/6, 33,3%) до 14 дни след началото, при умерената (2/4, 50%) в самото начало на заболяването, при тежката (2/2, 100%) 7 дни след началото. ИгА антителата имаха най-високи стойности при най-много пациенти 14-60 дни след началото (9/12, 75%): при леката форма (6/6, 100%) до 60 дни след началото, при умерената (3/4, 75%) - 60 дни след началото, тежка (2/2, 100%) - 14 дни след началото на заболяването. Вирусният товар беше най-висок в първоначално взетите назофарингеални секрети в случаите с умерена и тежка форма на COVID-19. При пациентите с тежка форма на COVID-19 не беше установено да е проведена ваксинация.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на ФНИ, договор № КП-06-ДК1/7 от 29.03.2021 г. и на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални трансляционни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

### A STUDY ON SPECIFIC ANTIBODY TYPES, VIRAL LOAD AND THE MANIFESTATION OF DIFFERENT SYMPTOMS DEPENDING ON THE SEVERITY OF COVID-19

*T. Gladnishka<sup>1</sup>, Trifonova<sup>1</sup>, V. Ivanova<sup>1</sup>, I. M. Baymakova<sup>2</sup>, R. Mihaylova<sup>2</sup>, K. Plochev<sup>2</sup>, I. Christova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>NCIPD, TBI lab., *Leptospirosis and Listeriosis*

<sup>2</sup>Military Medical Academy

**Key words:** COVID-19, antibodies, symptoms.

**Aim:** To study the dynamics of specific antibody types, viral load and the manifestation of different symptoms depending on the course of COVID-19.

**Materials/methods:** Five consecutive serum samples and three consecutive nasopharyngeal samples were examined from 12 COVID-19 patients hospitalized at the MMA. The first three serum and nasopharyngeal samples were taken in two consecutive weeks, the fourth serum samples - after 2 months and the fifth after 3 months from the previous one. The onset of the disease in the patients was between the second half of December 2021 and the beginning of January 2022.

**Results:** The study on serums of patients with a mild form of COVID-19 showed the highest values of IgG antibodies in two in the third sample, two in the fourth, one in the fifth, and in one no IgG antibodies were found at all. The highest IgG antibody values were found in two patients in the first, one in the second and one in the third serum sample in patients with moderate disease. The highest IgG antibody values were found in one in the second and one in the third sample in patients with severe COVID-19. The results for mild-form IgM antibodies showed the highest values in one patient in the second sample, one in the third and no IgM antibodies were found at all in four patients. The highest IgM antibody values were found in the first sample in two of the patients, and no IgM antibodies were detected at all in the other two patients in cases of moderate form. The highest IgM antibody values were established in the second sample in the two patients with severe form. The highest IgA antibody values we received respectively: one in the first, one in the second, two in the third and two in the fourth sample in patients with mild form. The highest values of IgA



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

antibodies were found in three patients in the fourth sample and one in the fifth sample in moderate cases of the disease. The highest IgA antibody values were found in the third sample in both patients in severe cases. The viral load ranged from  $10^2$ /ml to  $10^6$ /ml in the mild form, in moderate and severe was between  $10^5$ /ml and  $10^6$ /ml. Symptoms observed in all three forms of the disease in the study were: cough, headache, fatigue, runny nose, fever, sore throat, muscle pain, with the greatest number of symptoms manifested in the severe form (12/14).

**Conclusion:** An increase of IgG antibodies was found 14-60 days after the onset of the disease in the most of the patients studied (10/12, 83.3%), respectively in mild form (4/6, 66.7%) - 14-60 days after the onset, in moderate (4/4, 100%) and in severe (2/2, 100%) - up to 14 days after the onset of the disease. IgM antibodies reached the highest values up to 14 days after the onset of COVID-19 in the highest number of patients (6/12, 50%): in mild form (2/6, 33.3%) up to 14 days after onset, in moderate (2/4, 50%) at the very onset of the disease, in severe (2/2, 100%) 7 days after onset. IgA antibodies had the highest values 14-60 days after onset in the most patients (9/12, 75%): in mild form (6/6, 100%) up to 60 days after the start, in moderate (3/4, 75%) - 60 days after the onset, severe (2/2, 100%) - 14 days after the onset of the disease. The viral load was highest in the initially taken nasopharyngeal secretions in cases of moderate and severe form of COVID-19. No vaccination was found in patients with severe COVID-19.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by National Research Foundation, contract No. KP-06-DK1/7 of 29.03.2021 and by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

### СЕРОЕПИДЕМИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА НАЛИЧИЕ НА ЗАЩИТЕН ИМУНИТЕТ СРЕЩУ ПАРОТИТЕН ВИРУС ПРИ ДЕЦА В БЪЛГАРИЯ

*Р. Стефанова<sup>1</sup>, И. Андонова<sup>1</sup>, П. Генова-Калу<sup>1</sup>, Ст. Крумова<sup>1</sup>*

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

Епидемичният паротит е остра вирусна инфекция, характеризираща се със специфично подуване на паротитната жлеза и треска, засяга предимно деца на възраст 5-9 години. Най-честите послевирусни усложнения са менингит и орхит. Смята се, че естествената инфекция и/или имунизация осигурява защита през целия живот. Проучвания в няколко страни преди прилагането на широкомащабна детска ваксинация показват, че серопревалентността на антителата срещу паротитния вирус достига приблизително 90% при лица на възраст 14-15 години.

**ЦЕЛ:** Да се проучи наличието на защитен имунитет (доказване на специфични IgG антитела) срещу паротитен вирус сред деца до 16 годишна възраст в България.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ:** В настоящото изследване са включени 737 серумни проби от деца на възраст от 1 до 16 от всички региони на страната. Използвани са имуноензимни (доказване на специфични паротит IgG антитела чрез ELISA анализ) методи с цел определяне на ниво на защитен имунитет. Изследваните серумни проби са остатъчен



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

материал от проведено национално сероепидемично проучване за наличие на колективен имунитет срещу морбили и рубеола.

**РЕЗУЛТАТИ:** Сред изследваните 737 пациенти, наличие на защитен имунитет срещу паротит е определен при 684/737 (93%), липса на такъв или изчислени гранични стойности са определени респективно при 53/737 (7%). Най-нисък процент на защитеност е отчетен при деца във възрастовата група 10-16 години.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Прилаганата редовна задължителна имунизация срещу паротитен вирус стои в основата на осигуряване на колективен имунитет и специфична профилактика.

**Ключови думи:** епидемичен паротит, ELISA IgG, имунизация

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## SEREO-EPIDEMIC STUDY FOR THE PRESENCE OF PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST MUMPS VIRUS IN CHILDREN IN BULGARIA

*R. Stefanova<sup>1</sup>, I. Andonova<sup>1</sup>, Petia Genova-Kalou<sup>1</sup>, St. Krumova<sup>1</sup>*

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

### Subject: 6. VACCINE-PREVENTABLE INFECTIONS

Mumps is an acute viral infection characterized by specific swelling of the mumps gland and fever, , mainly affecting children aged 5-9 years. The most common post-viral complications are meningitis and orchitis. Natural infection and/or immunization are thought to provide lifelong immunity. Studies in several countries prior to large-scale childhood vaccination have shown that the seroprevalence of mumps protective antibodies is approximately 90% in individuals aged 14-15 years.

**AIM:** To study the presence of protective immunity (detection of specific viral IgG antibodies) against mumps virus among children under 16 years of age in Bulgaria.

**MATERIAL AND METHODS:** The present study included 737 serum samples from children aged 1 to 16 from all regions of the country. Immunoenzymatic methods (detection of specific mumps IgG antibodies by ELISA analysis) were used to determine the level of protective immunity. The tested serum samples are residual material from a national sero-epidemic study for the presence of collective immunity against measles and rubella.

**RESULTS:** Among the total 737 patients tested, the presence of protective immunity against mumps virus was determined in 684/737 (93%), the absence of such or calculated limit values were determined in 53/737 (7%), respectively. The lowest percentage of protection is reported in children in the age group 10-16 years.

**CONCLUSION:** Regular mandatory immunization against mumps virus is the basis for providing collective immunity and specific prophylaxis.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Keywords:** mumpsIgG ELISA, immunization

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

### GI.17 KAWASAKI ОТНОВО ПРИЧИНИТЕЛ НА ЕПИДЕМИЧЕН ВЗРИВ У НАС

Ася Стоянова<sup>1</sup>, Ирина Георгиева<sup>1</sup>, Райна Сапаревска<sup>2</sup>, Любомира Николаева-Гломб<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НРЛ "Ентеровируси", НЦЗПБ, София;

<sup>2</sup>РЗИ-Кюстендил, база Дупница

**Цел.** Установяване на етиологичния причинител на епидемичен взрив от гастроентерит във филиал на детска градина "Св. Анна" в с. Ресилово, обл. Кюстендил.

**Материали и методи.** В лабораторията са получени и изследвани общо 22 фекални проби от деца и персонал на детската градина (n=18 деца и n=4 персонал). За детекция на вирусния причинител е приложена мултиплексна *RT-PCR* със специфични двойки праймери, откриващи най-честите вирусни причинители на гастроентерит (норовируси, ротавируси, саповируси, чревни аденовируси и чревни астровируси). Генотиповата принадлежност на доказаните норовируси е установена чрез секвениране и последващ филогенетичен анализ на част от гена, кодиращ големия капсиден протеин на норовирусите.

**Резултати.** В пет проби на деца и в една проба от персонал (6/22) или в 27,3% от материалите бе установен норовирус от геногрупа II. По критериите на СЗО това доказва, че норовирусите са причинили епидемичния взрив. Доказаните норовируси са подложени на секвениране и последващ филогенетичен анализ, като данните установяват генотип 17 (GI.17) (Kawasaki) като етиологичен агент.

**Заключение.** Норовирус генотип 17 (GI.17) (Kawasaki) е установен като доминиращ през 2014 г. в Италия и още няколко страни по света, а появата му у нас е доказана през 2015 г. като причинител на епидемичен взрив в училище в гр. Правец. Повторното установяване на този генотип на норовирусите като причинител на епидемичен взрив от гастроентерит у нас доказва продължаваща му циркулация сред населението. С цел опазване на общественото здраве е нужен непрекъснат мониторинг и целенасочено търсене на вирусни чревни агенти, независимо от преходността и лекотата на протичане на заболяването.

**Ключови думи:** мултиплексна RT-PCR, секвениране, епидемичен взрив

Лице за контакт: Ася Петрова Стоянова, Национална референтна лаборатория „Ентеровируси“, Отдел Вирусология, НЦЗПБ София, бул. Столетов 44А, 1233, тел +359 2 831 00 42

#### БЛАГОДАРНОСТИ



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## GII.17 KAWASAKI AGAIN CAUSES AN EPIDEMIC OUTBREAK

Asya Stoyanova<sup>1</sup>, Irina Georgieva<sup>1</sup>, Rayna Saparevska<sup>2</sup>, Lubomira Nikolaeva-Glomb<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NRL “Enteroviruses”, NCIPD, Sofia;

<sup>2</sup>RHI-Kyustendil

**Objective.** To detect the etiological cause of a gastroenteritis outbreak in "St. Anna" kindergarten in the village of Resilovo, region Kyustendil.

**Materials and Methods.** A total of 22 faecal specimens from children and staff were tested (n = 18 children and n = 4 staff). Multiplex RT-PCR with specific primer pairs detecting the most common viral causes of gastroenteritis (noroviruses, rotaviruses, sapoviruses, intestinal adenoviruses and intestinal astroviruses) was applied to detect the viral causative agent. The detected noroviruses were sequenced and subsequent phylogenetic analysis was carried out.

**Results.** Genogroup II nonoviruses were detected in five samples from children and in one sample from staff (6/22) or in 27.3% of the specimens. According to WHO criteria, this proves that noroviruses have caused the epidemic outbreak. Detected noroviruses were subjected to sequencing and subsequent phylogenetic analysis, with data identifying genotype 17 (GII.17) (Kawasaki) as the causative agent.

**Conclusion.** Norovirus genotype 17 (GII.17) (Kawasaki) was established as the dominant one in 2014 in Italy and several other countries around the world, and its appearance in Bulgaria was proven in 2015 as the causative agent of an outbreak in a secondary school in the town of Pravets. The re-establishment of this norovirus genotype as the causative agent of an epidemic gastroenteritis outbreak proves its continued circulation among the population. In order to protect public health, continuous monitoring and targeted search for viral intestinal agents is essential, regardless of the transient and usually mild course of the disease.

**Key words:** multiplex RT-PCR, sequencing, epidemic outbreak

## ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

## ЧОВЕШКИ ЕНТЕРОВИРУС – СЛУЧАЙНА НАХОДКА ИЛИ ПРИЧИНИТЕЛ НА ЗАБОЛЯВАНЕ: КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

В. Кирева<sup>1</sup>, И. Георгиева<sup>2</sup>, А. Стоянова<sup>2</sup>, И. Пачева<sup>3</sup>, И. Иванов<sup>3</sup>,





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Л. Николаева-Гломб<sup>2</sup>, Й. Калчев<sup>4,5</sup>, М. Атанасова<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория по вирусология, УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив;

<sup>2</sup>НРЛ „Ентеровируси“, НЦЗПБ, София;

<sup>3</sup>Детска клиника, УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив;

<sup>4</sup>Катедра по медицинска микробиология и имунология „проф. д-р Елисей Янев“, Фармацевтичен факултет, Медицински университет – Пловдив;

<sup>5</sup>Лаборатория по микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив.

**Цел:** Да се анализира причинно-следствената връзка между лабораторно доказан ентеровирус и развитието на реактивен артрит с оформяне на моторен дефицит.

**Клиничен случай:** Момче на 2 г. 9 м. постъпва в Детска клиника към УМБАЛ „Св. Георги“ Пловдив, по повод на еднократно повръщане, обща слабост и скована походка. Статус при приемане: леко хиперемирани небни дъги и слузен секрет по задна фарингеална стена. При престоя остава трайно афебрилен и в добро общо състояние. На втория ден се оформя левостранна хемипареза, преминала за 24 ч. Липсват симптоми на менингоградикулерно дразнене, патологични рефлексии и патологични прояви от страна на черепно-мозъчните нерви. Компютърната аксиална томография на глава с ангиография не показва данни за кръвоизливи и исхемични мозъчни инциденти. Във фецес и ликвор чрез полимеразно-верижна реакция се доказват ентеровируси. Не се изолират жизнеспособни ентеровируси в клетъчни култури. В носен секрет се изолира *S. pneumoniae*. На 5-ия ден ехографски се установява лек излив в медиалния речесус на лява глезенна става и задебелена ставна повърхност. Назначена е терапия с тромболитици, антиагреганти, нестероидни противовъзпалителни средства и хинолонов антибиотик. Приема се, че се касае за реактивен артрит.

**Заключение:** Доказаният едновременно в ликвор и фецес ентеровирус налага диференциално-диагностично обсъждане за ролята на вируса в бързопреходния моторен дефицит.

**Ключови думи:** ентеровирус, ликвор, реактивен артрит.

**Адрес за кореспонденция:** д-р Венета Кирева, Лаборатория по вирусология, УМБАЛ „Св. Георги“, гр. Пловдив, с база на обучение НЦЗПБ, гр. София  
E-mail: venetakireva@gmail.com, тел: 0895900094

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## HUMAN ENTEROVIRUS – AN ACCIDENTAL FINDING OR THE CAUSATIVE AGENT: A CLINICAL CASE

V. Kireva<sup>1</sup>, I. Georgieva<sup>2</sup>, A. Stoyanova<sup>2</sup>, I. Pacheva<sup>3</sup>, I. Ivanov<sup>3</sup>,  
L. Nikolaeva-Glomb<sup>2</sup>, Y. Kalchev<sup>4,5</sup>, M. Atanasova<sup>1,4</sup>



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

<sup>1</sup>Laboratory of Virology, St. George University Hospital, Plovdiv;

<sup>2</sup>National Reference laboratory for Enteroviruses, National Center for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia;

<sup>3</sup>Clinic of Pediatrics, St. George University Hospital, Plovdiv;

<sup>4</sup>Department of medical microbiology and immunology Prof. Dr. Elissay Yanev;

<sup>5</sup>Laboratory of microbiology, St. George University Hospital, Plovdiv.

**Objective:** To analyze the causal relationship between laboratory-proven enterovirus and the development of reactive arthritis with motor deficiency.

**Clinical case:** A 2-year-old boy was admitted to the Clinic of Pediatrics, St. George University Hospital, Plovdiv, on the occasion of a single episode of vomiting, general weakness and spastic gait. Status at admission: slightly hyperemic palatine arches and mucus secretion on the posterior pharyngeal wall. During the stay the child was permanently afebrile and in good general condition. On the second day, left-sided transient hemiparesis developed, which passed in 24 hours. No symptoms of meningoradicular irritation, pathological reflexes and pathology of the cranial nerves were registered. Axial computed tomography with angiography of the head showed no evidence of hemorrhage and ischemic stroke. Enteroviruses were detected in faeces and cerebrospinal fluid by the polymerase chain reaction. No viable enteroviruses were isolated in cell cultures. *S. pneumoniae* was isolated from the nasal secretion. On the 5th day, an ultrasound exam revealed a slight effusion in the left ankle joint and a thickened joint surface. Therapy with thrombolytics, antiplatelet agents, non-steroidal anti-inflammatory drugs and quinolone antibiotics were prescribed. Reactive arthritis was the final diagnosis.

**Conclusion:** Enteroviruses, detected both in cerebrospinal fluid and feces, impose a differential diagnostic thinking about the role of the virus in the observed transient motor deficit.

**Key words:** enterovirus, cerebrospinal fluid, reactive arthritis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

#### МАРКЕРИ ЗА ХЕПАТИТ Е ВИРУС И ДРУГИ ХЕПАТИТНИ КОИНФЕКЦИИ ПРИ ХЕМОДИАЛИЗНИ ПАЦИЕНТИ

Ч. Исмаилова<sup>1</sup>, В. Йончева<sup>1</sup>, Т. Тенев<sup>1</sup>, А. Кеворкян<sup>2</sup>, Р. Комитова<sup>3</sup>, Т. Костадинова<sup>4</sup>, В. Цеков<sup>4</sup>, Ц. Чардакова<sup>5</sup>, С. Сариян<sup>6</sup>, Е. Голкочева-Маркова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НРЛ „Хепатитни вируси“, НЦЗПБ, София

<sup>2</sup>Катедра „Епидемиология и Медицина на бедствениите ситуации“, Медицински университет – Пловдив

<sup>3</sup>Катедра "Инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина"  
Медицински университет - Пловдив

<sup>4</sup>Фърст Диализис Сървисиз България – Пловдив



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

<sup>5</sup>Фърст Диализис Сървисиз България – Пазарджик

<sup>6</sup>Медицински факултет Медицински университет – Пловдив

**Въведение:** Инфекциите с кръвнопреносими вирусни хепатити (HBV и HCV) представляват значими причини на чернодробни заболявания при пациенти в последен стадий на бъбречна недостатъчност, подложени на хемодиализа (HD). През последните години превантивните мерки и обширните насоки за контрол на тези инфекции са предпоставка за намаляване честотата на HCV и HBV при тези пациенти. Вирусът на хепатит E (HEV) представлява сериозен здравен проблем, според данни на Световната Здравна Организация (СЗО) всяка година възникват 20 милиона нови инфекции с вируса. При здрави индивиди, инфекцията с ХЕВ обикновено протича асимптоматично, но при някои рискови групи, каквито са пациентите на хемодиализа, може да се стигне до усложнения и развиване на хронична инфекция. Вирусът има два пътя на трансмисия, за Европа основният път е чрез консумацията на недобре термично обработено контаминирано месо от диви и домашни прасета. Друг възможен начин на разпространение на инфекцията е чрез кръв и кръвни продукти по време на медицински интервенции. Целта на настоящото проучване е да се оцени разпространението на маркерите за HEV и коинфекциите с хепатитните вируси HBV / HCV при хемодиализни пациенти.

**Материали и методи:** В проучването са включени 145 пациенти на HD от които 70 (48%) жени и 75 (52%) мъже. Серумите са изследвани по метода ELISA с търговските марки Dia Pro и Euroimmun. Съответно търсените маркери са: антитела от клас Ig M и Ig G срещу хепатит E, антитела и антигени срещу вирусът на хепатит B (HB core total/HbsAg) и антитела срещу хепатит C. Положителните за HEV IgM/HBsAg /HBcore total/ HCV Ab серуми, бяха тествани чрез полимеразна верижна реакция (RT-PCR) за откриване на вирусна нуклеинова киселина.

**Получени резултати:** От изследваните 145 проби, положителни за антитела срещу HEV са 11% (16/145). При положителните проби разпределението на антителата е както следва: 44% (7/16) от пробите са положителни за HEV IgM и 75% (12/16) за HEV Ig G. В положителните проби за антитела не се установи HEV РНК. Пробите са тествани и за хепатитните вируси B и C. Маркери за HBV инфекция се откриват в 47% (69/145) проби. Резултатите от маркерите, показващи HBV инфекция са: HBs Ag 13% (9/69); HBcore общо 95% (66/69) и HBV ДНК 10% (7/69). За HCV при 7% (11/145) се установяват положителни маркери. Всички те са HCV Ab положителни -100% (11/11) и 27% (3/11) са HCV РНК положителни. Едновременно присъствие на маркери за HEV и HBV се установи в 5% (8/145) от серумите, а за HEV/HCV в 0,7% (1/145). Разпределението на маркерите в зависимост от пола е следното: При мъжете установихме, че 10% (8/75) са положителни за HEV, 49% (37/75) за HBV и 5% (4/75) за HCV. При жените 11% (8/70) от пробите са положителни за HEV, 45% (32/70) за HBV и HCV- 10% (7/70).

**Изводи:** При пациентите на хемодиализа се установява повишено разпространение на маркери за инфекция с HEV/HBV/HCV. Установеният висок процент на тези маркери при лица, подложени на HD, налага необходимостта от по-задълбочени изследвания в тази област.

**Благодарности:** Проучването е осъществено в рамките на проект КП-06-Н-33/2, финансиран от ФНИ, проект NO-02/2020, финансиран от Медицински Университет – Пловдив и Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

**Ключови думи:** хемодиализа, хепатит Е, коинфекции

## MARKERS OF HEPATITIS E VIRUS AND OTHER HEPATITIS COINFECTIONS IN HEMODIALYSIS PATIENTS

Ch. Ismailova<sup>1</sup>, V. Yontcheva<sup>1</sup>, T. Tenev<sup>1</sup>, Ani Kevorkyan<sup>2</sup>, Radka Komitova<sup>3</sup>, Tania Kostadinova<sup>4</sup>, Valeri Tsekov<sup>4</sup>, Tsvetelina Chardakova<sup>5</sup>, Sara Sariyan<sup>6</sup>, E. Golkocheva-Markova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NRL “Hepatitis virus”, NCIPD

<sup>2</sup>Department of Epidemiology and Disaster Medicine, Medical University – Plovdiv

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

<sup>4</sup>Фърст диализис център, Plovdiv – Plovdiv

<sup>5</sup>First Dialysis Service, Pazardzhik – Pazardzhik

<sup>6</sup>Faculty of medicine, Medical University – Plovdiv

**Background:** Infections with blood-borne viral hepatitis (HBV and HCV) are significant causes of liver disease in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis (HD). In recent years, preventive measures and extensive guidelines for the control of these infections have been a prerequisite for reducing the incidence of HCV and HBV in these patients. The hepatitis E virus (HEV) is an important public health concern, with the World Health Organisation (WHO) estimating 20 million new infections each year. In the most cases in healthy individuals HEV infection is asymptomatic, however in some individual the infection has poor prognosis and can lead to chronic infection. There are two different types of HEV transmission, with the main route for Europe being through the consumption of poorly cooked contaminated meat from pigs and wild boars. Another transmission pathway is through unscreened blood and blood products during medical procedures. The aim of the present study is to evaluate the HEV and HBV/HCV prevalence in patients on HD.

**Materials and methods:** In our study we investigated 145 patients on HD: 70 (48%) female and 75 (52%) male. The sera were tested for markers against three hepatitis viruses – HEV (HEV Ig M/G), HBV (HBsAg/HBcore Ab) and HCV (HCV IgG). We used ELISA tests under the trademarks Dia Pro and Euroimmun. Respectively, the markers we studied were: Ig M and Ig G antibodies against hepatitis E, antibodies and antigens against hepatitis B virus (HB core total / HbsAg) and antibodies against hepatitis C. HEV IgM / HBsAg / HBcore total / HCV Ab positives samples were tested by polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect viral nucleic acid.

**Results:** Of the 145 samples that we received, 11% (16/145) were positive for HEV Ab. In the positive samples the distribution of the antibodies is as follows: 44% (7/16) HEV IgM and 75% (12/16) for HEV Ig G. We did not detect viral RNA in the positive sera. The samples were subsequently tested for other hepatitis viruses: HBV and HCV. Markers of HBV infection are detected in 47% (69/145) samples. The results from the markers indicating HBV infection are: HBs Ag 13% (9/69); HBcore total 95% (66/69) and HBV DNA 10% (7/69). For HCV 7% (11/145) were



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

found positive. All of them were HCV Ab positive 100% (11/11) and 27% (3/11) for HCV RNA. Simultaneous establishment HEV/HBV markers were detected in 5% (8/145) of the samples and HEV/HCV markers were detected in 0.7% (1/145). The distribution of markers in male and female are as follows: In male we found that 10% (8/75) were positive for HEV, 49% (37/75) for HBV and 5% (4/75) for HCV. In females 11% (8/70) for HEV, 45% (32/70)- HBV and HCV- 10% (7/70).

**Conclusion:** The hemodialysis patients are associated with increased seroprevalence of HEV and HBV/HCV. The high percentage of these viruses in individuals undergoing HD, imposes the need for more in-depth research.

**Acknowledgment:** The study was carried out within the project KP-06-H-33/2, funded by the FNI, project NO-02/2020, funded by the Medical University – Plovdiv and Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

**Key words:** hemodialysis, hepatitis E virus, coinfection

## ОЦЕНКА НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА АНТИТЕЛА СРЕЩУ ХЕПАТИТ Е В СБОРНИ ПЛАЗМИ – НАЧАЛНО ПРОУЧВАНЕ И ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

*В. Йончева, Ч. Исмаилова, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова*

*НРЛ „Хепатитни вируси“, НЦЗПБ, София*

В България Хепатит Е вирусната инфекция (HEV) има зоонозен характер, като заразяването обикновено става чрез консумация на контаминирани храни и води или при контакт с тях. При имунокомпетентни индивиди инфекцията обикновено протича асимптоматично и самоограничаващо се. По литературни данни разпространението на маркери за отминала HEV инфекция сред общата популация варира между 9% до 16%. Ето защо, не е изненадващо, че HEV се доказва и в донор кръв и кръвни продукти което е фактор за разпространение на HEV и по кръвен път. В същото време е установено, че в България разпространението на антитела от клас IgG срещу HEV сред кръвни донори варира от 28.8% (в Шумен) до 21.3% (в София).

### ЦЕЛ:

Цел на настоящото проучване е да се оцени разпространението на антитела от класовете IgG и IgM срещу HEV в кръвен продукт - сборна плазма.

Ключови думи: HEV, сборни плазми, кръвни продукти

### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследвани са общо 23 сборни плазми, постъпили в НРЛ Хепатитни вируси за скриниране по отношение на хепатит Е вируса. Всички получени материали са изследвани по метода ELISA за наличие на антитела от класовете IgG и IgM срещу HEV (anti-HEV IgG /





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

IgM , Euroimmune, Germany). Използвания тест е с 97.8% специфичност и 100% чувствителност.

## РЕЗУЛТАТИ

От изследваните – 23 сборни плазми, 5 (21%) са положителни за HEV – IgG. Нито една от петте проби не даде положителен резултат за наличие на антитела от клас IgM.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данните от нашето проучване показват висок процент (21,7%) на разпространение на anti-HEV IgG сред сборни плазми като кръвен продукт . Резултатите от настоящото проучване съответстват на данните, описвани от други изследователи.

Това проучване представлява първоначално скриниране по отношение на разпространението на антитела срещу HEV от класовете IgG и IgM сред кръвни продукти в България. Това от своя страна е предпоставка за провеждане на по- задълбочени изследвания по отношение на HEV сред кръвните донори, с цел изработване на превантивни мерки за намаляване риска от заразяване с HEV чрез кръв и кръвни продукти.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## ASSESSMENT OF PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST HEPATITIS E VIRUS IN PLASMAS –PILOT RESEARCH AND LITRETURE REVIEW

*V. Iontcheva, Ch. Ismailova, T. Tenev, E. Golkocheva – Markova*

*NRL “Hepatitis viruses”, NCIPD, Sofia*

In Bulgaria, Hepatitis E virus (HEV) infection is zoonotic, with infection usually occurring through consumption of or contact with contaminated food and water. In immunocompetent individuals, infection is usually asymptomatic and self-limiting. The prevalence of markers of past HEV infection in the general population has been reported in the literature to range from 9% to 16%. Therefore, it is not surprising that HEV is also evidenced in donor blood and blood products which is a factor in the spread of HEV via the blood route. At the same time, the prevalence of IgG class antibodies to HEV among blood donors in Bulgaria has been found to range from 28.8% (in Shumen) to 21.3% (in Sofia)

**AIM:** The aim of the present study was to evaluate the prevalence of antibodies of IgG and IgM classes against HEV in a blood product - pooled plasma.

Key words: HEV, plasmas, blood products

### **MATERIALS AND METHODS:**

23 plasmas, which were sent in NRL “Hepatitis viruses” for screening for Hepatitis B virus, were also tested for anti – HEV IgM and IgG antibodies, using ELISA method (Euroimmune, Germany). The used tests have high sensitivity (100%) and specificity (97.8%).



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## RESULTS:

five (21%) from all tested 23 plasmas were positive for anti – HEV – IgG. These five plasma samples were additionally tested for HEV – IgM antibodies, but none of them gave the positive results for this marker.

## CONCLUSION:

Data from our study showed a high prevalence (21.7%) of anti-HEV IgG among pooled plasma as a blood product. The results of the present study are consistent with data described by other investigators. This study represents an initial screening regarding the prevalence of anti-HEV antibodies of IgG and IgM classes among blood products in Bulgaria. This, in turn, is a prerequisite for conducting more in-depth studies regarding HEV among blood donors in order to develop preventive measures to reduce the risk of HEV infection through blood and blood products.

## ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

## ВЛИЯНИЕ НА СЛЮНЧЕНАТА КОЛОНИЗАЦИЯ НА *S. AREUS* ПРИ ТЕЖКИ АСТМАТИЦИ

*Диана Христова<sup>1</sup>, Антоанета Дечева<sup>2</sup>, Радослава Емилова<sup>1</sup>, Яна Тодорова<sup>1</sup>, Милена Алексова<sup>1</sup>, Мария Николова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Национална референтна лаборатория по имунология, Национален център по заразни и паразитни болести - София (България)

<sup>2</sup>Национална референтна лаборатория по чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия, Национален център по заразни и паразитни болести - София (България)

**Въведение.** IgE е критичен компонент при тежката астма. Серумният IgE, специфичен за стафилококови ентеротоксини, е открит при астматици и може да предскаже развитието на тежка астма. Голяма част от серумния IgE може да бъде получен локално в лигавицата. Целта на изследването е да се провери хипотезата дали нивата на IgE в слюнката могат да бъдат повлияни от колонизацията със *S. aureus*

**Методи.** Набрахме 16 пациенти с астма на биологично лечение от най-малко 3 години и 12 здрави контроли, съвпадащи по възраст и пол. Всеки участник предостави нестимулирана слюнка. Концентрациите на IgE, IgM и sIgA в слюнката бяха измерени с помощта на китове CLIA (Abbexa and Elabscience) съобразно инструкциите на производителя. Извърши се микробиологично изследване за доказване на *S. aureus* в слюнка на кръвен агар.

**Резултати.** Сред всички изследвани участници *S. aureus* е изолиран само при четирима астматици. Трима от тях с анамнеза за лечение със стероиди. Колонизацията на *S. aureus* в слюнката е обратно пропорционална на нивото на IgM ( $p=0.04$ ,  $r=-0.5$ ). Установи се и положителна корелация между s IgA и общия слюнчен IgE ( $p=0.01$ ,  $r=0.7$ ). Няма значима разлика в общите нива на IgE в слюнката между *S. aureus*-позитивни и *S. aureus* – негативни астматици.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Заклучение.** При тежки астматици наличието на *S. aureus* в слюнка е свързано с повишено ниво на IgM в слюнката. Не беше открита значима връзка между общия IgE или sIgA на слюнката и наличието на *S. aureus*. Малкият брой пациенти е ограничението на нашето проучване.

**Ключови думи:** тежка астма, Ig E, *S. aureus* в слюнка

*Благодарности:* Проучването е подкрепено от Европейския фонд за регионално развитие чрез Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04

## INFLUENCE OF SALIVARY *S. AREUS* COLONIZATION IN SEVERE ASTHMATICS

Diana Hristova,<sup>1</sup> Antoaneta Decheva<sup>2</sup>, Radoslava Emilova<sup>1</sup>, Yana Todorova<sup>1</sup>, Milena Aleksova<sup>1</sup>, Maria Nikolova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Reference Laboratory of Immunology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases - Sofia (Bulgaria)

<sup>2</sup>National Reference Laboratory of Enteric infections, pathogenic cocci and diphtheria, National Center of Infectious and Parasitic Diseases - Sofia (Bulgaria)

**Background.** IgE is a critical component of severe asthma. Serum IgE specific for Staphylococcal enterotoxins has been detected in asthmatics may predict the development of severe asthma. Nearly all of the serum IgE may be derived from mucosal sites.

The aim of the study was to check the hypothesis that saliva IgE levels might be influenced by *S. aureus* colonization

**Methods.** We recruited 16 asthmatic patients on biological treatment for at least 3 years and 12 healthy controls, age and sex matched. Each participant provided unstimulated saliva. Salivary IgE, IgM, and sIgA concentrations were measured using CLIA kits (Abbexa and Elabscience) after manufacturer's instructions. The microbiological examination of saliva for *S. aureus* was carried out on blood agar.

**Results.** Among all tested participants, *S. aureus* was isolated only in 4 asthmatics. Three of them had a history of steroid treatment. Salivary *S. aureus* colonization was inversely related to the level of IgM ( $p=0.04$ ,  $r=-0.5$ ). A positive correlation was found between sIgA and total salivary IgE ( $p=0.01$ ,  $r=0.7$ ). There was no significant difference in total saliva IgE levels between *S. aureus*-positive and *S. aureus* – negative asthmatics.

**Conclusion.** In severe asthmatics, salivary *S. aureus* colonization is associated with increased IgM level in saliva. No significant association between total saliva IgE or sIgA and *S. aureus* colonization was found. The small number of patients is the limitation of our study.

**Key words:** severe asthma, Ig E, salivary *S. aureus*

**Acknowledgments:** The study is supported by the European Fund for regional development through Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04

## ПРОБЛЕМЪТ *V. VULNIFICUS* В АКВАТОРИЯТА НА БЪЛГАРСКОТО ЧЕРНОМОРИЕ

Р. Ненова<sup>1</sup>, И. Томова<sup>1</sup>, Г. Крумова-Вълчева<sup>2</sup>, П. Орозова<sup>2</sup>



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

<sup>1</sup>НЦЗПБ, София

<sup>2</sup>НДНИВМИ, София

*Vibrio vulnificus* е човешки патоген, част от групата на халофилните вибриони, обитаващ топли морски води. Може да причини два различни синдрома. Първият е първична септицемия, след консумация на сурови или недостатъчно обработени морски дарове, особено сурови стриди. Много често се наблюдава и появата на водниста диария, придружена със симптоми на стомашно-чревна инфекция. Вторият е некротизираща ранева инфекция, когато отворена рана е изложена на топла морска вода с високи концентрации на *V. vulnificus*. Повечето пациенти, включително тези с първична инфекция, развиват сепсис и тежък целулит. Понякога може да се наблюдава некротизиращ фасциит. По литературни данни смъртните случаи при първична септицемия достигат над 50% и до около 15% при раневи инфекции.

В настоящата работа, *V. vulnificus* е изолиран от проби взети в българската морска акватория и е идентифициран чрез MALDI-TOF-MS. Извършено е сравнение чрез PCR анализ с докладван през 2020г клиничен изолат от фатално завършила ранева инфекция при имунокомпроментиран пациент. Проверена е и антибиотичната чувствителност на щамовете. Анализът демонстрира съществуващият реален риск от възникване на *V. vulnificus* раневи инфекции по Българското Черноморие през летните месеци на годината, когато температурата на водата надвишава 20°C.

**Ключови думи:** *Vibrio vulnificus*, морска вода, ранева инфекция, MALDI-TOF- MS, PCR

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## THE *V. VULNIFICUS* PROBLEM IN WATERS FROM THE BULGARIAN BLACK SEA COAST

R. Nenova<sup>1</sup>, I. Tomova<sup>1</sup>, G. Krumova-Valcheva<sup>2</sup>, P. Orozova<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute. Sofia, Bulgaria

*Vibrio vulnificus* is a human pathogen, part of the group of halophilic vibrios, inhabiting warm sea waters. This pathogen causes two distinct syndromes. The first is an overwhelming primary septicemia caused by consuming raw or undercooked seafood, particularly raw oysters. Watery diarrhea is often observed, accompanied by symptoms of gastrointestinal infection. The second is a necrotizing wound infection acquired when an open wound is exposed to warm sea water with high concentrations of *V. vulnificus*. Most patients, including those with primary infection, develop sepsis and severe cellulitis. In severe cases, necrotizing fasciitis can be observed. According to literature



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

data case-fatality rates are greater than 50 percent for primary septicemia and about 15 percent for wound infections.

In the present work, *V.vulnificus* was isolated from Bulgarian sea coast water samples and was identified by MALDI-TOF-MS. Comparison by PCR analysis was performed with a clinical isolate from an immunocompromized patient with fatal outcome after wound infection, reported in 2020. The antibiotic susceptibility of the isolates was also tested.

The analysis demonstrates the real risk of *V.vulnificus* wound infections on the Bulgarian Black Sea coast during summer months, when water temperature exceeds 20°C.

**Key words:** *Vibrio vulnificus*, sea water, wound infection, MALDI-TOF-MS, PCR

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## ПОСТЕРНА СЕСИЯ III

### РАЗРАБОТВАНЕ И ПРИЛОЖЕНИЕ НА МЕТОД ЗА ГЕНЕТИЧНА ДЕТЕКЦИЯ НА *ENTEROBIUS VERMICULARIS* В ПРОБИ НА ПАЦИЕНТИ С ЕНТЕРОБИОЗА

Е. Кънева<sup>1</sup>, Н. Цветкова<sup>1</sup>, Д. Велчева<sup>2</sup>, Р. Харизанов<sup>1</sup>, И. Кафтанджиев<sup>1</sup>, Р. Борисова<sup>1</sup>, М. Виденова<sup>1</sup>, А. Иванова<sup>1</sup>, И. Алексиев<sup>1</sup>, Р. Димитрова<sup>1</sup>, М. Павлова<sup>1</sup>, Е. Александрова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НЦЗПБ, София, България

<sup>2</sup> МДЛ „Цибалаб“, София, България

**Ключови думи:** *Enterobius vermicularis*, молекулярно определяне, nested PCR.

**Въведение.** *Enterobius vermicularis* е чревен паразит с космополитно разпространение и заболяването, което причинява (ентеробиоза), е едно от най-често срещаните. Според оценка на състоянието на паразитните болести в България това е най-масовата паразитоза и в нашата страна, и в сравнение с предходни години се отчита значително нарастване на случаите на инвазирани лица, което налага да бъдат предприети действия за подобряване на мерките за надзор и контрол. Обобщеният анализ на информацията в литературата показва, че молекулярните проучвания за характеризиране на *Enterobius vermicularis* в световен мащаб са ограничени, а доколкото ни е известно такива в България не са извършвани до момента.

**Цел** на настоящото проучване е да се разработи и апробира метод за видова молекулярно-биологична идентификация на паразита в проби от пациенти, инвазирани с *Enterobius*, получени от различни области на страната.

**Материали и методи.** На основата на съществуващи в литературата протоколи, е разработен и внедрен nested PCR метод за детекция на *Enterobius vermicularis* в проби от пациенти с ентеробиоза (перианален отпечатък, съдържащ паразитни яйца) и са дефинирани оптималните условия за изолиране и амплификация на ДНК.

**Резултати.** В резултат на трикратно замразяване/размразяване на паразитните яйца, поставени в стерилен физиологичен разтвор, е изолирана ДНК на паразита с много добра чистота и в достатъчно количество. Използван е AmpliTaqGold 360 Master Mix, в който допълнително е включен GC Enhancer (за матрици с високо GC съдържание) за оптимизиране на условията на PCR. Методът за молекулярно определяне е приложим както за възрастните форми на *Enterobius*, така и за отделяните от женските острици яйца, получени след хелминтоовоскопия на перианалния отпечатък.

**Изводи.** Приложението на генетичните методи за идентификация на *Enterobius* може да послужи като база за провеждане на филогенетичен и молекулярно-епидемиологичен анализ на паразита. Това ще даде възможност да се получат данни за разпространението в нашата страна генотипове и за наличието на различия в начина на протичане на заболяването.

#### Благодарности

Проучванията са извършени по проект №КП-06-Н53/4 от 11.11.2021 г., финансиран от ФНИ – 2021 и по Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A METHOD FOR GENETIC DETECTION OF *ENTEROBIUS VERMICULARIS* IN SAMPLES OF PATIENTS WITH ENTEROBIASIS

Kaneva E.<sup>1</sup>, Tsvetkova N.<sup>1</sup>, Velcheva D.<sup>2</sup>, Harizanov R.<sup>1</sup>, Kaftanjiiev I.<sup>1</sup>, Borisova R.<sup>1</sup>, Videnova M.<sup>1</sup>, Ivanova A.<sup>1</sup>, Alexiev I.<sup>1</sup>, Dimitrova R.<sup>1</sup>, Pavlova M.<sup>1</sup>, Aleksandrova E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> NCIPD, Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup> Cibalab LTD, Sofia, Bulgaria

**Key words:** *Enterobius vermicularis*, molecular detection, Nested PCR.

**Introduction.** *Enterobius vermicularis* is an intestinal parasite with a cosmopolitan distribution and the disease it causes (enterobiasis) is one of the most common. According to the assessment of the state of parasitic diseases in Bulgaria, this is the most widespread parasitosis in our country and compared to previous years there is a significant increase in the number of infected persons, which requires action to improve surveillance and control measures. The summary analysis of the information following the literature review shows limited molecular studies for characterization of *Enterobius vermicularis* worldwide, and as far as we know, such studies have not been conducted in Bulgaria so far.

The **aim** of the present study is to develop and implement a bio-molecular method for species-specific identification of the parasite in samples from infected with *Enterobius* patients obtained from different regions of the country.

**Materials and methods.** Based on existing protocols in the literature, nested PCR method for *Enterobius vermicularis* detection in samples of patients with enterobiasis (adhesive tape containing parasitic eggs) has been developed and introduced and the optimal conditions for DNA isolation and amplification were defined.

**Results.** As a result of triple freezing/thawing of the parasitic eggs placed in sterile saline, the parasite DNA was isolated with very good purity and in sufficient quantity. AmpliTaqGold 360 Master Mix, with GC Enhancer (for high GC content templates) additionally included to optimize PCR conditions, was used. This method for molecular detection is applicable both to adult worms and to eggs released from female pinworms, obtained after helminthovoscopy of the perianal swabs.

**Conclusions.** The application of genetic methods for *Enterobius* identification can serve as a basis for performing phylogenetic and molecular-epidemiological analysis of the parasite. This will allow to obtain data for the genotypes common in our country and for the existence of differences in the course of the disease.

### Acknowledgment

This work is supported by the Bulgarian National Science Fund (project no. KP-06-H53/4/11.11.2021) under the "Competition for financial support for basic research projects –2021" and by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Address for correspondence:**

Eleonora Kaneva

National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Department of Parasitology and Tropical Medicine

Bulgaria, 1504 Sofia, 26, Yanko Sakazov Blvd.

email: [kaneva@ncipd.org](mailto:kaneva@ncipd.org)

Phone: +35929446999; ext. 310.

**ЕНТЕРОБИОЗАТА В БЪЛГАРИЯ ЗА ПЕРИОДА 2017 – 2021 ГОДИНА**

*М. Виденова<sup>1</sup>, Н. Цветкова<sup>1</sup>, Р. Борисова<sup>1</sup>, И. Райнова<sup>1</sup>, Р. Харизанов<sup>1</sup>, И. Кафтанджиев<sup>1</sup>, Е. Кънева<sup>1</sup>, А. Иванова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Отдел Паразитология и тропическа медицина, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София*

**Цел** на настоящото проучване е да се анализира разпространението на ентеробиозата сред населението на България за период от пет години (2017 – 2021 г.).

**Материали и методи.** Анализът е изготвен на базата на данни на Регионалните здравни инспекции и на Националния център по заразни и паразитни болести за регистрираните случаи в страната.

**Резултати.** За проучвания от нас период по профилактични, епидемиологични и клинични показания са изследвани общо 2 146 115 лица от всички области на страната, като с ентеробиоза са диагностицирани 32 184 (1.5%) лица. Броят на изследваните деца и подрастващи за периода е 634 943, като при 13 416 (2.11%) от тях е диагностицирано заразяване с *Enterobius vermicularis*. Най – голям брой опаразитени лица в тази група е регистриран през 2019 година – 3 509, а с най-голям брой установени случаи на ентеробиоза са областите Варна (превалентност 20%), Сливен (11%) и Пловдив (9.5%). Преваляентността във възрастовата група на лицата над 18 г. е 1.24 % (ентеробиоза е установена при 18 768 лица). През 2021 година се установява най – голям брой опаразитени лица (5 525), като областите с най – висока опаразитеност са Варна (18.9%), София-град (15.6%) и Бургас (13.7%).

**Заклучение.** Данните от нашето проучване показват тенденция за нарастване на разпространението на ентеробиозата в страната, както при децата, така и при възрастните. Наблюдава се нарастване на случаите на ентеробиоза при възрастните, което повдига редица въпроси основно свързани със здравната осведоменост и култура на населението в страната относно мерките за превенция, както и ефективността на системата за надзор и контрол.

**Ключови думи :** Ентеробиоза, преваляентност, деца, възрастни



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Проучванията са извършени с подкрепата на ФНИ (проект № КП-06-Н53/4/11.11.2021 г.) по „Конкурс за финансова подкрепа на проекти за фундаментални научни изследвания – 2021 г.” и по Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## ENTEROBIASIS IN BULGARIA FOR THE PERIOD 2017 – 2021

*M. Videnova<sup>1</sup>, N. Tsvetkova<sup>1</sup>, R. Borissova<sup>1</sup>, I. Raynova<sup>1</sup>, R. Harizanov<sup>1</sup>, I. Kaftandjiev<sup>1</sup>, E. Kaneva<sup>1</sup>, A. Ivanova<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Department of Parasitology and Tropical Medicine, National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia*

**The aim** of the present study is to analyze the prevalence of enterobiasis in Bulgarian population for the five-year period (2017 – 2021).

**Materials and methods.** The analysis was based on the basis of data from the Regional Health Inspectorates and the National Center for Infectious and Parasitic Diseases for registered cases in the country.

**Results.** For the period studied by us, a total of 2 146 115 persons from all districts of the country were examined by prophylactic, epidemiological and clinical indications, and 32,184 (1.5%) of them were diagnosed with enterobiasis. The largest number of infected persons in this group was registered in 2019 - 3,509, and the largest number of detected cases of enterobiasis was found in the districts of Varna (prevalence 20%), Sliven (11%) and Plovdiv (9.5%). The prevalence in the age group of persons over 18 years of age was 1.24% (enterobiasis was found in 18,768 persons). The largest number of infected persons (5 525) was established in 2021, as the districts with the highest prevalence were Varna (18.9%), Sofia-city (15.6%) and Burgas (13.7%).

**Conclusions.** The data from our study shows a continuing trend of increasing the prevalence of enterobiasis in the country - both in children and adults. There has been an increase in the cases of enterobiasis in adults, which raises a number of issues mainly related to the health awareness and culture of the population in the country regarding prevention measures, as well as the effectiveness of the surveillance and control system.

**Key words:** Enterobiasis, prevalence, children, adults

This work is supported by the Bulgarian National Science Fund (project no. KP-06-H53/4/11.11.2021) under the “Competition for financial support for basic research projects –2021” and by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ПНЕВМОЦИСТОЗАТА СРЕД ЛИЦА С РАЗЛИЧЕН ИМУНЕН СТАТУС.

Р. Борисова<sup>1</sup>, Н. Цветкова<sup>1</sup>, А. Иванова<sup>1</sup>, М. Виденова<sup>1</sup>, В. Левтерова<sup>2</sup>, Н. Янчева<sup>3</sup>, Д. Страшимиров<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни болести, Отдел Паразитология и тропическа медицина

<sup>2</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни болести, Отдел Микробиология

<sup>3</sup>СБАЛИПБ „Проф. Иван Киров“, Отделение за лечение на придобита имунна недостатъчност

**Въведение.** Диагнозата пневмоцистоза се приема при наличие на клинични, рентгенологични, имунологични данни и положителни резултати от оцветителни микроскопски методи на изследвания материал и/или детекция на ДНК на патогена чрез real-time PCR. Въпреки напредъка в достъпа до антиретровирусна терапия (ART) и прилагането на рутинна профилактика срещу пневмония, причинена от *Pneumocystis jirovecii* (PCP), тя все още остава най-често срещаната опортюнистична инфекция сред пациенти със СПИН в много страни.

**Цел** на настоящето проучване е да установим разпространението на пневмоцистозата при различни групи имунокомпрометирани и имунокомпетентни лица с помощта на молекулярни и оцветителни методи за диагностика.

**Материали/Методи:** За целите на проучването са използвани real-time PCR, както и селективни оцветителни методи за морфологична диагностика на пневмоцистозата. Всички диагностични процедури са извършени в НРЛ „Диагностика на паразитозите“, НЦЗПБ. Използвани са също анамнестични, клинични, имунологични и параклинични данни.

**Резултати:** За периода 2019 г. до юни 2021 г. са изследвани клинични материала (храчки, трахеални аспирати, гърлени секрети и БАЛ) на 220 пациента, суспектни за пневмоцистоза, за наличие на *P. jirovecii*. В първа група – 153 имунокомпетентни пациенти, във втора - 67 пациенти с имунокомпрометирана имунна система. ДНК на *P. jirovecii* беше доказана при 6 (3.9%) от имунокомпетентните пациенти и при 32 (47.7%) имунокомпрометираните. Всеки постъпил материал, освен с PCR, беше изследван и с оцветителни микроскопски методи. От всички изследвани материали, при 32 се доказа ДНК на *P. jirovecii*, от които при 5 (15.6 %) открихме цисти на *P. jirovecii* в микроскопски препарати оцветени по Гомори.

**Заклучение:** При пациенти с компрометиран имунитет вероятността в клиничните материали да бъдат открита ДНК на *P. jirovecii* е над десет пъти по-голяма в сравнение с лицата без данни за супресия. Диагностичната стойност на real time - PCR при пневмоцистозата е над три пъти по-висока от тази на селективните оцветителните микроскопски методи.

**Ключови думи:** пневмоцистоза; real-time PCR, микроскопска диагностика

Проучването е осъществено с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ (проект № КР-06-N33 / 18 / 21.12.2019) по „Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания - 2019“ и от Изпълнителната агенция „Наука и образование за интелигентен растеж“ Оперативна програма за растеж (Проект BG05M2OP001-1.002-0001 „Фундаментални, транслационни и клинични изследвания в областта на инфекциите и





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

инфекциозната имунология“) към Министерството на образованието и науката на Република България.

## COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF MICROSCOPIC METHODS IN THE DIAGNOSTIC APPROACHES IN PNEUMOCYSTOSIS

R. Borisova<sup>1</sup>, R. Harizanov<sup>1</sup>, N. Tsvetkova<sup>1</sup>, A. Ivanova<sup>1</sup>, M. Videnova<sup>1</sup>, V. Levterova<sup>2</sup>, N. Yancheva<sup>3</sup>, D. Strashimirov<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>*National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Department of Microbiology*

<sup>3</sup>*Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, AIDS Department*

**Introduction.** The diagnosis of pneumocystosis is recognized in the presence of clinical, radiological, immunological data and positive results from microscopic methods of the examined material and / or detection of the pathogen DNA by PCR. Despite advances in access to antiretroviral therapy (ART) and routine prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP), it still remains the most common opportunistic infection among AIDS patients in many countries.

**Aim.** The aim of the present study was to determine the prevalence of pneumocystosis in different groups of immunocompromised and immunocompetent persons using molecular and staining diagnostic methods.

**Materials/Methods:** For the purposes of the study real - time PCR were used, as well as selective staining methods for morphological diagnosis . All diagnostic procedures were performed in the NRL "Diagnosis of parasitic diseases", at the NCIPD. Anamnestic, clinical, immunological and paraclinical data were also used.

**Results:** For the period from 2019 to June 2021, a total of 220 clinical materials (sputum, tracheal aspirates, throat secretions, and BAL) were examined by real-time PCR and staining microscopic methods. Of all the examined materials, in 38 was detected *P. jirovecii* DNA (17%), of which in five (13.6%) were found cysts of *P. jirovecii* in permanent stained by Gomori method slides. Each incoming material, in addition to PCR, was examined by staining microscopic methods. Of all the materials examined, 32 showed DNA from *P. jirovecii*, of which 5 (15.6%) showed cysts of *P. jirovecii* in Gomori-stained microscopic slides.

**Conclusion:** In patients with compromised immunity, *P. jirovecii* DNA is more than ten times more likely to be detected in clinical materials than those without evidence of suppression. The diagnostic value of real-time PCR in pneumocystosis is more than three times higher than that of staining microscopic methods.

**Keywords:** pneumocystosis; real- time PCR; staining methods



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**ACKNOWLEDGMENT:** The work is supported by the Bulgarian National Science Fund (projectno.KP-06-N33/18/21.12.2019) under the “Competition for financial support for basic research projects– 2019” and by the Executive Agency Science and Education for Smart Growth Operational Program (Project BG05M2OP001-1.002-0001, “Fundamental, Translational and Clinical Investigations On Infections and Immunity”) to the Ministry of Education and Science of the Republic of Bulgaria.

### ЗАВИСИМОСТ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА В- KLOTNO И ДЕЛА НА CD27-CD57+ CD8+T КЛЕТКИ ПРИ ЗДРАВИ ЛИЦА

Яна Тодорова<sup>1</sup>, Радослава Емилова<sup>1</sup>, Веселина Колева<sup>2</sup>, Иван Иванов<sup>3</sup>, Иван Стойков<sup>3</sup>, Мария Николова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София

<sup>2</sup>Клинична лаборатория, МБАЛ “Аджикадем Сити Клиник Токуда Болница”, София

<sup>3</sup>Национална референтна лаборатория “Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност”, НЦЗПБ, София

**Въведение:** Напредналата възраст се асоциира със значимо по-висока честота на хронични, дегенеративни и туморни заболявания, като това е свързано с физиологични промени настъпващи в имунната система и могат да бъдат обобщени в термина „имунологично остаряване“. Имунологичното остаряване се потенцира от повтарящо се и хронично активиране на имунната система и не е непременно свързано с възрастта. Необходимо е идентифицирането на чувствителни маркери характеризиращи процеса на преждевременно имунно остаряване. Такъв нов обещаващ маркер се очертава протеина *Klotho* имащ роля в процесите на остаряване.

**Цел:** да се анализира експресията на мембраната форма на протеина  $\beta$ - Klotho върху CD4+ и CD8+ Т-лимфоцити при здрави лица

**Материали и методи:** Анализирахме експресията на  $\beta$ Klotho върху Т-клетки от здрави лица разпределени, спрямо възрастта им, в следните групи: А: млади възрастни, n=10, (20-30г); В: средна възраст, n=59 (30–50 г) и С: възрастни, n=11 (> 70 г). Абсолютният брой (АС) и процента на Т- лимфоцитите, CD4+, CD8+ и CD8+CD27-CD57+Т клетките, CD4/CD8 съотношението, както и дела на  $\beta$ Klotho+ Т-клетките бяха анализирани флоуцитометрично (FACSCanto II, FACDiva 6.1.3., BD Biosciences)

**Резултати:** Между изследваните групи не се установиха значим разлики в АС и процента на Т-клетъчните субпопулации ( $p>0.05$ ). Най-високи нива на експресия на  $\beta$ Klotho се установи при CD8+Т-клетките във всички възрастови групи. В група А процента на  $\beta$ Klotho(+) Т-клетки, CD4+ и CD8+ лимфоцити бяха значимо по - високи от тези наблюдавани в групата на възрастните лица: (mean) 2.12vs. 0.48; 3.23vs. 0.48; 6.87vs. 2.28, респективно ( $p<0.05$  за всички). Експресията на  $\beta$ Klotho върху CD4+ и CD8+ Т лимфоцитите на участници в група В бе хетерогенна и не се различаваше значимо от група С. В група В се установиха две подгрупи с висока ( $\beta$ Klotho<sup>high</sup>) и ниска ( $\beta$ Klotho<sup>low</sup>) експресия на  $\beta$ Klotho върху CD8 Т-клетките: (mean) 2.3vs. 6.6 ( $p<0.001$ ). Не се установи зависимост между дела на  $\beta$ Klotho(+)



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

CD8+ Т-лимфоцитите и възрастта на участниците, но се установи значима обратна корелация с дела на CD27-CD57+ CD8+Т клетките в група В ( $R = -0.4$ ,  $p < 0.01$ ).

**Заключение:** Въз основа на тези резултати може да предположим, че по-високата чувствителност на CD8+ Т клетките към ефектите на имунното стареене може да се дължи, поне отчасти, на по-високата експресия и зависимостта от ефектите на генните продукти на *KLOTHO*. Предполагаме, че намаленият дял на  $\beta$ Klotho+ CD8+ Т-клетки е маркер за изтощение в резултат на имунна активация и може да служи като ранен маркер на преждевременно имунологично остаряване.

**Ключови думи:** Имунологично остаряване,  $\beta$ - Klotho, Т-лимфоцити

**Благодарности:** Това проучване е финансирано от ФНИ по проект КП-06-Н33/17 21.12.2019г. и по Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## B- KLOTHO INVERSELY CORRELATED WITH CD27-CD57+ CD8+T CELLS IN HEALTHY SUBJECTS

*Yana Todorova<sup>1</sup>, Radoslava Emilova<sup>1</sup>, Vesselina Koleva<sup>2</sup>, Ivan Ivanov<sup>3</sup>, Ivan Stoikov<sup>3</sup>, Maria Nikolova<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Department Clinical Laboratory, “Acibadem City Clinic Tokuda Hospital” Sofia

<sup>3</sup>National Reference Laboratory “Control and Monitoring of Antimicrobial Resistance” National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

**Introduction:** Old age is associated with a significantly higher incidence of chronic, degenerative and tumor diseases. The pathology of old age is closely related to the physiological phenomenon of “immunosenescence”. Immunosenescence is driven by repeated and continuous immune activation, and is not necessarily related to age. Sensitive markers are warranted to detect and monitor the process of premature immune ageing. One such promising new marker is the protein Klotho that is involved in the aging process.

**Aim:** to analyze the expression of  $\beta$ Klotho on CD4+ and CD8+ T-cells in healthy subjects

**Material and methods:** We analyzed the expression of  $\beta$ Klotho on T-cell subsets from healthy donors distributed according to age, as follows: A: young adults,  $n=10$  (20-30 y); B: middle- aged,  $n=59$  (30–50 y) and C: elderly,  $n=11$  (> 70 y). The absolute counts (AC) and percentages of: total, CD4+, CD8+ and CD8+CD27-CD57+T cells, CD4/CD8 ratio, and the share of  $\beta$ Klotho+ T-cell subsets were analyzed by multicolor flow cytometry (FACSCanto II, FACDiva 6.1.3., BD Biosciences).

**Results:** AC and percentage of T cell subsets did not differ significantly between the groups. The highest expression of  $\beta$ Klotho was observed on CD8+T cells for all age groups. Percentages of  $\beta$ Klotho (+) total, CD4+ and CD8+ T-cells in group A exceeded significantly the expression observed in the elderly: (mean) 2.12vs. 0.48; 3.23vs. 0.48; 6.87vs. 2.28, respectively ( $p < 0.05$  for all). The expression of  $\beta$ Klotho on CD4+ and CD8+ T cells of middle-aged participants was rather heterogeneous and did not differ significantly from group C. Two subsets of  $\beta$ Klotho<sup>high</sup> and



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

$\beta$ Klotho<sup>low</sup> CD8 T cells were delineated: (mean) 2.3 vs. 6.6 ( $p < 0.001$ ). The proportion of  $\beta$ Klotho (+) CD8<sup>+</sup> T-cells did not correlate with age, but correlated inversely and significantly with the share of CD27-CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in group B ( $R = -0.4$ ,  $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** Based on these results we hypothesise that the higher sensitivity of CD8<sup>+</sup> T cells to the effects of immune senescence could be due, at least in part, to the higher expression and dependence on the effects of KLOTHO gene products. We propose that a reduced share of  $\beta$ Klotho<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells signals exhaustion due to immune activation, and may serve as an early marker of premature immune senescence.

**Key words:** Immunosenescence,  $\beta$ -Klotho, T-cells

**Acknowledgement:** This work is supported by research grant КП-06-H33/17 21.12.2019, Bulgarian National Science Fund and by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

## СЕРОПРЕВАЛИРАНЕ НА ЛАЙМСКА БОРЕЛИОЗА И ЗАПАДНО-НИЛСКА ТРЕСКА ПРИ ПТИЦИ

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

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

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

### Ключови думи: Лаймска болест, Западно-Нилска треска, птици

Птиците имат съществено значение като резервоар в природните вериги на трансмисия на редица заболявания. Лаймската борелиоза и Западно-Нилската треска са сред най-важните векторно-преносими инфекции в България. Проучванията до момента потвърждават активната циркулация на двата причинителя сред популацията от птици, както и възможността един и същи вид да участва при предаването и на двете инфекции.

**Цел:** Проучване върху различни видове птици за наличие на специфични IgG антитела срещу причинителите на Лаймска болест и Западно-Нилската треска.

**Материали и методи:** С помощта на ELISA метод бяха изследвани серумни проби ( $n=137$  броя) от 23 различни вида местни и мигриращи птици. Пробите са събрани през периода май-юни 2022 г., в района на гр. София и БЕБ „Калимок“.

**Резултати и обсъждане:** При 39 от изследваните птици (39/137 – 28,47%) се установи наличие на специфични антитела срещу двата причинителя, съответно при 31/137 – 22,63% срещу *B. burgdorferi* и при 12/137 – 8,76% срещу WNV, като при 4/137 – 2,92% от изследваните птици беше установено едновременно наличие на антитела срещу двата причинителя. Анализът по видове птици показва, че при повече от половината се установяват антитела срещу поне един от двата причинители (в 14 от изследваните видове).

От района на гр. София бяха изследвани 37 птици. В 9/37 – 24,30% от тях бяха открити антитела срещу причинителя на Лаймската болест и в 2/37 – 5,41% срещу ЗНТ.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Видовете, при които бяха установени антитела срещу *B. burgdorferi* са *F. coelebs* (Чафинч), *P. major* (Голям синигер), *T. merula* (Кос) и *T. philomelos* (Поен дрозд). Антитела срещу вируса на ЗНТ се установиха при 2 птици от вида *T. merula*.

От района на БЕБ Калимок бяха събрани серумни проби от 100 птици. При проведените изследвания в 22/100 – 22% от тях се откриха антитела срещу причинителя на Лаймската болест и в 10/100 – 10% срещу вируса на ЗНТ, като при 4 от тези 10 птици имаше едновременно наличие на специфични антитела срещу двата причинителя. Установените видове с по-високи нива на серопревалентност са *D. urbicum* (Градска лястовица) *L. megarhynchos* (Южен славей) и *Acrocephalus arundinaceus* (Тръстиково шаварче), *P. domesticus* (Домашно врабче) и *O. oriolus* (Авлига).

**Заклучение:** Данните за наличието на специфични антитела при изследваните проби показва по-високи нива на серопревалентност на Лаймската борелиоза спрямо Западно-нилската треска в двата региона, съответно 24,30% и 5,41% за София и 22% и 10% за Калимок. Установени бяха сходни нива на серопревалиране за Лаймската борелиоза в София и Калимок, докато при Западно-нилската треска в Калимок нивата на специфични антитела бяха почти два пъти по-високи в сравнение със София.

При проучването се установиха специфични антитела при голям брой различни видове птици, което сочи, че те могат да бъдат инфектирани с причинителите на Лаймската борелиоза и Западно-нилската треска и да са потенциален резервоар за двете инфекции. Това е от важно значение, особено предвид широкото разпространение на някои видове като *T. merula* (Кос), *P. major* (Голям синигер), *D. urbicum* (Градска лястовица) и *P. domesticus* (Домашно врабче) в урбанизираните територии.

Това проучване е с финансовата подкрепа на ФНИ, проект КП-06-Н33/16 от 21.12.2019 г. и на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## SEROPREVALENCE OF LYME DISEASE AND WEST NILE FEVER SPECIFIC ANTIBODIES AMONG BIRDS

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

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

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

**Key words:** Lyme disease, West Nile fever, birds

Birds are important as a reservoir in the natural chains of transmission of a number of diseases. Lyme borreliosis and West Nile fever are among the most important vector-borne infections in Bulgaria. Studies so far confirm the active circulation of both causative agents among the bird population, as well as the possibility that the same species may be involved in the transmission of both infections.





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Objective:** Study on different bird species for the presence of specific IgG antibodies against the causative agents of Lyme disease and West Nile fever.

**Materials and methods:** Using ELISA method, serum samples (n=137) from 23 different species of resident and migratory birds were examined. The samples were collected between May and June 2022 in areas of Sofia and BEB "Kalimok".

**Results and discussion:** Specific antibodies against the two causative agents were found in 39/137 – 28.47%; in 31/137 – 22.63% against *B. burgdorferi* and in 12/137 – 8.76% against WNV. In 4/137 – 2.92% of the birds, a simultaneous presence of antibodies against both causative agents was established. Analysis of bird species showed that in more than half of them antibodies against at least one of the two causative agents (in 14 of the species studied) were identified.

In the region of Sofia, serum samples from 37 birds were examined. In 9/37 – 24.30% of them antibodies were found against the causative agent of Lyme disease and in 2/37 – 5.41% against WNF. Bird species in which antibodies against *B. burgdorferi* were found were *F. coelebs*, *P. major*, *T. merula* and *T. philomelos*. Antibodies against the WNF virus were detected in 2 birds of the species *T. merula*.

From the BEB Kalimok area, serum samples from 100 birds were collected. Studies showed antibodies against the causative agent of Lyme disease in 22/100 – 22% of them and in 10/100 – 10%, antibodies against WNF virus, with 4 of these 10 birds having simultaneously presence of specific antibodies against both causative agents. The established species with higher levels of seroprevalence are *D. urbicum*, *L. megarhynchos*, *A. arundinaceus* and *P. domesticus*.

**Conclusion:** Data on the presence of specific antibodies in the test samples showed higher levels of seroprevalence of Lyme borreliosis compared to West Nile fever in both regions, respectively 24.30% and 5.41% for Sofia and 22% and 10% for Kalimok. Similar levels of seroprevalation were found for Lyme borreliosis in Sofia and Kalimok, while for West Nile fever in Kalimok the levels of specific antibodies were almost twice as high as Sofia.

The study identified specific antibodies in a large number of different bird species, indicating that they can be infected with the causative agents of Lyme borreliosis and West Nile fever and be a potential reservoir for both infections. This is important, especially given the widespread distribution of certain species such as *T. merula*, *P. major*, *D. urbicum* and *P. domesticus* in urbanized areas.

**This study is with the financial support of National Science Fund, project KP-06-H33 / 16 from 21.12.2019 and by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001- 1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".**

## ВИРУСЪТ НА КРИМСКАТА-КОНГО ХЕМОРАГИЧНА ТРЕСКА В КЪРЛЕЖИ *HYALOMMA AEGYPTIUM*, СВАЛЕНИ ОТ КОСТЕНУРКИ В БЪЛГАРИЯ

Е.Панайотова<sup>1</sup>, И.Христова<sup>1</sup>, Е.Тасева<sup>1</sup>, Н.Миткова<sup>1</sup>, Д.Духалов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни Болести

<sup>2</sup>Независим експерт



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Въведение.** Кримската-Конго хеморагична треска (ККХТ) е кърлежово-преносимо вирусно заболяване с висок леталитет и природо-огнищен характер. Основен вектор на вируса на ККХТ са кърлежите от род *Hyalomma*. Инфекцията е ендемична в България, където основен вектор и резервоар са кърлежите от вида *Hyalomma marginatum*.

**Цел.** Уточняване разпространението на вируса на ККХТ в кърлежи от вида *Hyalomma aegyptium*, свалени от костенурки *Testudo graeca*.

**Материали и методи.** Събрани бяха 81 кърлежа *H. aegyptium* от 23 костенурки *T. graeca*, от област Кърджали. Кърлежите бяха разпределени в пулове според гостоприемника си, между 2 и 5 в пул. След това бяха хомогенизирани с помощта на циркониеви перли (0.5мм) в хомогенизатор BeadBug Homogenizer (Benchmark scientific). РНК екстрахирахме с помощта на търговски кит за екстракция QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). С real-time RT-PCR потърсихме РНК на вируса на ККХТ.

**Резултати и изводи.** Генома на вируса на ККХТ открихме в 10 от изследваните кърлежа *H. aegyptium*, свалени от 2 от гостоприемниците *T. graeca*. Заразеността на кърлежите възлиза на 12.3%. Необходими са допълнителни проучвания на кърлежите от вида *H. aegyptium*, както и на техните гостоприемници, за да се уточни ролята им като вектори и резервоари на вируса на ККХТ в южна България.

**Благодарности:** Това проучване бе проведено благодарение на Фонд Научни Изследвания, България, договор №КП-06-М33/3/13.12.2019

**Ключови думи:** Кримска-Конго хеморагична треска, *H. aegyptium*, *T. graeca*, qRT-PCR

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS IN *HYALOMMA AEGYPTIUM* TICKS, COLLECTED FROM TORTOISES IN BULGARIA

E. Panayotova<sup>1</sup>, I. Christova<sup>1</sup>, E. Taseva<sup>1</sup>, N. Mitkova<sup>1</sup>, D. Duhalov<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Freelance scientific researcher

**Introduction.** Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is an acute natural focal viral disease, characterized by a high mortality rate. The main vector of the CCHF virus (CCHFV) are *Hyalomma* ticks. CCHF is endemic in Bulgaria, where the primary vector and reservoir are *Hyalomma marginatum* ticks.

**Goal.** To specify the circulation of CCHFV in *Hyalomma aegyptium* ticks, collected from *Testudo graeca* tortoises.

**Materials and methods.** A total of 81 *H. aegyptium* ticks were collected from 23 *T. graeca* tortoises in Kardzhali district. The ticks were grouped in pools, according to their respective hosts, with 2-5 ticks in each pool. Zirconium beads were used for tick homogenization in BeadBug Homogenizer (Benchmark scientific). RNA was extracted with a commercial RNA extraction kit



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Real-time RT-PCR was performed for the detection of CCHFV RNA.

**Results and conclusions.** CCHFV genome was detected in 10 *H.aegyptium* ticks, collected from 2 *T.graeca* hosts. Thus, the infection rate is 12.3%. Further research on *H.aegyptium* ticks and their hosts are needed to assess their role as CCHFV vectors and reservoirs in southern Bulgaria.

**Acknowledgements:** The study was supported by the National Science Fund, Bulgaria, project №КП-06-M33/3/13.12.2019

**Key words:** Crimean-Congo hemorrhagic fever, *H.aegyptium*, *T.graeca*, qRT-PCR

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

### ДЕТЕКЦИЯ НА ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM С NESTED PCR В ГЛАДНИ КЪРЛЕЖИ, СЪБРАНИ ОТ РАЗЛИЧНИ ОБЛАСТИ НА БЪЛГАРИЯ

Е.Тасева<sup>1</sup>, И.Христова<sup>1</sup>, Е. Панайотова<sup>1</sup>, Н. Миткова<sup>2</sup>

Национален Център по Заразни и Паразитни болести, София

<sup>1</sup>Национална референтна лаборатория по кърлежово/векторно преносими инфекции, листерии и лептоспири

<sup>2</sup>Лаборатория "Медицинска арахноентомология и зоология с дезинсекция и дератизация"

**ВЪВЕДЕНИЕ:** Човешката гранулоцитна анаплазмоза (ЧГА) е неспецифично фебрилно заболяване при хората, което се предава чрез ухапване от кърлеж и се причинява от *Anaplasma phagocytophilum*. Клиничните прояви при ЧГА могат да варират от безсимптомна инфекция до фатален изход, корелиращи с възрастта на пациента, придружаващите заболявания и тежестта на клиничната картина. Основен вектор са кърлежите от род *Ixodes*. Честотата на инфектиране на иксовите кърлежи с причинителя на ЧГА варира от 3 до 58% според различните проучвания. В България първите проучвания върху заразеност на кърлежите с *A. phagocytophilum* са проведени от И. Христова и колектив през 2000 г., като е установен (33,9%) заразеност при имаго. В последните десетилетия липсва информация за заразеност на кърлежи с причинителя.

**ЦЕЛ:** Събиране на гладни кърлежи от различни области на страната и изследването им за заразеност с *A. phagocytophilum*.

**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:** Кърлежите бяха събрани чрез флагов метод по тревни площи. Определени бяха до вид по метода на Померанцев, 1950. Те бяха хомогенизирани с циркониеви перли (0.5 mm -1 mm) в хомогенизатор Beadbug (Benchmark scientific). Извършена беше екстракция на ДНК чрез търговски китове: QIAGEN и INVITROGEN. За специфично откриване на ДНК на *A. phagocytophilum* беше разработена и въведена PCR система с праймерите LA1 и LA6, амплифициращи 444 bp участък от ankA гена. Реакциите бяха проведени на апарат (Gene explorer, Bioer). Ампликоните бяха визуализирани чрез гелелектрофореза и бяха отчетени на UV – трансилуминатор (Compact Digimage System, Mojoy Science).



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**РЕЗУЛТАТИ:** За периода март-юли 2021 г. бяха събрани общо 218 иксодови кърлежи от различни области на страната. Всички кърлежи бяха от вида *Ixodes ricinus*. От тях 44.04 % бяха нимфи, 33.48% - женски, 22.48% - мъжки. ДНК на *A. phagocytophilum* беше открита в 2.75% (6/218). Заразените кърлежи бяха от София и Пловдив. По- висок беше броя на нимфите, носители на причинителя на ЧГА.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Откритият по-висок процент на нимфите, се дължи на факта, че те са най-гладни, имат съвършен апарат за кръвосмучене, а опасността идва от това, че са по- малки и в повечето случай незабележими. Особено висок е рискът за заразяване на човека при дълъг престой на кърлежа върху кожата. Инфекцията с причинителя на ЧГА не бива да се подценява, тъй като в повечето случаи протича леко и е необходимо търсене на специфични антитела.

**Ключови думи:** кърлежи, анаплазма, *Anaplasma phagocytophilum*

**Благодарности:** Проучването беше проведено благодарение на Фонд Научни Изследвания, България, договор № КП-М33/3/13.12.2019 и на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## DETECTION OF ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM WITH NESTED PCR IN QUESTING TICKS, COLLECTED FROM DIFFERENT DISTRICTS OF BULGARIA

E. Taseva<sup>1</sup>, I. Christova<sup>1</sup>, E. Panayotova<sup>1</sup>, N. Mitkova<sup>2</sup>  
National Center of Infectious and Parasitic Diseases

<sup>1</sup>NRL Vector-borne infections, listeria, leptospirae

<sup>2</sup>Laboratory “Medical arachnoentomology and zoology with disinsection and deratization”

**INTRODUCTION:** Human granulocyte anaplasmosis (HGA) is a non-specific febrile disease in humans that is transmitted by a tick bite and is caused by *Anaplasma phagocytophilum*. Clinical manifestations of HGA can range from asymptomatic infection to fatal outcome, correlating with the patient's age, concomitant diseases and the severity of the clinical picture. The main vector are ticks of the genus *Ixodes*. The incidence of tick-borne infections with HGA varies from 3 to 58% according to various studies. In Bulgaria, the first studies on tick infestation with *A. phagocytophilum* were conducted by I. Christova and team in 2000, and 33.9% infection was found in adults. In recent decades, there has been no information on tick infestation with the causative agent.

**AIM:** Collection of questing ticks from different districts of the country and their examination for detection of *A. phagocytophilum*.

**MATERIALS AND METHODS:** The ticks were collected through flagging method on lawns. They were morphologically identified to the species level using taxonomic keys (Pomerancev, 1950). The ticks were homogenized with zirconium beads (0.5-1 mm diameter) in homogenizer Beadbug (Benchmark scientific). DNA extraction was performed using commercial kits: QIAGEN and INVITROGEN. PCR system with primers LA1 and LA6 amplifying 444 bp of the ankA gene was developed and introduced for specific DNA detection of *A. phagocytophilum*. The reactions were performed in a thermocycler (Gene explorer, Bioer). The amplicons were visualized through gel electrophoresis and read on a UV transilluminator (Compact Digimage System, Mojar Science).



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**RESULTS:** During March-July 2021, a total of 218 ixodid ticks were collected from different districts of the country. All ticks belonged to the species *Ixodes ricinus*. Of these, 44.04% were nymphs, 33.48% - female and 22.48% - male adult ticks. *A. phagocytophilum* DNA was detected in 2.75% (6/218). Infected ticks were found in Sofia and Plovdiv. The number of nymphs carrying the causative agent of HGA was higher.

**CONCLUSIONS:** The higher percentage of nymphs found is due to the fact that they are the hungriest, have a perfect blood-sucking apparatus, and the danger comes from the fact that they are smaller and, in most cases, invisible. Particularly high risk of infection in humans is with prolonged stay of the tick on skin. Infection with the causative agent of HGA should not be underestimated, as in most cases it is mild and requires the search for specific antibodies.

**Key words:** ticks, anaplasma, *Anaplasma phagocytophilum*

**Acknowledgments:** The study was supported by the National Science Fund, Bulgaria, project № KP-M33/3 /13.12.2019 and by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

## КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА ЛЕПТОСПИРОЗА, ПОТВЪРДЕН С PCR, С ФАТАЛЕН ИЗХОД

Е. Тасева<sup>1</sup>, И. Христова<sup>1</sup>, Е. Панайотова<sup>1</sup>, Р. Нановска<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национален Център по Заразни и Паразитни болести, София, Национална референтна лаборатория по предавани с кърлежи инфекции, лептоспири и листерии

<sup>2</sup>МБАЛ „проф. Д-р П. Стоянов“, Инфекциозно отделение, гр. Ловеч

**ВЪВЕДЕНИЕ:** Лептоспирозата е сред най-широко разпространените зооантропонози в света, което е причина за високата заболяемост в световен мащаб. В България средната годишна заболяемост за периода 2018-2021 г. е ниска (0.51/100 000), като е отчетен само 1 смъртен случай през 2019 г. Това не е честа инфекция, но не бива да се подценява и да остава неточно диагностицирана. Тя е инфекция, застрашаваща живота на хората, с основна причина за смъртта белодробен кръвоизлив и остра бъбречна недостатъчност.

**ЦЕЛ:** Да се анализира случай на пациентка с клинични данни за лептоспироза, протичащ фулминантно, с оскъдни епидемиологични данни и да се подчертае значимостта от ранна диагностика и доказване на причинителя с PCR.

**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:** Вzeti проби серум и кръв на 6-я ден от началото на инфекцията. Приложен микроаглутинационен тест (MAT) за доказване на антитела и nested PCR метод на детекция на ДНК на *Leptospira interrogans*, основаващ се на амплификацията на 331-bp фрагмент от *pts* гените (16S) на лептоспирите.

**РЕЗУЛТАТИ: Клиничен случай:** Касае се за жена на 43 г., постъпва във вътрешно отделение, МБАЛ, гр. Ловеч, на 4-я ден от заболяването с оплаквания от обща отпадналост, мускулни болки, световъртеж, температура 39<sup>0</sup> и олигурия. Съобщава, че работи в хранителен магазин и наличието на гризачи там е възможно. За 3 дни престой в болницата развива иктер, конюнктивална инекция, вратна ригидност, олигурия, генерализиран петехиален обрив по кожата на ръцете и корема, хепато- и сплено- мегалия. Лабораторните показатели са суспектни за лептоспироза: повишени урея, креатенин, хематурия,





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

протеинурия, увеличени аланин-амино трансферази, билирубин, ускорена СУЕ, левкоцитоза, тромбоцитопения. Пациентката е с тежък токсинфекциозен синдром, макроскопска хематурия и крайно тежко критично състояние. Въпреки проведената терапия с Medaxon, Cefepim, Meropenem и Levofloxacin, пациентката завършва летално. **Резултати:** Чрез МАТ теста не бяха доказани антитела срещу *Leptospira*, но чрез nested PCR беше доказана ДНК на *Leptospira interrogans* в кръвната проба, което потвърди диагнозата лептоспироза.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Този случай е от област Ловеч, която спада към ендемичните области за лептоспироза у нас (с 8,25% заболяемост). От съществено значение е да не се пропуска епидемиологичната анамнеза и въпроса за наличие на гризачи в работните помещения. Необходимо е засилване вниманието на клиницистите за навременно вземане на кръвна проба при суспектен пациент за лептоспироза, още преди сероконверсията и прилагането на антибиотично лечение. PCR методът може успешно да се прилага за ранно поставяне на диагноза, поради високата си специфичност и чувствителност.

**Ключови думи:** лептоспироза, PCR, епидемиологична анамнеза

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## CLINICAL CASE OF LEPTOSPIROSIS CONFIRMED BY PCR WITH FATAL OUTPUT

E. Taseva<sup>1</sup>, I. Christova<sup>1</sup>, E. Panayotova<sup>1</sup>, R. Nanovska<sup>2</sup>

National Center of Infectious and Parasitic Diseases

<sup>1</sup>NRL Vector-borne infections, listeria, leptospires

<sup>2</sup>MHAT "Prof. Dr. P. Stoyanov", Infectious Diseases Department, Lovech

**INTRODUCTION:** Leptospirosis is one of the most widespread zoonoses in the world, which is the reason for the high incidence worldwide. In Bulgaria, the average annual incidence for the period 2018-2021 is low (0.51 / 100,000), with only one death reported in 2019. This is not a common infection, but it should not be underestimated and left inaccurately diagnosed. It is a life-threatening infection, with the main cause of death being pulmonary hemorrhage and acute renal failure.

**AIM:** To analyze a case of a patient with fulminant clinical evidence of leptospirosis with scarce epidemiological data and to emphasize the importance of early diagnosis and detection of the causative agent by PCR.

**MATERIALS AND METHODS:** Serum and blood samples were drawn on 6<sup>th</sup> day of infection. Microagglutination test (MAT) for antibody detection was applied as well as nested PCR method for DNA detection of *Leptospira interrogans*, based on amplification of a 331-bp fragment of the rrs gene (16S) of leptospira.

**RESULTS: Clinical case:** This is a 43-year-old woman admitted to the internal ward of the regional hospital in Lovech, on the 4th day of the disease with complaints of general fatigue, muscle pain, dizziness, fever 39<sup>0</sup> and oliguria. She reports that she works in a grocery store and probably has rodents there. For 3 days in the hospital she developed jaundice, conjunctival injection, neck



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

rigidity, oliguria, generalized petechial rash on the skin of the hands and abdomen, hepato- and splenomegaly. Laboratory parameters are suspected of leptospirosis: increased urea, creatinine, hematuria, proteinuria, increased alanine aminotransferases, bilirubin, accelerated ESR, leukocytosis, thrombocytopenia. The patient has a severe toxoinfection syndrome, macroscopic hematuria and an extremely severe critical condition. Despite the therapy with Medaxon, Cefepim, Meropenem and Levofloxacin, the patient died. **Results:** No antibodies to *Leptospira* were detected by the MAT test, but DNA of *Leptospira interrogans* was detected in the blood sample by nested PCR, which confirmed the diagnosis of leptospirosis.

**CONCLUSION:** The case is from Lovech district, which belongs to the endemic regions of leptospirosis in our country (with 8.25% morbidity). It is important not to miss the epidemiological history and the question of the presence of rodents in the workplace. It is necessary to intensify clinicians' attention to the timely collection of blood samples from a patient with suspected leptospirosis, even before seroconversion and antibiotic treatment. The RCR method can be used for early successful diagnosis due to its high specificity and sensitivity.

**Key words:** *leptospirosis, PCR, epidemiological history*

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНО И ИМУНОЕНЗИМНО ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ХЕРПЕС ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ ПРИ ДЕЦА С НАРУШЕНИЯ НА ЦЕНТРАЛНАТА НЕРВНА СИСТЕМА (ЦНС) ЗА ПЕРИОДА ЯНУАРИ-ДЕКЕМВРИ 2021Г.

Драгана Ангелов, Снежана Дикова, Петя Генова-Калу

НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси”,  
Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ), Отдел „Вирусология“

**Въведение:** Инфекции причинени от херпесни вируси са едни от най-разпространените в човешката популация и често срещани при деца. Тези инфекции се проявяват клинично с разнообразни симптоми и могат да доведат до сериозни усложнения (енцефалит, менингит, менингоенцефалит, миелит, полиневропатия и др.). 1/3 от случаите на херпес симплекс вирусния енцефалит (HSE) причинен от херпес симплекс тип 1 (HSV-1) се пада на деца под 18-годишна възраст. При неонатален HSE, новородените се заразяват по време на раждането чрез контакт с контаминирани с херпес симплекс тип 2 (HSV-2) секрети от родовите пътища на майката и се проявява с множество клинични характеристики, включително треска или температурни колебания, напрегната фонтанела, гърчове и кома.

**Цел:** Настоящото проучване е предназначено да анализира различни клинични материали (пълна кръв, серум, ликвор, букална лигавица и урина) на деца на възраст 0-18 години с клинично подозрение за различни неврологични заболявания.

**Материали и методи:** В периода м. януари, 2021 г. до м. декември, 2021 г. в лабораторията



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

„Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“, НЦЗПБ, са изследвани общо 317 клинични проби от които 81 на деца (26%) на възраст от 5 месеца до 18 години. Общият брой направени изследвания за HSV-1, HSV-2, CMV, EBV и VZV за периода е 298 от които 214 серологични чрез индиректен имуноензимен метод ELISA за детекция на специфични имуноглобулини от класовете IgM и IgG и 84 молекулярно-вирусологични с помощта на конвенционален и RealTime PCR за детекция на ДНК.

**Резултати:** Чрез индиректен ELISA анализ на тестираните 81 клинични проби са доказани *anti-HSV-1* IgM позитивни антитела при 6 от пациентите (7.4%), *anti-HSV-2* IgM позитивни антитела при 2 (2.4%), *anti-CMV* IgM позитивни антитела при 15 (18.5%), *anti-EBV* IgM позитивни антитела при 9 (11.1%) и *anti-VZV* IgM позитивни антитела при 6 (7.4%)- маркер за остра инфекция. При изследваните клинични проби положителен *anti-IgG* резултат за херпесния панел е доказан при над 40% от пациентите. Положителен PCR сигнал за CMV е доказан при двама пациенти (2.5%) в клинични материали пълна кръв и урина при петмесечно и седеммесечно дете с клинични диагнози енцефалит.

**Заключение:** Откриването на вирусна ДНК чрез PCR технология се превърна в „златен стандарт“ за лабораторна диагностика на херпес вирусни инфекции. Серологичните методи също имат своето място в поставянето на клиничната диагноза, тъй като отразяват имунния отговор на организма срещу херпесна инфекция и позволяват определяне на давността на инфекцията.

**Ключови думи:** херпес симплекс вирусен енцефалит, ELISA, PCR

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

Адрес за кореспонденция:

бул. „Генерал Н. Г. Столетов“ 44А, Отдел „Вирусология“  
02/9313818 Драгана Ангелов

## MOLECULAR-GENETIC AND IMMUNOENZYME RESEARCH ON THE PREVALENCE OF HERPES VIRAL INFECTIONS IN CHILDREN WITH CENTRAL NERVOUS SYSTEM (CNS) DISORDERS FOR THE PERIOD JANUARY-DECEMBER 2021

*Dragana Angelov, Snezhana Dikova, Petya Genova-Kalou*

*NRL “Cell cultures, rickettsia and oncogenic viruses”,  
National Center for Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Department of Virology*

**Introduction:** Infections caused by herpes viruses are one of the most common in the human population and common in children. These infections manifest themselves clinically with a variety of symptoms and can lead to serious complications (encephalitis, meningitis, meningoencephalitis, myelitis, polyneuropathy, etc.). 1/3 of cases of herpes simplex viral encephalitis (HSE) caused by herpes simplex type 1 (HSV-1) occur in children under 18 years of age. In neonatal HSE, newborns become infected during birth through contact with herpes simplex type 2 (HSV-2)-



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

contaminated secretions from the mother's birth canal and the infection is presented with a variety of clinical features, including fever or temperature fluctuations, tense fontanelles, seizures and coma.

**Aim:** The present study was designed to analyze various clinical materials (whole blood, serum, cerebrospinal fluid, buccal mucosa and urine) in children aged 0-18 years with clinical suspicion of various neurological diseases.

**Materials and methods:** In the period of January, 2021 to December, 2021 in the laboratory "Cell cultures, rickettsia and oncogenic viruses", NCIPD, a total of 317 clinical samples were tested, of which 81 in children (26% ) aged 5 months to 18 years. The total number of tests performed for HSV-1, HSV-2, CMV, EBV and VZV for the period is 298, of which 214 serological by indirect enzyme-linked immunosorbent assay ELISA for detection of specific immunoglobulins of classes IgM and IgG and 84 molecular virological using conventional and RealTime PCR for DNA detection.

**Results:** By indirect ELISA analysis of the tested 81 clinical samples *anti-HSV-1* IgM positive antibodies were detected in 6 of the patients (7.4%), *anti-HSV-2* IgM positive antibodies in 2 (2.4%), *anti-CMV* IgM positive antibodies in 15 (18.5%), *anti-EBV* IgM positive antibodies in 9 (11.1%) and *anti-VZV* IgM positive antibodies in 6 (7.4%) - a marker of acute infection. In the tested clinical trials, a positive *anti-IgG* result for the herpes panel was demonstrated in over 40% of patients. A positive PCR signal for CMV was detected in two patients (2.5%) in whole blood and urine clinical materials in a five-month-old and a seven-month-old children with clinical diagnoses of encephalitis.

**Conclusion:** The detection of viral DNA by PCR technology has become the "gold standard" for laboratory diagnosis of herpesvirus infections. Serological methods also have their place in the clinical diagnosis, as they reflect the body's immune response against herpes infection and allow to determine the duration of the infection.

**Keywords:** herpes simplex viral encephalitis, ELISA, PCR

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

Address:

Blvd. General N. G. Stoletov 44A, Virology Department  
02/9313818 Dragana Angelov

#### СЪПОСТАВКА НА ДИАГНОСТИЧНИТЕ ВЪЗМОЖНОСТИ НА BIO FIRE, BIO-MERIEUX И РУТИННИТЕ КУЛТУРЕЛНИ МЕТОДИ ПРИ КРЪВНИ И КОСТНО-СТАВНИ ИНФЕКЦИИ

Е. Терзиева<sup>1</sup>, М. Лесева<sup>1</sup>, Ц. Чалашканов<sup>1</sup>, Ц. Господинова<sup>1</sup>, М. Малчева<sup>1</sup>, Д. Първанова<sup>1</sup>

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



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Цел:** Да се оценят възможностите на Bio Fire, Bio-Merieux за спешна диагностика на кръвни и костно-ставни инфекции, в съпоставка с рутинните културелни методи.

**Материали и методи:** Изследвани са 23 ставни пунктата и 20 позитивирани в BactAlert, Bio-Merieux хемокултури. Използвани са панелите за хемокултури и ставни пунктати BCID2 и BJI, Bio Fire, Bio-Merieux и рутинно използваните в лабораторията методи за микробиологична диагностика.

**Резултати:** В 18 от 20 случая (90%) чрез BCID2 панелът и културелния метод се получават идентични резултати относно идентификацията на патогена и антимикробната му резистентност. Само в два случая панелът установява допълнителни бактериални мишени, които не се потвърждават от рутинната посевка. Вероятни причини за това са наличие на нежизнеспособни микроорганизми или такива в много ниски количества. При BJI панела резултатите от двата метода съвпадат в 19 случая (82,6%), в 16 от които не се установява микробен патоген и с двата метода. В два случая панелът установява микроорганизми, които не се откриват с културелния метод, а в други два случая с културелния метод се изолират микроорганизми, които не са включени в BJI панела, поради което не се установяват с него.

**Заключение:** Основно предимство на BCID2 панела пред културелния метод е ранната диагностика – около 1 час процедурно време. Рядко се установяват микроорганизми, които не се откриват с културелния метод. Може да се разчита на точността и бързината на негативния резултат, получен чрез BJI панела. Друго негово предимство е установяването на бактериални мишени, които не се откриват с културелния метод.

**Ключови думи:** Bio Fire BCID2 панел, Bio Fire BJI панел, костно-ставни инфекции.

Адрес и телефон за кореспонденция: УМБАЛСМ „Н.И. Пирогов“, Лаборатория по микробиология; тел. 029154 458.

## COMPARISON OF DIAGNOSTIC ABILITIES OF BIO FIRE, BIO-MERIEUX AND THE ROUTINE CULTURAL METHODS IN BLOOD AND BONE-JOINT INFECTIONS

*E. Terzieva, M. Leseva<sup>1</sup>, C. Chalashkanov<sup>1</sup>, C. Gospodinova<sup>1</sup>, M. Malcheva<sup>1</sup>, D. Parvanova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*UMHATEM „N.I. Pirogov”, Laboratory of Microbiology.*

**Aim:** To estimate the abilities of Bio Fire, Bio-Merieux for emergency diagnostic of blood and bone-joint infections in comparison with the routine cultural methods.

**Materials and methods:** Twenty three synovial fluids and 20 BactAlert, Bio-Merieux positive blood cultures were examined. BCID2 and BJI, Bio Fire, Bio-Merieux panels for blood cultures and synovial fluids, respectively, were used as well as current laboratory testing methods for microbiological diagnostics.

**Results:** In 18 out of 20 cases (90%) the BCID2 panel and the culture method gave identical results concerning identification of the pathogen and its antimicrobial resistance. In only two cases did the panel identify additional bacterial targets that were not confirmed by routine culture. Probable reasons for this are the presence of non-viable microorganisms or those in very low quantities. In BJI panel the results of both methods coincide in 19 cases (82,6%), in 16 of which no microbial pathogen was detected with both methods. In two cases the panel identifies microorganisms, that





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

are not detected by the culture method and in two other cases micro-organisms were isolated by the culture method that are not included in BJI panel панела, therefore they were not detected with it.

**Conclusion:** The main advantage of the BCID2 panel over the culture method is the early diagnostics – about one hour procedural time. Identification of micro-organisms that are not detected by the culture method is rare. You can rely on the accuracy and speed of the negative result obtained by the BJI panel. Another advantage is establishing of bacterial targets that are not detected by the culture method.

**Keywords:** Bio Fire BCID2 panel, Bio Fire BJI panel, bone - joint infections.

## РЕТРОСПЕКТИВЕН ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ЦЕЛОГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНИ ГЕНОМИ НА СЕДЕМ ИЗОЛАТА ОТ *BRUCELLA MELITENSIS*, ПОЛУЧЕНИ ОТ АВТОХТОННАТА ЕПИДЕМИЯТА НА БРУЦЕЛОЗА В БЪЛГАРИЯ ОТ 2015 Г.

*Йордан Ходжесв, Иван Иванов, Владимир Толчков, Борислава Цафарова, Иван Стойков, Деян Дончев, Румяна Ненова, Искра Томова, Лилия Горянова, Стефан Панайотов*

*Национален център по заразни и паразитни болести, София, България*

*кореспондиращ автор: jordanqvo@gmail.com*

Бруцелозата е зооноза, която се среща предимно при говеда, кози и овце с повече от половин милион случаи годишно. При хора се проявява с бактериемия и симптоми, подобни на треска и е заболяване, което може да доведе до сериозни усложнения. България е известна с двата си автохтонни взрива на бруцелоза, последният от които е през 2015 г., с две огнища - югозападно (Рила) и северно (Ракита). Седем от изолатите бяха потвърдени имунологично и спектрометрично (MALDI-TOF-MS) като *B. melitensis*. В последните години, секвенирането на цели геноми (whole-genome sequencing - WGS) се превърна в златен стандарт за генетично охарактеризиране на бактериални щамове.

Целта на настоящото изследване бе да се опишат филогенетичните връзки между геномите на тези изолати, за да се изясни произходът на изследвания взрив.

Беше изолирана геномна ДНК от седемте щамове *B. melitensis* и след това беше секвенирана с помощта на Illumina MiSeq. Биоинформатичната обработка на резултатите включваше следните стъпки: Суровите секвенции бяха сглобени от алгоритъма Unicycler. Асемблираните фрагменти бяха обработени чрез платформата PATRIC за таксономична идентификация. Допълнително беше генериран списък на 100-те най-сходни генома налични в GenBank. Бяха подбрани 10 от най-близките щамове (изолирани от Турция), както и 4 по-далечни с произход от Сирия, служещи като външна група. Към секвенираните от нас щамове бяха добавени два други (*Brucella* 7 и *Brucella* 8) български щамове изолирани през (съответно през 2007 и 2008 година) за сравнение с тези от огнището. Всички гореспоменати геноми бяха обработени чрез платформата за филогенетична класификация Type Genome



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Server (TYGS). Анализът доказва три ясно изразени клъстера: 1) сирийските щамове са групирани заедно и са генетично най-отдалечени; 2) всички български щамове от регионите Рила и Ракита образуват група заедно с изолата Brucella 7; 3) турските щамове образуват отделна група заедно със щамата Brucella 8. В заключение, филогенетичният анализ на секвенираните от нас щамове предполага, че двойно-фокалният взрив от 2015 г. произлиза от един щам. Резултатите изключват с висока степен на достоверност Турция, като страна на произход на инфекцията. Включването в анализа на щамове *B. melitensis* от други съседни страни би дало допълнителна информация за произхода на тази епидемия.

**Ключови думи:** Бруцелоза, *Brucella melitensis*, секвениране на целия геном, филогенеза

**Благодарности:**

Изследването е финансирано чрез проекти на Европейския фонд за регионално развитие чрез ОПНОИР 2014-2020 по договор BG05M2OP001-1.002-0001-C04 и Фонд научни изследвания по договор КП-06-ПН-51/8.

**RETROSPECTIVE WHOLE-GENOME SEQUENCING PHYLOGENETIC  
CHARACTERIZATION OF SEVEN *BRUCELLA MELITENSIS* ISOLATES FROM THE 2015  
BRUCELLOSIS OUTBREAK IN BULGARIA**

*Yordan Hodzhev, Ivan Ivanov, Vladimir Tolchkov, Borislava Tsafarova, Ivan Stoikov, Deyan Donchev, Rumiana Nenova, Iskra Tomova, Liliya Goryanova, Stefan Panaiotov*

*National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria  
corresponding author: [jordangvo@gmail.com](mailto:jordangvo@gmail.com)*

Brucellosis is a zoonosis primarily in cattle, goats, and sheep with more than half a million cases yearly. It is manifested with bacteremia and fever-like symptoms in infected humans, which may lead to complications. Bulgaria is known for its two autochthonous outbreaks of brucellosis, the last of which occurred in 2015 with two foci - south-west (Rila) and north (Rakita) regions of the country. Seven isolates were confirmed, immunologically and spectrometrically (MALDI-TOF-MS) as *B. melitensis*. Recently, whole-genome sequencing (WGS) became a gold standard for the genetic characterization of bacterial isolates.

The aim of the present study was to characterize phylogenetic relationships between whole genomes of those isolates in order to clarify the origin of the investigated outbreak.

Whole genomic DNA was isolated from the seven *B. melitensis* strains and was sequenced using the Illumina MiSeq. Raw sequences were assembled by the Unicycler pipeline. Then contigs were subjected to the PATRIC platform for taxonomic identification. A listing of the 100 most similar genomes available at GenBank was also generated. A selection of the 10 closest (Turkish) *B. melitensis* strains and 4, more distant (Syrian, serving as an outgroup) strains was prepared. Additionally, two other genomes (Brucella 7 and Brucella 8) of previously isolated Bulgarian strains were added to the selection to compare with those from the outbreak. All aforementioned



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

genomes were subjected to the Type Genome Server (TYGS) phylogenetic classification platform. Analysis revealed three pronounced clusters: 1) Syrian strains were grouped together and were most genetically distant from the others; 2) all Bulgarian strains from Rila and Rakita formed also pronounced group together with the Brucella 7 isolate; 3) the Turkish strains formed a different group along with Brucella 8 strain. In conclusion, WGS phylogenetic analysis suggested that the double focal outbreak from 2015 originates from a single strain. The results exclude with a high degree of certainty Turkey as a country of origin of the infection. Further, inclusion in the analysis of WGS of *B. melitensis* strains from other neighboring countries would clarify the epidemiology of this outbreak.

**Keywords:** Brucellosis, *Brucella melitensis*, whole-genome sequencing, phylogeny

#### **Acknowledgements:**

This study was supported by: the ERDF, OP Science and education for smart growth 2014-2020, grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 and the Bulgarian Nationals Science Fund, grant KP-06-PN-51/8, 2021

### **ДИНАМИЧЕН МОДЕЛ НА МИКРОБИОМНА ДИСБИОЗА НА КРЪВТА ПРИ БЕЛОДРОБНА САРКОИДОЗА**

Йордан Ходжев<sup>1</sup>, Борислава Цафарова<sup>1</sup>, Владимир Толчков<sup>1</sup>, Николай Янев<sup>2</sup>, Силвия Иванова<sup>2</sup>, Димитар Костадинов<sup>2</sup>, Ваня Юркова<sup>2</sup>, Стефан Панайотов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Катедра по белодробни болести, Медицински университет София, София, България  
кореспондиращ автор: [y.hodzhev@ncipd.mail.org](mailto:y.hodzhev@ncipd.mail.org)

Саркоидозата е болест, свързана с автоимунни и инфекциозни патофизиологични механизми. В засегнатата тъкан се идентифицират грануломи, съставени от епителиоидни макрофаги, многоядрени гигантски клетки, фибробласти, лимфоцити и фрагменти от патогени (антигени). Микробиомната дисбиоза е относително нова концепция, която предполага, че съставът и изобилието от микробиоти управлява хуморалната хомеостаза и в цялост здравето на гостоприемника. Не е ясно дали промените в микробиома на кръвта могат да модулират началото и прогресията на белодробната саркоидоза.

Целта на настоящото изследване беше да се създаде динамичен модел на белодробна саркоидоза на базата на количествените промени, т.е. микробиомната дисбиоза на кръвта.

За да разработим този динамичен модел на дисбиоза ние използвахме собствени емпирични данни за състава на кръвния микробиом на двама здрави и трима болни индивида. Количествения състав на основния микробиом послужи за изчисляване на скоростта на растеж на всеки таксон и също така предостави изходните стойности на биоразнообразието в модела. Времовата еволюция на количествения състав на микробиома беше моделирана с помощта на система от обобщени уравнения на Лотка - Волтера (generalized Lotka-Volterra - gLV), където динамиката на всеки от преобладаващите микробиоти беше представена от



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

едно уравнение. За всички изчисления беше използвана платформата Web-gLV (<https://web.rniapps.net/webglv/>).

Успяхме да моделираме количествената динамиката на основния (core) микробиом при здрави лица и такива с белодробна патология. Беше направена оценка на промените в основния микробиом при саркоидозата.

В заключение, успяхме да генерираме динамичен модел на дисбиоза на кръвния микробиом свързан с белодробната саркоидоза. Моделът може да бъде допълнително използван за тестване на експериментални сценарии при изучаване на етиологията на саркоидозата.

**Ключови думи:** белодробна саркоидоза, кръвен микробиом, микробиомна дисбиоза, обобщен модел на Лотка - Волтера

**Благодарности:** Изследването е финансирано от чрез проект на Фонд научни изследвания (ФНИ) по програма ВИХРЕН, договор КП-06-ДБ/10 - 21.12.2019

## A DYNAMIC MODEL OF BLOOD MICROBIOME DYSBIOSIS IN PULMONARY SARCOIDOSIS

*Yordan Hodzhev<sup>1</sup>, Borislava Tsafarova<sup>1</sup>, Vladimir Tolchkov<sup>1</sup>, Nikolay Yanev<sup>2</sup>, Silvia Ivanova<sup>2</sup>,  
Dimitar Kostadinov<sup>2</sup>, Vanya Yourukova<sup>2</sup>, Stefan Panaiotov<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>*Department of Pulmonary Diseases, Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria*

*corresponding author: y.hodzhev@ncipd.mail.org*

Sarcoidosis illness is associated with autoimmune and infectious pathophysiological mechanisms. In the affected tissue, we identify granulomas composed of epithelioid macrophages, multinucleated giant cells, fibroblasts, lymphocytes, and pathogen (antigen) debris. Microbiome dysbiosis is a recent concept suggesting that host microbiota composition and abundance govern the host's homeostasis and health. Specifically, it is unclear if and how shifts in the blood microbiome could modulate the onset and progression of pulmonary sarcoidosis.

The aim of the present study was to create a dynamic lung sarcoidosis model, which explored quantitative microbiota changes in the blood (microbiome dysbiosis) over time.

To develop the dysbiosis model dynamics we used our empirical data from blood microbiome datasets of 2 healthy and 3 diseased individuals. Core microbiome abundance served to calculate the growth rate of each taxon and also provided the initial values of the model. Time evolution of the microbiome abundance was modeled using a system of generalized Lotka-Volterra (gLV) equations, where the dynamics of each of the core microbiota were represented by a single equation. For all calculations, the Web-gLV platform was used (<https://web.rniapps.net/webglv/>).

We were able to model core microbiome abundance dynamics in health and lung sarcoidosis development and progression in which the impact of quantitative changes over time in the core microbiota was evaluated.

In conclusion, we were able to generate a dynamic model of blood microbiome dysbiosis associated with pulmonary sarcoidosis. This can be further used for testing experimental scenarios in studying sarcoidosis etiology.

**Keywords:** lung sarcoidosis, blood microbiome, microbiome dysbiosis, generalized Lotka-Volterra model



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

**Acknowledgments:** This work was supported by the National Science Programme VIHREN and the Bulgarian National Science Fund (BNSF) with grant N: KP-06-DB/10 - 21.12.2019

## МЕТОДОЛОГИЯ ЗА ИЗОЛИРАНЕ НА ДНК И ТАРГЕТНО 16S И 18S МЕТАГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНЕ НА КРЪВНИ И БИОПСИЧНИ ПРОБИ ОТ ПАЦИЕНТИ СЪС САРКОИДОЗА

Борислава Цафарова<sup>1</sup>, Йордан Ходжесв<sup>1</sup>, Владимир Толчков<sup>1</sup>, Ваня Юрукова<sup>2</sup>, Силвия Иванова<sup>2</sup>, Димитър Костадинов<sup>2</sup>, Николай Янев<sup>2</sup>, Любомира Григорова<sup>1</sup>, Стефан Панайотов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Университетска многопрофилна болница за активно лечение по белодробни болести „Света София“, София

Автор за кореспонденция: Борислава Цафарова, e-mail: [b.tsafarova@ncipd.org](mailto:b.tsafarova@ncipd.org), тел: 0898718794

Етиологията на саркоидозата не е изяснена, но все повече данни сочат за микробно участие в развитието на заболяването - чрез въздействие на отделни микробни видове или следствие от дисбиоза на микробиома. Чрез таргетно секвениране на 16S и 18S рибозомална ДНК, може да бъде направена качествена и количествена оценка на бактериалния и гъбичен микробиом в белите дробове и кръвта на пациенти със саркоидоза.

Целта на настоящото проучване е да се разработи методология за пробоподготовка, изолиране на метагеномна ДНК и изготвяне на геномни библиотеки за 16S и 18S таргетно секвениране на биопсичен материал и кръв от пациенти със саркоидоза.

Материали и методи. Подбрани бяха кръв и белодробен биопсичен материал от 4 пациента с доказана саркоидоза. Биопсиите, получени в 70% етанол, бяха центрофугирани, промити с дестилирана вода и инкубирани при 56°C в 1 мл лизиращ буфер съдържащ 0,5M NaCl; 0,05M EDTA; 0,05M Tris HCl pH 8; 4% SDS и 10 µl протеиназа К. Кръвта беше осмотично лизирана, след което утайката беше двукратно промита с д. вода съдържаща 1U ДНаза I, за редуциране на човешката ДНК и разтворена в 1 мл от лизиращия буфер. Екстракцията на ДНК, беше извършена чрез биене с циркониеви перли в комбинация с висока концентрация на SDS, сол и EDTA. Тъканните отломки, както и SDS бяха премахнати, чрез преципитация с 10M амониев ацетат, а нуклеиновите киселини – утаени с изопропанол. Геномните библиотеки бяха изготвени чрез фирмен кит NEXTFLEX 16S V4 & 18S ITS Amplicon-Sec Kit (PerkinElmer, USA). За таргетното ампликонно секвениране използвахме MiSeq Reagent Kits v2 (300-cycles) и апарат Illumina MiSeq.

Резултати. ДНК беше успешно изолирана от всяка проба. Средният добив от 16S секвенирането беше 37 784 рида ± 5 387 и 302 833 рида ± 65 502 при 18S секвенирането или десет пъти повече ридове за гъбичките. Микробната ДНК в кръвта беше по-малко от тази в биопсиите – между 1-3 %.





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Заклучение. Чрез описаната методология е възможно изолирането на ДНК и провеждането на метагеномен анализ на проби с ниско микробно съдържание с цел проучване на етиологията при саркоидоза.

Благодарности. Изследването е финансирано от ННП „ВИХРЕН“ и договор с ФНИ - КП-06-ДВ/10 от 21.12.2019, ‘SARCOIDOSIS’

## METHODOLOGY FOR DNA ISOLATION AND TARGETED 16S AND 18S METAGENOMIC SEQUENCING OF BLOOD AND BIOPSY SAMPLES FROM PATIENTS WITH SARCOIDOSIS

*B. Tsafarova<sup>1</sup>, Y. Hodzhev<sup>1</sup>, V. Tolchkov<sup>1</sup>, V. Youroucouva<sup>2</sup>, S. Ivanova<sup>2</sup>, D. Kostadinov<sup>2</sup>, N. Yanev<sup>2</sup>, L. Grigorova<sup>1</sup>, S. Panaiotov<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>NCIPD - Sofia

<sup>2</sup>University Multiprofile Hospital for Active Treatment of Pulmonary Diseases "St. Sofia", Sofia

corresponding author: Borislava Tsafarova, e-mail: [b.tsafarova@ncipd.org](mailto:b.tsafarova@ncipd.org), tel: 0898718794

Sarcoidosis aetiology is still unclear, but there is strong evidence for the microbial contribution in its pathogenesis manifested either by infection or microbiome dysbiosis. Qualitative and quantitative assessment of the bacterial and fungal microbiome in the lungs and blood of patients with sarcoidosis can be performed by target sequencing of 16S and 18S ribosomal DNA.

The study aimed to develop a methodology for sample preparation, metagenomic DNA extraction, and genomic library preparation for 16S and 18S target sequencing of biopsy and blood samples from patients with sarcoidosis.

Materials and methods. Blood and lung biopsy samples from 4 sarcoidosis patients were selected for the study. Biopsies obtained in 70% ethanol were centrifuged, washed with distilled water and incubated at 56 ° C in 1 ml lysis buffer containing 0.5M NaCl; 0.05M EDTA; 0.05M Tris HCl pH 8; 4% SDS and 10 µl proteinase K. Blood was osmotically lysed, then the pellet was washed twice with dH<sub>2</sub>O containing 1U DNase I, to reduce human DNA and finally dissolved in 1 ml of lysis buffer. DNA extraction was performed by zirconium beads beating in combination with a high concentration of SDS, salt and EDTA. Most of the impurities and the SDS were removed by precipitation with 10M ammonium acetate and then the nucleic acids were recovered by precipitation with isopropanol. Genomic libraries were prepared using NEXTFLEX 16S V4 & 18S ITS Amplicon-Sec Kit (PerkinElmer, USA). We used MiSeq Reagent Kits v2 (300-cycles) and the Illumina MiSeq sequencer for the target amplicon sequencing.

Results. DNA was successfully isolated from all samples. The average yield from the 16S sequencing was 37 784 reads ± 5 387 and 302 833 reads ± 65 502 for the 18S sequencing, which is ten times more reads for the microbial fungi. In the blood, the microbial DNA was less than in the biopsies - between 1-3%.

Conclusion. The described methodology is suitable for DNA isolation and metagenomic analysis of samples with low microbial content in order to study the aetiology of sarcoidosis.

Funding: BNSF program VIHREN, KP-06-DV/10-21.12.2019



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## ОЦЕНКА НА КЛИНИЧНОТО И ИКОНОМИЧЕСКО ВЪЗДЕЙСТВИЕ НА МЕТОДИ ЗА БЪРЗА МИКРОБИОЛОГИЧНА ДИАГНОСТИКА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ИНФЕКЦИЯ НА КРЪВТА: АНАЛИЗ НА РАЗХОДИТЕ

Г. Ленгерова <sup>1,2,3</sup>, Р. Райчева <sup>4</sup>, Й. Калчев <sup>1,2,3</sup>, А. Ангелова <sup>1,2,3</sup>, ММ. Петров <sup>1,3</sup>, М. Мурджева <sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup>Лаборатория по Микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“ - Пловдив

<sup>3</sup>Научноизследователски институт на Медицински университет - Пловдив

<sup>4</sup>Катедра Социална медицина и общественото здраве, Факултет по Обществено здраве,  
Медицински университет - Пловдив

**Цел:** Да се оцени икономическият и здравен ефект при прилагането на бързи методи за микробиологична диагностика - флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH), мултиплексен PCR (mPCR) и масспектрометрия (MALDI-TOF MS) при пациенти с инфекция на кръвта.

**Материали и методи:** В анализа участват 115 пациента от Клиника по анестезиология и интензивно лечение (КАИЛ) към УМБАЛ „Св. Георги“ - ЕАД, гр. Пловдив. Информацията относно характеристиките на пациента и използваните променливи е получена от болничната база: продължителност на престоя, терапия и изход от лечение на пациента, цени на клинични пътеки и клинични процедури, разходи за антимикробно лечение, среден разход за пациент, разход за леглоден и разходи за диагностични тестове, индиректни разходи.

**Резултати:** Въведените нови методи намаляват леглодните на пациентите в много тежко състояние при навременна смяна на антимикробното лечение (25.5 дни срещу 34 дни), подобряват изхода от заболяването и намаляват значително преките и непреките разходи за лечение (приблизително 12 500 лв. на пациент), а също така водят до по-ниско общо разходване на финансов ресурс за лечебното заведение. Установи се, че пациентите, диагностицирани с бързи тестове, прекарват средно една седмица по-малко на антибиотична терапия, въпреки че генерират по-висок среден разход за лечение, т.е. спестяват директни разходи от по-краткия болничен престой. При изследваната група пациенти в много тежко състояние, тествани само с културелно изследване, директно относимата към стандарта разлика демонстрира 34% увеличаване на средния болничен престой, също така увеличаване на средната продължителност на емпиричната антибиотична терапия с 6%, както и добавяне на 35% към директните, индиректните разходи и тези за клинични процедури.

**Заключение:** Проучените три метода (FISH, mPCR, MALDI-TOF) имат предимства пред конвенционалните методи на изследване, използвани дълги години в микробиологичните лаборатории за диагностика на инфекции на кръвта. По-ранно доказване на етиологичния агент и адекватна преценка относно терапията и състоянието на пациента води до намаляване на разходите за хоспитализация при пациентите с бактериемия/фунгемия.

**Ключови думи:** инфекция на кръвта, икономически анализ, разходи



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## EVALUATION OF THE CLINICAL AND ECONOMIC IMPACT OF METHODS FOR RAPID MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF BLOODSTREAM INFECTION: A COST ANALYSIS

G. Lengerova<sup>1,2,3</sup>, R. Raycheva<sup>4</sup>, Y. Kalchev<sup>1,2,3</sup>, A. Angelova<sup>1,2,3</sup>, MM. Petrov<sup>1,3</sup>,  
M. Murdjeva<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical microbiology and immunology „Prof. Dr. Elissay Yanev”, Faculty of Pharmacy, Medical University - Plovdiv, Bulgaria

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

<sup>3</sup>Research Institute at Medical University - Plovdiv, Bulgaria

<sup>4</sup>Department of Social Medicine and Public Health, Faculty of Public Health, Medical University – Plovdiv

**Aim:** To evaluate the economic and clinical effect of the application of rapid methods for microbiological diagnosis - fluorescent *in situ* hybridization (FISH), multiplex PCR (mPCR), and masspectrometry (MALDI-TOF MS) in patients with a bloodstream infection.

**Materials and methods:** Our study included 115 patients from the Clinic of Anesthesiology and Intensive Care (ICU) at the University Hospital "St. George", Plovdiv. Information about the patient's characteristics and variables of interest was obtained from the hospital database: length of stay, therapy and treatment outcomes, the cost of the clinical pathway and clinical procedures, the cost of antimicrobial therapy, the average cost per patient, expenses for diagnostic tests and length of stay, and indirect hospital costs.

**Results:** The newly introduced rapid methods reduced the hospital length of stay for patients in severe condition due to the timely change of antimicrobial treatment (from 34 days to 25.5 days); improved the outcome of the disease and significantly declined direct and indirect treatment costs (approximately BGN 12 500 per patient). They also decreased the overall spending of the medical institution. Patients diagnosed with rapid tests were found to spend an average of one week less on antibiotic therapy, although they generated a higher average cost for treatment – saving direct and indirect costs from shorter hospital stays. The study group of patients with severe conditions the directly attributable to the standard culture-based methods demonstrated a 34% increase in the mean hospital stay; 6% increase in the average duration with empirical antibiotic therapy 35% increase in both direct and indirect costs, as well as in the cost of clinical procedures.

**Conclusion:** The three methods (FISH, mPCR, MALDI-TOF MS), used in the study demonstrated their advantages over conventional testing methods, used for many years in microbiological laboratories for the diagnosis of blood infections. Rapid detection of the etiological agent, adequate assessment of therapy, and the medical condition reduced the cost of hospitalization of patients with bacteremia/fungemia.

**Keywords:** bloodstream infection, economic impact, clinical impact

## БЪРЗА И НАВРЕМЕННА ДИАГНОСТИКА НА ПРОИЗВЕЖДАЩИ ВЕРОЦИТОТОКСИН *E. COLI* КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ

М. Павлова<sup>1</sup>, Ек. Александрова<sup>1</sup>, В. Велев<sup>2</sup>



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести, НРЛ Чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия.

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

**Въведение.** Групата, произвеждащи вероцитотоксин *E. coli* (VTEC), е най-важната патогенна група на диарогенните *E. coli* (DEC). Щамовете VTEC имат много ниска инфективна доза и могат да причинят сериозни хранителни инфекции при хора, като хеморагичен колит и хемолитичен ураемичен синдром (HUS), особено при деца под пет години и възрастни хора, които изискват болнично лечение. Традиционните диагностични методи могат да отнемат няколко дни, за да се получи резултат и те не са широко достъпни в нашата страна. За разлика от докладите на ЕС за инциденти и огнища на *E. coli* O157:H7, в България non-O157 VTEC са основната причина за кървава диария.

С цел да улесним диагностицирането и да спомогнем намаляване на случаите, които не са свързани с O157 VTEC у нас, проведохме дългосрочно проучване на фекални клинични проби и изолати на различни патотипа *E. coli* чрез бързи тестове за произвеждащи вероцитотоксин *E. coli*.

**Резултати.** В това проучване 42% от изследваните фекални проби са положителни за произвеждащи вероцитотоксин *E. coli* с лидери на VT1 в O111, O26 серогрупи при деца и O112 и O164 в серогрупи при възрастни. Няколко от пробите бяха културелно отрицателни, поради започната емпирична антимикробна терапия, но произвеждащи вероцитотоксин - положителни от изследване с едностъпков бърз тест Certest.

**Извод.** Бърз тест за потвърждение, базиран на латексова аглутинация, като Certest Biotec, ще бъде изключително значим при диагностицирането и мониторинга на случаите на VTEC, особено при уязвими лица, поради липсата на серологичен анализ на DEC в микробиологичните лаборатории в България.

**Ключови думи:** произвеждащи вероцитотоксин *E. coli*, хеморагичен колит, хранителни инфекции

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изследването е проведено с финансовата подкрепа на Оперативна програма Наука и образование за интелигентен растеж, Грант BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални транслационни и клинични изследвания на инфекции и имунитет“.

## RAPID AND TIMELY DIAGNOSIS OF CLINICALLY SIGNIFICANT VEROCYTOTOXIN *E. COLI*

M. Pavlova<sup>1</sup>, Ek. Alexandrova<sup>1</sup>, V. Velev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NCIPD- Sofia, Department of Microbiology, NRL of Enteric diseases

<sup>2</sup>SHPID “Prof. Iv. Kirov” - Sofia, Medical University of Sofia

**Introduction.** The verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) group is the most important pathogroup of diarrheagenic *E. coli* (DEC). The VTEC strains have a very low infective dose and can cause serious foodborne infections in humans, such as haemorrhagic colitis and haemolytic



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

uraemic syndrome (HUS), especially in children under five and the elderly, which require hospital treatment. Traditional diagnostic methods can take several days to produce a result and they are not widely available in our country. In contrast to EU reports of *E. coli* O157:H7 incidents and outbreaks, in Bulgaria **non-O157 VTEC are the main cause of bloody diarrhoea. With the aim to facilitate the diagnosis and decrease non-O157 VTEC incidents in our country, we conducted a long-term study on faecal clinical strains of different pathogroup *E.coli* through rapid verotoxin tests. Materials and methods. For the 18-month period of the KP-06-M43/2 research project study 223 bloody faecal samples (131 children and 92 adults) from hospitalised patients in one clinical centre- “Prof. Iv. Kirov” hospital, Sofia, were examined for VT1/VT2 producing *E. coli* by one step combo card test (Certest Biotec S.L., Spain) according to the manufacturer instructions as well as faecal *E. coli* culture.**

**Results.** In this study, 42% of the examined faecal samples were positive for verocytotoxin-producing *E. coli* with the leader of VT1 in O111, O26 serogroups in children and O112 and O164 serogroups in adults. Several of the samples were culture negative because of the started empiric antimicrobial therapy but were verocytotoxin-producing - positive by the one-step Certest. **Conclusion.** A rapid latex agglutination-based confirmation test, such as **Certest Biotec, will be extremely significant in the diagnosis and monitoring of VTEC incidents, especially in vulnerable individuals, because of the lack of DEC serological analysis in Bulgarian microbiological laboratories.**

**Keywords:** verocytotoxin *E. coli*, haemorrhagic colitis, food infections

#### ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Operational Program Science and Education for Smart Growth, Grant BG05M2OP001-1.002-0001-C04 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity".

### МИКОТИЧНА ИНФЕКЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТКА НА ХРОНИЧНА ПЕРИТОНЕАЛНА ДИАЛИЗА

Л.Иванова<sup>1</sup>, Б. Захариева<sup>1</sup>, Б. Благов<sup>2</sup>, Д. Менчев<sup>2</sup>, Е. Тилкиян<sup>3</sup>, Т.Кускунов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Микробиология към УМБАЛ „ Каспела“

<sup>2</sup>Отделение по хемодиализа към УМБАЛ „ Каспела“

<sup>3</sup>Отделение по Нефрология към УМБАЛ „ Каспела“

Перитонеалната диализа (ПД) се извършва при 5% от всички диализирани пациенти в нашата страна, докато в някои други страни тя достига до 15%. Нейните предимства са : независимост на пациента от болнично лечение (може да бъде направена у дома, на работа и в подходящо за пациента време, ръчно или с апарат), по-малка хемодинамична нестабилност по време на хемодиализа и др. При ПД инфекцията перитонитът е най-често срещаното сериозно усложнение- средно 1 епизод / 10 пациенто месеца, а 2-10% от случаите се причиняват от гъбични патогени. Представяме случай на рядко срещана гъбична инфекция при полиморбидна пациентка с грануломатоза на Вегер, която провежда ПД. При посявка от катетър и перитонеален диализат върху кръвен агар, Сабуро и хром агар се наблюдават





ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

необичайни черни лъскави колонии. Идентификацията чрез MALDI-TOF показва, че се касае за инфекция с *Exophiala dermatitidis* (термофилна черна гъба със слабо разпространение в природата, главно в тропичните райони). Независимо от провежданата терапия се наложи перитонеалният катетър да бъде отстранен според изискванията на стандарта, тъй като беше колонизиран със същия причинител. Поради усложненото състояние на пациентката и множеството съпътстващи заболявания изходът беше фатален. Гъбичните инфекции изискват точна и навременна диагноза, подходяща антимикотична терапия и спазване на стандартите при диализиране на пациентите.

Гр. Пловдив, ул. „София“, 66 ( УМБАЛ „ Каспела“, блок 1)  
0899 826 319, д-р Лилия Иванова  
Имейл: liliqtodo@abv.bg

Ключови думи – перитонеална диализа, перитонит, *Exophiala dermatitidis*

## FUNGAL INFECTION IN PATIENT ON PERITONEAL DIALYSIS

*L. Ivanova<sup>1</sup>, B. Zaharieva<sup>1</sup>, B. Blagov<sup>2</sup>, D. Menchev<sup>2</sup>, E. Tilkiyan<sup>3</sup>, T. Kuskunov<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Microbiological laboratory, University Hospital Kaspela*

<sup>2</sup>*Hemodialysis Department, University Hospital Kaspela*

<sup>3</sup>*Department of Nephrology, University Hospital Kaspela*

Peritoneal dialysis (PD) is performed in 5% of all dialysis patients in our country, while in some other countries it reaches 15%. PD may have certain advantages over HD, including simplicity of therapy, reduced need for medical staff, minimal requirement for technical support. PD can be done at home, at work and at a time suitable for the patient and reduce hemodynamic instability during hemodialysis, etc. Peritonitis is the most common serious complication - an average of 1 episode / 10 patient months. The incidence of fungal peritonitis is between 2% and 10% of all infective episodes, according to the data in the literature. We present a case of a polymorbid patient on PD with Wegener's granulomatosis, who developed a rare fungal infection. When we inoculated a catheter and peritoneal dialysate on blood agar, Saburo agar and Chrome agar, we observed unusual black shiny colonies. The identification by MALDI -TOF showed that it was an infection caused by *Exophiala dermatitidis* (thermophilic black fungus with low prevalence in nature, mainly in the tropics). Regardless of the therapy, it was necessary to remove the peritoneal catheter because it was colonized with the same cause according to the standard practice. Due to the complicated condition of the patient and the many concomitant diseases, the outcome for the patient was fatal. Fungal infections require accurate and timely diagnosis, appropriate antifungal therapy, and adherence to dialysis standards.



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Keywords- peritoneal dialysis, peritonitis, Exophiala dermatitidis

## НОКЪТНИ ПАТОГЕНИ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

Райкова В<sup>1</sup>, Байкушев Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медицински Университет-София, Катедра по Медицинска микробиология

### Абстракт:

Нарушенията на ноктите могат да се далжат на генетична, инфекциозна, възпалителна, неопластична и/или травматична етиология.

Цел на настоящето проучване бе определяне обхвата на възможните инфекциозни патогени и тяхната честота на разпространение сред лица с нокътни изменения.

Материали и методи: Бяха проучени материали от ноктите и околните тъкани на 35 лица, при които предварително бяха изключени генетични и неопластични заболявания. Всички проби бяха изследвани микроскопски (20% КОН с 40% диметилсулфоксид) и подложени на култивиране върху кръвен агар, MacConkey агар, хром агар Candida и SDA хлорамфеникол (Becton Dickenson) за изолиране и идентифициране на инфекциозни патогени. Посевките бяха инкубирани при 37°C за 24-48 часа за рутинно микробиологично изследване и за още три дни при стайна температура за изолиране на гъбни агенти. Клиничните изолати бяха идентифицирани въз основа на фенотипните характеристики на колонииите, микроскопското изследване и тестове за ферментация и асимилация на въглехидрати.

Резултати: От 35 изследвани проби 5 дадоха отрицателни резултати, без растеж. От 30 положителни материала моноинфекция бе доказана при 9 – 1 със *S. aureus*, 2 с *P. aeruginosa*, 3 с *Candida* spp., 2 с *Trichophyton* spp. и изненадващо 1 със *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*. Коинфекции със същите патогени плюс *Rodotorulla*, *Epidermophyton*, *Klebsiella* и *Enterococcus* бяха открити в 21 проби.

Заклучения: Въпреки че заболяванията на ноктите са относително редки, лекарите трябва да са наясно с техния разнообразен обхват – генетични, инфекциозни, възпалителни, неопластични или травматични; и тяхното значение – те могат да разкрият различни локални или системни състояния. От инфекциозните причинители на нокътни промени често срещани бяха бактериите и гъбните агенти. *Candida* spp. изолатите бяха по-разпространени спрямо дерматофитите, известни като основният фактор за гъбични заболявания на ноктите. Макар не толкова чести *Sarcoptes scabiei* не трябва да се изключват от диагностичната палитра на нокътните промени. Прецизната диагностика е в основата на адекватно и навременно лечение, което може да ограничи развитието на тежки и системни състояния.

Ключови думи: нокътни изменения, патогени, разпространение

## NAIL PATHOGENS IN THE CLINICAL PRACTICE

Raykova V<sup>1</sup>, Baykushev R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical University of Sofia, Department of Medical microbiology



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

## Abstract

Genetic, infectious, inflammatory, neoplastic and traumatic aetiologies could be reason of nail disorders.

Aim of this study was to determine the range of pathogens and their prevalence in persons with nail changes.

Materials and methods: Scrapings from the nail and surrounding tissues were obtained from 35 persons in which genetic, neoplastic and general skin diseases with related skin disorders were excluded. All the samples were examined microscopically (20% KOH with 40% dimethyl sulfoxide) and subjected to cultivation on Blood agar, MacConkey agar, Chrom agar Candida and SDA Chloramphenicol (Becton Dickenson) for isolation and identification of infectious pathogens. Plates were incubated at 37°C for 24-48 hours for routine microbiological testing and for additional three days at room temperature for the fungi isolation. Clinical isolates were identified on the basis of phenotypic characteristics of the colonies, microscopic examination, and carbohydrate fermentation and assimilation tests.

Results: Of the 35 tested samples 5 remained negative. Of the 30 positive monoinfection was proved in 9 persons – 1 with *S. aureus*, 2 with *P. aeruginosa*, 3 with *Candida* spp., 2 with *Trichophyton* spp. and surprisingly 1 with *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*. Co-infections were detected in 21 samples in which the pathogens were the same plus *Rodotorula*, *Epidermophyton*, *Klebsiella* and *Enterococcus*.

Conclusions: Although nail disorders are relatively rare doctors should be aware of their diverse scope – genetic, infectious, inflammatory, neoplastic or traumatic; and their importance – they can reveal different local or systemic conditions (scabies). From the infection reasons of nail changes common are the bacteria and fungi. Interestingly, in this research work *Candida* spp. was more prevalent than the dermatophytes known as the major factor of fungal nail disorders. Even not so commonly detected parasites as *Sarcoptes scabiei* do not have to be excluded. The precise diagnosis is the base of adequate and on time started treatment.

Key words: nail changes, pathogens, prevalence

## ТЕРЕННО ПРОУЧВАНЕ НА МИКРОБНАТА ВЪЗДУШНА КОНТАМИНАЦИЯ ПРИ ИЗПОЛЗВАНЕ НА UV СИСТЕМА В УЧИЛИЩНА КЛАСНА СТАЯ.

Св. Йорданова<sup>1</sup>, М. Николова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести, София  
[disinfection@ncipd.org](mailto:disinfection@ncipd.org); [disinfection@abv.bg](mailto:disinfection@abv.bg)

**Цел:** Целта на проучването е да се установи микробната контаминация на въздуха в класна стая на столично училище в реални условия при използване на система с ултравиолетово лъчение, проектирана за дезинфекция на въздух в учебна среда. **Материали и методи:** Изпитванията са проведени в практически условия в учебна класна стая (46 m<sup>2</sup>) по активен метод за пробонабиране от въздух. Проучването включва два етапа - първият обхваща установяване ефективността на самата система, а вторият – ефективността на системата в класната стая в присъствие на доброволци, имитиращи протичане на учебен час. **Резултати:**



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

Ефективността на самата UV система по отношение на общата микробна замърсеност на въздуха е >99 %. Максималната ефективност на разработената система в обема на учебната стая достига около 41 % в условия на отворени прозорци и врати по време на междучасието. **Заклучение:** Резултатите показват, че за разработване на системи за дезинфекция на въздух от съществено значение е не само доказване ефективността на съответната система, но и наличие на изпитвания в реални практически условия – присъствие на хора в определен обем помещение.

**Ключови думи:** микробна въздушна контаминация, класна стая, UV дезинфекция.

## FIELD STUDY OF MICROBIAL AIR CONTAMINATION USING AN UV SYSTEM IN A SCHOOL CLASSROOM.

S. Yordanova<sup>1</sup>, Nikolova M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Centre of Infectious and Parasitic Diseases  
[disinfection@ncipd.org](mailto:disinfection@ncipd.org); [disinfection@abv.bg](mailto:disinfection@abv.bg)

**Objective:** The aim of the study was to determine the microbial air contamination in a school classroom with installing UV system designed for air disinfection in a school environment. **Materials and methods:** The tests were conducted in practical conditions in a classroom (46 m<sup>2</sup>) by active method for air sampling. The study includes two stages - the first involves establishing the effectiveness of the system itself, and the second - the effectiveness of the system in the classroom in the presence of volunteers simulating presence of students. **Results:** The effectiveness of the UV system itself is >99%. The maximum reduction of the air contamination in the volume of the classroom is about 41% in condition of open windows and door during the break. **Conclusion:** For the development of air disinfection systems, it is essential not only to prove the effectiveness of the respective system, but also to test the effectiveness in real practical condition - in presence of people in a certain volume of the room.

**Key words:** microbial air contamination, classroom, UV disinfection

## ЕФЕКТИВНОСТ НА УРЕДИ ЗА ДЕЗИНФЕКЦИЯ НА ВЪЗДУХ С UVC ЛЪЧИ - ЛАБОРАТОРНИ ИЗПИТВАНИЯ 2020 - 2021 Г.

гл. ас. М. Николова, д.е.<sup>1</sup>, Св. Йорданова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национален център по заразни и паразитни болести, София  
[disinfection@ncipd.org](mailto:disinfection@ncipd.org); [disinfection@abv.bg](mailto:disinfection@abv.bg)

**Цел:** За периода 2020-2021 г. в лаб. “Дезинфекция и стерилизация” към НЦЗПБ са изпитани 27 броя устройства, предназначени за дезинфекция на въздух чрез ултравиолетово лъчение. Целта на проучването е да се сравни ефективността на устройствата по отношение на нормалната микрофлора на въздуха в помещения. **Материали/Методи:** Тестваните



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ  
ЕВРОПЕЙСКИ  
СОЦИАЛЕН ФОНД  
ЕВРОПЕЙСКИ ФОНД  
ЗА РЕГИОНАЛНО РАЗВИТИЕ



ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА  
НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ ЗА  
ИНТЕЛИГЕНТЕН РАСТЕЖ

устройства се различават по конструкция, брой и мощност на UVC-пурите, както и по броя, мощността и позицията на вентилаторите. Изпитванията са проведени в лабораторни и в практически условия в различни по площ помещения (12 m<sup>2</sup> – 220 m<sup>2</sup>) по активен или пасивен метод за определяне на микробната контаминация на въздуха преди включване на устройството и на определени интервали от неговата работата. **Резултати:** Ефективността на устройствата е посочена в процент снижение на нормалната микрофлора във въздуха след сравняване на получените стойности кое/петри преди и след работа на UVC-уредите. **Заключение:** Отчетена е различна ефективност на изпитаните UV- устройства дори и при уреди с еднакъв брой и мощност на бактерицидните пури. Резултати показват, че за ефективността на устройствата за дезинфекцията на въздух от значение е не само мощността и броят на UVC-пурите, но и мощността и броят на вентилаторите.

**Ключови думи:** UVC, дезинфекция, въздух

## EFFECTIVENESS OF DEVICES FOR UVC AIR DISINFECTION - LABORATORY TESTS 2020 - 2021

Nikolova M.<sup>1</sup>, S. Yordanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Centre of Infectious and Parasitic Diseases  
[disinfection@ncipd.org](mailto:disinfection@ncipd.org); [disinfection@abv.bg](mailto:disinfection@abv.bg)

**Objective:** For the period 2020-2021 in the lab. "Disinfection and sterilization" was tested 27 UV-devices for air disinfection. The aim of the study is to compare the effectiveness of the devices in regard to the indoor air microflora. **Methods:** The UVC-devices differ in construction, number and intensity of the germicidal tubes, as well as in the number, power and position of the fans. The tests were performed in laboratory and in practical conditions in different areas by active or passive method for evaluation of air contamination before and after operation of the UVC-devices. **Results:** The effectiveness of the devices is indicated as a percentage reduction of the air contamination by comparing the values cfu/petri dishes before and after operation of the devices. **Conclusion:** Different effectiveness of the tested UVC-devices was reported even with devices with the same number and intensity of germicidal tubes. Results show that for the effectiveness of air disinfection devices are important not only the intensity and number of UVC tubes, but also the power and number of fans.

**Key words:** UVC, disinfection, air

### За контакти:

Милена Николова

Лаб. „Дезинфекция и стерилизация”

НЦЗПБ

[disinfection@ncipd.org](mailto:disinfection@ncipd.org); [disinfection@abv.bg](mailto:disinfection@abv.bg)

0888888167