# СБОРНИК
# НАУЧНИ ТРУДОВЕ

## XIX НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО КЛИНИЧНА МИКРОБИОЛОГИЯ И ИНФЕКЦИИ НА БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ НА МИКРОБИОЛОЗИТЕ

**София, 14.09–16.09.2021 г.**
**Парк-хотел „Москва“**

# ГЕНЕРАЛЕН СПОНСОР

ELTA'90
More than Technology

# ЗЛАТЕН СПОНСОР

Pfizer

# СПОНСОРИ

**ФОТ ООД**
**МЕРК ШАРП И ДОУМ БЪЛГАРИЯ ЕООД**
**СИНМЕД БЪЛГАРИЯ ООД**
**АА МЕДИКЪЛ БЪЛГАРИЯ ООД**
**ИНТЕРБИЗНЕС 91 ЕООД**
**ИНФОМЕД ЕООД**
**РИДАКОМ ЕООД**
**ДАНСФАРМА**
**БИОМЕДИКА БЪЛГАРИЯ ЕООД**
**МЕДИКЛИМ ЕООД**
**ДИАМЕД ООД**
**АКВАХИМ 2020 ЕООД**
**БИОСИСТЕМИ ООД**
**БИОМЕД ФЮЧАР ЕООД**

# Съдържание

**НАЦИОНАЛНИ РЕФЕРЕНТНИ ЦЕНТРОВЕ ..... 11**

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР „РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ И ТУБЕРКУЛОЗА" - АНАЛИЗ НА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2020-2021 ..... 11

NATIONAL REFERENCE CENTER "RESPIRATORY INFECTIONS AND TUBERCULOSIS" – ANALYSIS OF ACTIVITY IN 2019-2020 ..... 12

НАЦИОНАЛЕНРЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, ПРЕДАВАНИ С ХРАНИ И ВОДИ (НРЦ-ИПХВ), АНАЛИЗ НА ЗАБОЛЯЕМОСТТА, 2020 Г. ..... 13

NATIONAL REFERENCE CENTER FOR FOOD- AND WATERBORNEDISEASES (NRCF WD), MORBIDITY ANALYSIS, 2020 ..... 14

ДОКЛАД НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО МИКРОБНА ЛЕКАРСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И АНТИБИОТИЧНА КОНСУМАЦИЯ ..... 15

REPORT FROM THE NATIONAL REFERENCE CENTER FOR MICROBIAL DRUG RESISTANCE AND ANTIBIOTIC USE ..... 16

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ЗООАНТРОПОНОЗИ С ЕПИДЕМИЧЕН РИСК, НОВИ ИНФЕКЦИИ И УПРАВЛЕНИЕ НА БИОРИСКА -2020 НРЦЗЕРНИ-УБ) ..... 17

NATIONAL REFERENT CENTER OF ZOONOSES WITH EPIDEMIC RISK, NEW INFECTIONS AND BIOHAZARD MANAGEMENT – 2020 (NRC ZERNI-BM) ..... 18

БАКТЕРИАЛНИ, ВИРУСНИ И ПАРАЗИТНИ ВЕКТОР-ПРЕНОСИМИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2020 Г. ..... 19

BACTERIAL, VIRAL AND PARASITIC VECTOR-BORNE INFECTIONS IN BULGARIA, 2020 ..... 20

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР„СЕКСУАЛНО-ПРЕДАВАНИ ИНФЕКЦИИ (СПИ) И ВИРУСНИ ХЕПАТИТИ" ..... 21

NATIONAL REFERENCE CENTER "SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS (STIS) AND VIRUS HEPATITIS" ..... 22

ДЕЙНОСТИ НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, СВЪРЗАНИ С МЕДИЦИНСКО ОБСЛУЖВАНЕ (НРЦ-ИСМО) ПРЕЗ 2020Г. ..... 23

ACTIVITIES OF NATIONAL REFERENCE CENTER OF HEALTHCARE - ASSOCIATED INFECTIONS (NRC-HAI) IN 2020 ..... 25

ДЕЙНОСТ НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМИ ИНФЕКЦИИ: ГОДИШЕН ДОКЛАД ЗА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2020 Г. И ЗА 1-ВО ПОЛУГОДИЕ НА 2021 Г. ..... 27

ACTIVITIES OF THE NATIONAL REFERENCE CENTER "VACCINE PREVENTABLE INFECTIONS": ANNUAL REPORT FOR 2020 AND SEMIANNUAL REPORT FOR 2021 ..... 29

**СЕСИЯ II ..... 30**

РАЗПРОСТРАНЕН ЛИ Е *MYCOBACTERIUM CHIMAERA* СРЕД ПАЦИЕНТИ С БЕЛОДРОБНА ПАТОЛОГИЯ В БЪЛГАРИЯ? ..... 30

IS *MYCOBACTERIUM CHIMAERA* WIDESPREAD AMONG PATIENTS WITH PULMONARY DISEASES IN BULGARIA? ..... 31

ЦИРКУЛАЦИЯ НА РЕСПИРАТОРНИ ВИРУСИ ПО ВРЕМЕ НА COVID-19 ПАНДЕМИЯТА ..... 32

CIRCULATION OF RESPIRATORY VIRUSES DURING THE COVID-19 PANDEMIC ..... 33

КОМБИНИРАНИ ИНФЕКЦИИ ОТ *B. PERTUSSIS* И РЕСПИРАТОРНИ ВИРУСИ ..... 34

*B. PERTUSSIS* CO-INFECTIONS WITH RESPIRATORY VIRUSES ..... 35

КИСТНА ЕХИНОКОКОЗА С НЕОБИЧАЙНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ: РЕТРОСПЕКТИВЕН АНАЛИЗ ЗА ДЕСЕТ ГОДИШЕН ПЕРИОД ..... 36

CYSTIC ECHINOCOCCOSIS WITH UNUSUAL LOCALIZATION: A RETROSPECTIVE ANALYSIS OVER A TEN-YEAR PERIOD. ..... 37

**СЕСИЯ III: COVID-19 ..... 38**

УПОТРЕБА НА АНТИБИОТИЦИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПОТВЪРДЕНА COVID-19 ИНФЕКЦИЯ. КОНСЕНСУС НА ЕКСПЕРТНИЯ СЪВЕТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ КЪМ БАМ ..... 38

USE OF ANTIBIOTICS IN PATIENTS WITH CONFIRMED COVID-19 INFECTION. CONSENSUS OF THE EXPERT COUNCIL ON MICROBIOLOGY AT BAM ..... 39

АНАЛИЗ НА ВЪВЕДЕНИТЕ И РАЗПРОСТРАНЕНИ SARS-COV-2 ВАРИАНТИ В БЪЛГАРИЯ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА ЦЕЛОГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНЕ ОТ НОВО ПОКОЛЕНИЕ ..... 40

ANALYSIS OF THE INTRODUCED AND DISSEMINATED SARS-COV-2 LINEAGES IN BULGARIA BY USING WHOLE GENOME NEXT GENERATION SEQUENCING ..... 41

SARS-COV-2-СПЕЦИФИЧЕН Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР ПРИ ВАКСИНИРАНИ ЛИЦА ..... 42

POST-VACCINAL SARS-COV-2-SPECIFIC T-CELL IMMUNE RESPONSE ..... 43

ХУМОРАЛЕН И Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНИТЕТ ШЕСТ МЕСЕЦА СЛЕД ПРЕБОЛЕДУВАНЕ ОТ COVID-19 И ВАКСИНАЦИЯ СРЕЩУ SARS-COV-2: ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ ..... 45

HUMORAL AND T-CELL MEDIATED IMMUNITY SIX MONTHS AFTER RECOVERY FROM COVID-19 AND VACCINATION AGAINST SARS-COV-2: A PILOT STUDY ..... 46

ПОЯВА НА COVID-19 СИМПТОМИ ПРИ 1044 ПАЦИЕНТИ С ПОЛОЖИТЕЛЕН РЕЗУЛТАТ ЗА ТРИ ГЕНА НА SARS-COV-2 ..... 47

OCCURRENCE OF COVID-19 SYMPTOMS IN 1044 PATIENTS WHO WERE POSITIVE FOR THREE SARS-COV-2 GENES ..... 48

КОРЕЛАЦИЯ МЕЖДУ ЕКСПРЕСИЯТА НА SARS-COV-2 ГЕНИТЕ И ПЕРИОДА СЛЕД ПОЯВАТА НА COVID-19 СИМПТОМИ ПРИ 1044 ПАЦИЕНТИ ..... 49

CORRELATION BETWEEN LEVELS OF GENE EXPRESSION OF SARS-COV-2 AND DAYS AFTER COVID-19 SYMPTOMS ONSET IN 1044 PATIENTS ..... 50

ВЪТРЕБОЛНИЧЕН ВЗРИВ ОТ SARS-COV-2 В ОТДЕЛЕНИЕ ЗА КАРДИОЛОГИЧНО ИНТЕНЗИВНО ЛЕЧЕНИЕ (ОКИЛ) КЪМ ВТОРА МБАЛ СОФИЯ, ЕАД ..... 51

NOSOCOMIAL OUTBREAK OF SARS-COV-2 IN CARDIOLOGICAL INTENSIVE CARE UNIT (CICU) OF SECOND MULTIPROFILE HOSPITAL FOR ACTIVE TREATMENT, SOFIA ..... 52

ВЛИЯНИЕ НА ВЪВЕДЕНИТЕ НЕФАРМАЦЕВТИЧНИ МЕРКИ ЗА ОГРАНИЧАВАНЕ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА COVID-19 ВЪРХУ ОБЩАТА ИНФЕКЦИОЗНА ЗАБОЛЯЕМОСТ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2020 Г. ..... 53

INFLUENCE OF THE INTRODUCED NON-PHARMACEUTICAL MEASURES FOR LIMITING THE SPREAD OF COVID-19 ON THE INCIDENCE OF INFECTIOUS DISEASES IN BULGARIA IN 2020 ..... 54

ДЕМОГРАФСКИ ПОСЛЕДСТВИЯ ОТ КОВИД КРИЗАТА В БЪЛГАРИЯ ..... 55

DEMOGRAPHIC CONSEQUENCES OF COVID CRISIS IN BULGARIA ..... 56

**СЕСИЯ IV ..... 57**

АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА ИЗОЛАТИ ОТ ПАЦИЕНТИ ОТ УМБАЛ:“ПРОФ. Д-Р СТ.КИРКОВИЧ“ АД С ДОКАЗАНА COVID-19 ИНФЕКЦИЯ ЗА ПЕРИОД ОТ 1.03.2020 ДО 1.08.2021 Г. ..... 57

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ISOLATES FROM PATIENTS FROM UMHAT: “PROF. DR. ST. KIRKOVICH AD WITH PROVEN COVID-19 INFECTION FOR THE PERIOD FROM 1.03.2020 TO 1.08.2021. ..... 58

АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ *MYCOPLASMA GENITALIUM* В ЕВРОПА И БЪЛГАРИЯ ..... 59

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *MYCOPLASMA GENITALIUM* IN EUROPE AND BULGARIA ..... 60

РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА РАЗЛИЧНИТЕ СЕРОТИПОВЕ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIA* В БЪЛГАРИЯ, КОЛОНИЗИРАЩИ НАЗОФАРИНКСА ПРИ ДЕЦА ..... 61

DISTRIBUTION OF DIFFERENT SEROTYPES STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IN BULGARIA, COLONIZING THE NASOPHARYNX OF CHILDREN ..... 62

НАЦИОНАЛНО СЕРОЕПИДЕМИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА НАЛИЧИЕ НА КОЛЕКТИВЕН ИМУНИТЕТ СРЕЩУ МОРБИЛИ И РУБЕОЛА, 2021 - ПЪРВОНАЧАЛНО ПРОУЧВАНЕ ..... 63

NATIONAL SEROEPIDEMIC STUDY FOR THE PRESENCE OF COLLECTIVE IMMUNITY AGAINST MEASLES AND RUBELA, 2021 - PRELIMINARY STUDY ..... 64

**СЕСИЯ V ..... 65**

ТЕЛЦАТА НА ХАЙНЦ ИМАТ ПРЕДПОЛАГАЕМ МИКРОБЕН ПРОИЗХОД ..... 65

HEINZ BODIES ARE OF SUPPOSED MICROBIAL ORIGIN ..... 66

ТЕНДЕНЦИИ В ЕТИОЛОГИЧНАТА СТРУКТУРА И АНТИБИОТИЧНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ ИЗОЛАТИ ОТ ХЕМОКУЛТУРИ В ПЛОВДИВ, БЪЛГАРИЯ (2015-2020Г.) ..... 67

TRENDS IN THE ETIOLOGICAL STRUCTURE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ISOLATES FROM BLOOD CULTURES IN PLOVDIV, BULGARIA (2015-2020) ..... 68

ПАРАЗИТНИТЕ БОЛЕСТИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2020 Г ..... 69

PARASITIC SISEASES IN BULGARIA IN 2020 ..... 70

РЕПЕЛЕНТНИ СВОЙСТВА НА ПРОДУКТИ СЪДЪРЖАЩИ ЕТЕРИЧНИ МАСЛА ..... 71

REPELLENT PROPERTIES OF PRODUCTS CONTAINING ESSENTIAL OILS ..... 72

РЕТРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА КОЛИЕНТЕРИТИ В БЪЛГАРИЯ ЗА ПЕРИОД ОТ ДЕСЕТ ГОДИНИ (2011-2020) ..... 73

A RETROSPECTIVE STUDY ON THE DISTRIBUTION OF E. COLI ENTERITIS IN BULGARIA FOR A PERIOD OF TEN YEARS (2011-2020) ..... 74

АНАЛИЗ И ОЦЕНКА НА ЛАБОРАТОРИИ УЧАСТВАЛИ В МЕЖДУЛАБОРАТОРНИ СРАВНИТЕЛНИ ИЗПИТВАНИЯ – МАЙ 2021Г ..... 75

ANALYSIS AND EVALUATION OF LABORATORIES INVOLVED IN INTERLABOR LABORATORY COMPARATIVE TESTS – MAY 2021 ..... 76

**ПОСТЕРНА СЕСИЯ I ..... 77**

1. ИМУНОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ НА SARS-COV-2 ПРИ HIV+ ЛИЦА НА ПРОДЪЛЖИТЕЛНА АНТИРЕТРОВИРУСНА ТЕРАПИЯ (CART) ..... 77

1. IMMUNOLOGICAL RESPONSES TO SARS-COV-2 IN PEOPLE LIVING WITH HIV ON CONTINUOUS ANTIRETROVIRAL THERAPY (CART) ..... 78

2.ОЦЕНКА НА ОТРИЦАТЕЛНОТО ВЛИЯНИЕ НА COVID-19 ВЪРХУ ДИАГНОСТИКАТА НА ТУБЕРКУЛОЗАТА В БЪЛГАРИЯ ..... 79

2.ASSESSMENT OF THE NEGATIVE IMPACT OF COVID-19 ON THE TB DIAGNOSIS IN BULGARIA ..... 80

3.ПРОУЧВАНЕ НА АНТИ-КОРОНАВИРУСНА АКТИВНОСТ НА ХАЛКОНИ С РАЗНООБРАЗНО ЗАМЕСТЕНИ АРОМАТНИ ПРЪСТЕНИ И КИНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ЕФЕКТА ИМ ВЪРХУ РАННИТЕ ЕТАПИ НА ВИРУСНА РЕПЛИКАЦИЯ ..... 81

3.RESEARCH IN ANTI-CORONAVIRUS ACTIVITY OF NEW SYNTHESIZED CHALCONES WITH VARIOUSLY SUBSTITUTED AROMATIC RINGS AND KINETIC ANALYSIS OF THEIR EFFECT ON THE EARLY STAGES OF VIRAL REPLICATION ..... 82

4.СПЕЦИФИЧЕН Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР СЛЕД SARS-COV-2 ИНФЕКЦИЯ ..... 83

4.SPECIFIC T-CELL IMMUNE RESPONSE AFTER SARS-COV-2 INFECTION ..... 84

5. ВАКСИНАЦИЯТА СРЕЩУ COVID-19 - КЛЮЧ ЗА ОВЛАДЯВАНЕ НА ПАНДЕМИЯТА, УСПЕШНИ СТРАТЕГИИ, ПРОБЛЕМИ И ВЪЗМОЖНИ РЕШЕНИЯ ..... 85

5. COVID-19 VACCINATION - THE KEY TO PANDEMIC CONTROL, SUCCESSFUL STRATEGIES, PROBLEMS AND POSSIBLE SOLUTIONS ..... 86

6. ПЪРВОНАЧАЛНИ ДАННИ ЗА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ПНЕВМОЦИСТОЗАТА СРЕД БЪЛГАРСКОТО НАСЕЛЕНИЕ ..... 87

6. PRELIMINARY DATA ON THE PREVALENCE OF *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* AMONG BULGARIAN POPULATION ..... 88

7. СРАВНИТЕЛНО ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТИВНОСТТА НА ОЦВЕТИТЕЛНИТЕ МИКРОСКОПСКИ МЕТОДИ ЗА ДИГНОСТИКА НА ПНЕВМОЦИСТОЗАТА ..... 89

7. COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF MICROSCOPIC METHODS IN THE DIAGNOSTIC APPROACHES IN PNEUMOCYSTOSIS ..... 90

8. СРАВНЕНИЕ НА ДИАГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА ДВА ТАРГЕТНИ ГЕНА ЗА ОТКРИВАНЕ НА PNEUMOCYSTIS JIROVECII В КЛИНИЧНИ ПРОБИ ЧРЕЗ REAL-TIME PCR ..... 91

8. COMPARISON OF THE DIAGNOSTIC VALUE OF TWO TARGET GENES FOR DETECTION OF *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* IN CLINICAL SAMPLES BY REAL-TIME PCR ..... 92

9. МОЛЕКУЛЯРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА МЕХАНИЗМИТЕ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ КОЛИСТИН ПРИ КАРБАПЕНЕМАЗА ПРОДУЦИРАЩИ KLEBSIELLA PNEUMONIAE ИЗОЛИРАНИ В БЪЛГАРИЯ ..... 93

9. MOLECULAR INSIGHT INTO COLISTIN RESISTANCE MECHANISMS ASSOCIATED WITH CARBAPENEMASE- PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATED IN BULGARIA..... 94

10. ОТКРИВАНЕ НА ГЕНИ ЗА АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И ВИРУЛЕНТНИ ФАКТОРИ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ ВАНКОМИЦИН- РЕЗИСТЕНТНИ ЕНТЕРОКОКИ..... 95

10. DETECTION OF GENES FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS IN INTESTINAL VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI ..... 96

11. IN VITRO ПРОУЧВАНЕ НА СИНЕРГИЗМА И АНТАГОНИЗМА НА РАЗЛИЧНИ АНТИБИОТИЧНИ КОМБИНАЦИИ СРЕЩУ ЕКСТЕНЗИВНО РЕЗИСТЕНТНИ *K. PNEUMONIAE* ОТ ИНТЕНЗИВНИ ОТДЕЛЕНИЯ..... 97

11. IN VITRO INVESTIGATION OF SYNERGY AND ANTAGONISM OF DIFFERENT ANTIBIOTIC COMBINATIONS AGAINST EXTENSIVE DRUG RESISTANT *K. PNEUMONIAE* FROM INTENSIVE CARE UNITS..... 99

12. МУТАЦИИ, ПРЕДИЗВИКВАЩИ ЛЕКАРСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ ПАЦИЕНТИ ИНФЕКТИРАНИ С HIV-1 CRF01_AE В БЪЛГАРИЯ..... 101

12. DRUG RESISTANCE MUTATIONS IN HIV-1 CRF01_AE IN BULGARIA ..... 103

13. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА РЕЗИСТЕНТНИ ЩАМОВЕ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ESBL И NDM-1, ИЗОЛИРАНИ ОТ ХЕМОКУЛТУРИ НА ПАЦИЕНТИ, ЗА ПЕРИОД ОТ 5 ГОДИНИ В УМБАЛСМ „Н.И. ПИРОГОВ”..... 104

13. OCCURRENCE OF HIGHLY RESISTANT ESBL AND NDM-1 PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM BLOOD CULTURES OF PATIENTS, FOR A 5 YEAR PERIOD IN UMHATEM “N.I PIROGOV” ..... 105

14. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА МНОЖЕСТВЕНО-РЕЗИСТЕНТНИ ИЗОЛАТИ *ACINETOBACTER BAUMANNII* В УНИВЕРСИТЕТСКА БОЛНИЦА ..... 106

14. REVALENCE OF MULTIDRUG-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII IN A UNIVERSITY HOSPITAL ..... 107

15. АНАЛИЗ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ТОКСОКАРОЗАТА СРЕД СУСПЕКТНИ ПАЦИЕНТИ, ИЗСЛЕДВАНИ В НЦЗПБ ЗА ТРИГОДИШЕН ПЕРИОД (2018-2020 Г.)..... 108

15. ANALYSIS OF THE PREVALENCE OF TOXOCARIASIS AMONG SUSPECTED PATIENTS STUDIED AT NCIPD FOR A THREE-YEAR PERIOD (2018-2020)..... 109

**ПОСТЕРНА СЕСИЯ II ..... 110**

16.СЕРОЛОГИЧНО И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА *COXIELLA BURNETII* В ЛАБОРАТОРНИ ПРОБИ НА ВЕТЕРИНАРНИ ЛЕКАРИ, РАБОТЕЩИ НА СВОБОДНА ПРАКТИКА И В ДЪРЖАВНАТА ВЕТЕРИНАРНА СИСТЕМА ..... 110

16.SEROLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGY STUDY OF *COXIELLA BURNETII* IN LABORATORY SAMPLES OF FREELANCE VETERINARIANS AND WORKING IN THE NATIONAL VETERINARY SYSTEM ..... 112

17. ЗНАЧЕНИЕ НА АВИДИТЕТА НА IGG АНТИТЕЛАТА ПРИ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СТАДИЯ НА ТОКСОПЛАЗМЕНАТА ИНФЕКЦИЯ ПРИ БРЕМЕННИ ЗА ПЕРИОДА 2016 – 2020 ГОДИНА..... 113

17. SIGNIFICANCE OF IGG AVIDITY ANTIBODIES IN DETERMINING THE STAGE OF TOXOPLASMOSIS INFECTION IN PREGNANT WOMEN FOR THE PERIOD 2016 – 2020 ..... 114

18. ПАРАЗИТНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ В ДИФЕРЕНЦИАЛНАТА ДИАГНОЗА НА ПЕРИОДИЧНА ТРЕСКА И НЕЯСНО ФЕБРИЛНО СЪСТОЯНИЕ ..... 115

18. PARASITIC DISEASES IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RECURRENT FEVER AND FEVER OF UNKNOWN ORIGIN ..... 116

19. ГОНОКОКОВ КОНЮНКТИВИТ ПРИ ВЪЗРАСТНИ: ПРЕДСТАВЯНЕ НА КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ ... 117

19. GONOCOCCAL CONJUNCTIVITIS IN ADULTS: A CASE REPORT ..... 118

21.VERTICAL TRANSMISSION OF HIV-1 FROM MOTHER TO CHILD IN BULGARIA (PRELIMINARY ANALYSIS) ..... 122

22. VAGINELLA MASSILIENSIS ПОГРЕШНО ИДЕНТИФИЦИРАН КАТО WEEKSELLA VIROSA: БЕЗВРЕДЕН КОМПОНЕНТ НА ВАГИНАЛНАТА МИКРОБИОТА ИЛИ НЕПОЗНАТ ПАТОГЕН ? ..... 123

*22. VAGINELLA MASSILIENSIS* MISIDENTIFIED AS *WEEKSELLA VIROSA*: A HARMLESS MEMBER OF THE VAGINAL MICROBIOTA OR A NEGLECTED PATHOGEN? ..... 124

23. БЪРЗ МОЛЕКУЛНО-БИОЛОГИЧЕН СКРИНИНГ ЗА ВАГИНАЛНА КАНДИДОЗА ПРИ СИМПТОМАТИЧНИ ЖЕНИ ..... 125

23. RAPID MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL SCREENING OF VAGINAL CANDIDIASIS IN SYMPTOMATIC WOMEN ..... 126

24. ЕПИДЕМИЧЕН ПАРОТИТ - ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМА ИНФЕКЦИЯ С НЕЗАТИХВАЩО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ В БЪЛГАРИЯ ..... 127

24. MUMPS - A VACCINE-PREVENTIVE INFECTION WITH CONTINUING DISTRIBUTION IN BULGARIA ..... 128

25. ЛАБОРАТОРНО ПРОУЧВАНЕ НА ВЪЗМОЖНИ СЛУЧАИ НА ВРОДЕН РУБЕОЛЕН СИНДРОМ (ВРС) В БЪЛГАРИЯ (2013-2020) ..... 129

25. LABORATORY STUDY OF POSSIBLE CASES OF CONGENITAL RUBELLA SYNDROME (CRS) IN BULGARIA (2013-2020) ..... 130

**ПОСТЕРНА СЕСИЯ III ..... 131**

26. ХЕПАТИТ Е ВИРУСНА КО-ИНФЕКЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ ИНФЕКТИРАНИ С ДРУГИ ХЕПАТИТНИ ВИРУСИ ..... 131

26. HEPATITIS E VIRAL COINFECTION IN PATIENTS INFECTED WITH OTHER HEPATITIS VIRUSES .. 132

27.МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ YERSINIA ENTEROCOLITICA В БЪЛГАРИЯ ..... 133

27. MICROBIOLOGICAL AND GENETIC STUDIES OF YERSINIA ENTEROCOLITICA CLINICAL ISOLATES IN BULGARIA ..... 134

28. НАЛИЧИЕ НА ANTI – HBSAG СРЕД HIV ИНФЕКТИРАНИ ПАЦИЕНТИ В БЪЛГАРИЯ – НАЧАЛНО ПРОУЧВАНЕ ЗА ПЕРИОДА 2018 – 2021 ГОДИНА ..... 135

28. PRESENCE OF ANTI-HBSAG AMONG HIV-INFECTED PATIENTS IN BULGARIA - INITIAL STUDY FOR THE PERIOD 2018 - 2021 ..... 136

*29. BORRELIA BURGDORFERI* S.L. В ГЛАДНИ КЪРЛЕЖИ ОТ РАЗЛИЧНИ ОБЛАСТИ НА БЪЛГАРИЯ 137

29. BORRELIA BURGDORFERI S.L. IN QUESTING TICKS IN VARIOUS DISTRICTS OF BULGARIA ..... 138

30. СЕРОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ПРИ ПТИЦИ ЗА НАЛИЧИЕ НА IGG (IGY) АНТИТЕЛА СРЕЩУ ПРИЧИНИТЕЛИТЕ НА ЛАЙМСКА БОЛЕСТ И ЗАПАДНО-НИЛСКА ТРЕСКА ..... 139

30. SEROPREVALENCE IN BIRDS OF SPECIFIC IGY (IGG) ANTIBODIES AGAINST CAUSATIVE AGENTS OF LYME DISEASE AND WEST NILE FEVER ..... 141

31. ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ КРЪВ И КЪРЛЕЖИ СЪБРАНИ ОТ ПТИЦИ ..... 142

31. LABORATORY STUDIES ON BLOOD AND TICKS FROM BIRDS ..... 143

32. ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ЗАРАЗЕНОСТТА НА КЪРЛЕЖИТЕ, СВАЛЕНИ ОТ ПАЦИЕНТИ С *BORRELIA BURGDORFERI* И БРОЯ ИМ В ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА И ВАЛЕЖИТЕ ПРЕЗ 2016-2021 ГОДИНИ ..... 144

32. STUDY ON TICKS REMOVED FROM PATIENTS FOR INFECTIONS WITH BORRELIA BURGDORFERI AND THEIR NUMBER DEPENDING ON TEMPERATURE AND PRECIPITATION IN 2016-2021 ..... 145

33.ХАНТАВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ – АНАЛИЗ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО ИМ ЗА ПЕРИОД ОТ 10 ГОДИНИ, 2011-2020 Г. ..... 146

33. HANTAVIRUS INFECTIONS IN BULGARIA - ANALYSIS OF THEIR SPREAD FOR A PERIOD OF 10 YEARS, 2011-2020 ..... 147

34. ДОКАЗВАНЕ НА СЛАЙМ ПРОДУКЦИЯ ЧРЕЗ ФЕНОТИПНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ В КРЪВНИ ИЗОЛАТИ *STAPHYLOCOCCUS* SPP., ПОЛУЧЕНИ ОТ ПАЦИЕНТИ СЛЕД ХЕМАТОПОЕТИЧНА СТВОЛОВО-КЛЕТЪЧНА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ..... 148

34.PHENOTYPIC AND MOLECULAR DETECTION OF BIOFILM PRODUCTION BY *STAPHYLOCOCCUS* SPP. OBTAINED FROM BLOOD SAMPLES OF PATIENTS UNDERGOING HEMATOPOIETIC STEM-CELL TRANSPLANTATION ..... 149

35. СЛУЧАЙ НА ДЕМОДЕКОЗА ПРИ ПАЦИЕНТКА С ХРОНИЧЕН БЛЕФАРИТ ..... 150

35. CASE OF DEMODECOSIS IN A PATIENT WITH CHRONIC BLEPHARITIS ..... 151

36. НАНОСРЕБРО ЗА ДЕЗИНФЕКЦИЯ НА ПОВЪРХНОСТИ – НЕПОСРЕДСТВЕН ЕФЕКТ И ОСТАТЪЧНА ЕФЕКТИВНОСТ ..... 152

36. NANOSILVER FOR SURFACE DISINFECTION - IMMEDIATE AND RESIDUAL ACTIVITY ..... 153

37. РАЗРАБОТВАНЕ И *IN-SILICO* ВАЛИДИРАНЕ НА PCR-БАЗИРАНА СХЕМА ЗА ПЛАЗМИДНО РЕПЛИКОНОВО ТИПИЗИРАНЕ ПРИ *PSEUDOMONAS SPP*. ..... 154

37. DEVELOPMENT AND IN-SILICO VALIDATION OF PCR-BASED PLASMID REPLICON TYPING SCHEME FOR PSEUDOMONAS SPP. ..... 155

38. ИЗСЛЕДВАНЕ НА НИВАТА НА ДЕКОНТАМИНАЦИЯ ПРИ ЗЪБОТЕХНИЧЕСКИ ОТПЕЧАТЪЦИ – ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ ..... 156

38. STUDY OF THE LEVELS OF DECONTAMINATION IN DENTAL IMPRESSIONS - A PILOT STUDY... 157

39. ПРИЛОЖЕНИЕ НА NESTED-PCR ЗА ДОКАЗВАНЕТО НА ДЕРМАТОФИТИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОНИХОМИКОЗА ..... 158

39. THE USE OF NESTED-PCR FOR THE DETECTION OF DERMATOPHYTES IN PATIENTS WITH ONYCHOMYCOSIS ..... 159

40. ОТРИЦАТЕЛНИ РЕЗУЛТАТИ ПРИ АНАЛИЗ НА ТЪКАННИ ПРОБИ ВКЛЮЧЕНИ В ПАРАФИН ЗА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* И *CUTIBACTERIUM ACNES* ..... 160

40. NEGATIVE RESULTS FROM ANALYSIS OF TISSUE SAMPLES INCLUDED IN PARAFFIN FOR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND *CUTIBACTERIUM ACNES* ..... 161

41. ФИЗИОЛОГИЧНО ОСНОВАН ФАРМАКОКИНЕТИЧЕН ЦИФРОВ МОДЕЛ ЗА ОЦЕНКА НА МИНИМАЛНАТА ЕФЕКТИВНА ДОЗА НА ПРИЛОЖЕНИЕ НА ТРИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛОЗНИ МЕДИКАМЕНТА ОТ ПЪРВА ЛИНИЯ - ИЗОНИАЗИД, РИФАМПИЦИН, ПИРАЗИНАМИД ..... 162

41. PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC *IN SILICO* MODEL FOR EVALUATION OF THE DOSE ADMINISTRATION OF THREE FIRST LINE ANTI-TUBERCULOSIS AGENTS - ISONIAZID, RIFAMPICIN, PYRAZINAMIDE ..... 163

42.СЪВРЕМЕННА ЛАБОРАТОРНА ДИАГНОСТИКА НА ХЕРПЕС СИМПЛЕКС ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С РАЗЛИЧНИ НЕВРОЛОГИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ ..... 164

42.CONTEMPORARY LABORATORY DIAGNOSIS OF HERPES SIMPLEX VIRAL INFECTIONS IN PATIENTS WITH VARIOUS NEUROLOGICAL COMPLICATIONS ..... 165

# НАЦИОНАЛНИ РЕФЕРЕНТНИ ЦЕНТРОВЕ

## НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР „РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ И ТУБЕРКУЛОЗА" - АНАЛИЗ НА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2020-2021

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

Представени са резултатите от епидемиологичния и лабораторен надзор на инфекциите на респираторния тракт с вирусна и бактериална етиология в България. **Материали и методи:** Епидемиологичният анализ на заболяемостта от грип/ОРЗ бе извършен въз основа на данните от интернет-базираната Информационна система. През сезон 2020/2021 г. за грипни вируси тип А и В бяха тествани 2426 назофарингеални секрета на пациенти с грипоподобни заболявания/ОРЗ. Респираторни проби на 361 деца на възраст ≤16 год. и 307 възрастни ≥65 год. бяха изследвани спрямо 8 други респираторни вируса. През 2020 г. за SARS-CoV-2 бяха изследвани чрез Real-Time RT- PCR 77001 клинични проби. Извършени бяха микроскопски и културелни изследвания за туберкулоза на 125 клинични проби и потвърдителни изследвания на 111 щама, изпратени от цялата страна, както и изследвания за лекарствена чувствителност. Осъществена бе видова идентификация на нетуберкулозните микобактерии (NTM). Чрез PCR бяха извършени диагностични изследвания на 111 клинични проби за коклюш, 75 проби за паракоклюш, Chlamydophyla *(C.psittaci, C.pneumoniae),* Mycoplasma *(M.pneumoniae), L.pneumophyla, H. influenzae, Corynebacterium diphtheriae* и 52 проби за носителство на *S. pneumoniae*. **Резултати:** През сезон 2020/2021 г. не бяха идентифицирани грипни вируси. SARS-CoV-2 бе доказан в 21% от изследваните клинични проби. Сред останалите негрипните респираторни вируси най-често бяха идентифицирани риновируси и РСВ. 54 щама бяха потвърдени като *M.tuberculosis* complex, а 73 щама бяха идентифицирани като NTM. Общо 23 туберкулозни щама бяха определени като MDR, от които 1 щам – като XDR. Положителни резултати за коклюш и паракоклюш бяха получени при 22 (19.8%) и 1 (1.3%) от изследваните пациенти, съответно. Носителство на *S.pneumoniae* бе доказано при 14 (26,9%) изследвани деца на възраст 1-5 год. Диагностицирани бяха 7 случая на Легионерска болест сред български граждани. **Заключение:** НРЦ „Респираторни инфекции и туберкулоза" интегрираше усилията на различни специалисти с цел по-пълното и комплекно проучване на респираторните инфекции и туберкулозата в България.

## NATIONAL REFERENCE CENTER "RESPIRATORY INFECTIONS AND TUBERCULOSIS" – ANALYSIS OF ACTIVITY IN 2019-2020

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

Results of epidemiological and laboratory surveillance of respiratory tract infections with viral and bacterial etiology in Bulgaria are presented.

**Materials and methods:** Epidemiological analysis of the influenza/ARI incidence was done on the basis of data from internet-based information systems. During the 2020/2021 season, a total of 2426 nasopharyngeal swabs of patients with influenza-like illness/ARI were tested for influenza type A/B viruses. Respiratory specimens of 361 children aged ≤16 years and 307 patients ≥65 years were examined for 8 other respiratory viruses. In 2020, 77001 clinical specimens were tested for SARS-CoV-2 using a Real Time RT-PCR. Microscopic and culture examination for tuberculosis of 125 clinical specimens and confirmation tests of 111 strains were performed, as well as testing for drug susceptibility. Species identification of non- tuberculous mycobacteria (NTM) strains was done. PCR testing for pertussis (111 clinical specimens), parapertussis, Chlamydophyla (*C.psittaci*, *C.pneumoniae*), Mycoplasma (*M.pneumoniae*), *L.pneumophyla, H. influenzae, Corynebacterium diphtheriae* (75 clinical specimens) and *S. pneumoniae* (52 specimens) was performed.

**Results:** During the 2020/2021 season, no influenza viruses were identified. SARS-CoV-2 was detected in 21% of the clinical samples studied. Among the remaining non-influenza viruses, rhinoviruses and RSV were most frequently identified. 54 strains were confirmed as a *tuberculosis* complex, 73 strains - as NTM. A total of 23 TB strains were characterized as MDR-TB (1 is a XDR). Positive results for pertussis and parapertussis were obtained in 22 (19.8%) and 1 (1,3%) of the studied patients, respectively. 14 (26,9%) children aged 1-5 years were identified as carriers of *S. pneumoniae*. Seven cases of Legionnaires' disease were diagnosed.

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

## НАЦИОНАЛЕНРЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, ПРЕДАВАНИ С ХРАНИ И ВОДИ (НРЦ-ИПХВ), АНАЛИЗ НА ЗАБОЛЯЕМОСТТА, 2020 Г.

Л. Николаева-Гломб, И. Райнова, Г. Каменов, Н. Цветкова, М. Павлова, А. Стоянова, И. Георгиева, Т. Тенев, Н. Владимирова, А. Минкова, Е. Тасева, Н. Бранкова

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

**ЦЕЛ:** Анализ на заболяемостта от инфекции с хранителен и воден произход в България за 2020 г.
**МАТЕРИАЛИ/МЕТОДИ:** Използван е годишният анализ на отдел "Епидемиология" и данните на отделите "Микробиология", Вирусология" и "Паразитология" на НЦЗПБ. Анализът е по нозологични единици съгласно изискванията на Наредба № 21/18.07.2005 г. на МЗ.
**РЕЗУЛТАТИ:** През 2020 г. чревните инфекции заемат 28,5% от регистрираните случаи на остри заразни болести по хората в страната. Водеща остава групата на острите ентероколити и гастроентерити (80,48% от всички инфекциозни чревни заболявания). Регистрирани са 18 смъртни случая, колкото са и през 2019 г. (25,3% от всички починали от заразни болести). Общият леталитет за чревните инфекции е 0,35%. Заболяемостта е както следва: ботулизъм – няма регистрирани заболели, гастроентерит/ентероколит – 73,61%000 (187,44%000 през 2019 г.), шигелоза – 0,68%000
(3,14%000 през 2019 г.), йерсиниоза – 0,07%000 (0,16%000 през 2019 г.),
кампилобактериоза – 1,83%000 (3,30%000 през 2019 г.), колиентерити (ешерихиози) – 4,29%000 (5,12%000 през 2019 г.), салмонелоза – 4,65%000 (8,51%000 през 2019 г). През 2020 г. отново няма регистрирани заболели от инфекции, предизвикани от *E. Coli,* продуциращи *Shiga/Vero* токсини. Няма регистрирани и заболели от коремен тиф (1 през 2018 г.). Заболяемостта от ротавирусна инфекция е с тенденция за намаление (6,34%000 в сравнение с 19,41%000 през 2019 г.). Заболяемостта от вирусен хепатит А също е с тенденция за намаление – 18,70 %000 (21,69 %000 през 2019 г.). Регистрирани са
88 случая на вирусен хепатит Е (заболяемост 1,27 %000 за 2020 г.; за 2019 г. – 3,10 %000).
Екстензинвазията на гиардиазата е 0,22% (0,26% през 2019 г.) от общо 303 575 изследвани лица. Обхванатите деца от организирани детски колективи и начална училищна възраст са общо 42 703, от които 356 са диагностицирани с гиардиаза. През отчетната година са съобщени двама положителни за критпоспоридиоза лица.
**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Анализът на данните показва, че през 2020 г. общият брой заболели и заболяемостта от чревни инфекции намалява в сравнение с 2019 г. съответно 6358 случая, заболяемост 91,46%000 през 2020 г. и 15923 случая и заболяемост 227,4%000
през 2019 г.

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

## NATIONAL REFERENCE CENTER FOR FOOD- AND WATERBORNEDISEASES (NRCF WD), MORBIDITY ANALYSIS, 2020

L. Nikolaeva-Glomb, I. Rainova, G. Kamenov, N. Tsvetkova, M. Pavlova, A. Stoianova, I. Georgieva, T. Tenev, N. Vladimirova, A. Minkova, E. *Taseva, N. Brankova*

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

**OBJECTIVE.** To analyze the incidence rate of food- and waterborne infections in 2020.
**MATERIALS AND METHODS.** The annual report of the Epidemiology Department and the data obtained from the Microbiology, Virology and Parasitology Deapratments of NCIPD and from The National Center for Food Safety at the NDSRVMI were used to perform the analysis. The analysis includes the infections according to Ordinance № 21/18.07.2005 of the Ministry of Health.
**RESULTS.** In 2020, enteric infections comprised 28,5% of the totally registered acute infectious diseases among humans in Bulgaria. Acute enterocolitides and gastroenteritides remain the leading enteral infections (80.48%). In 2020, a total of 18 deaths were registered, the same as 2019 (25.3% of all deaths of infectious diseases or 0.35% case fatality rate). Incidence rate of enteric infections is as follows: no botulism, gastroenteritis/enterocolitis 73.61%000 (187.44%000 in 2019), shigellosis 0.68%000 (3.14%000 in 2019), yersiniosis 0.07%000 (0.16%000 in 2019), campylobacteriosis 1.83%000 (3.30%000 in 2019), colienteritis (escherichiosis) 4.29%000 (5.12%000 in 2019), salmonellosis 4.65%000 (8.51%000 in 2019). Infections caused by Shiga/Vero toxin producing *E. coli* were not registered in 2020. One case of typhoid fever is registered in Varna in 2018. Incidence rate of rotaviral gastroenteritis shows a decreasing trend – 6.34%000 (19.41%000 in 2019). Incidence rate of hepatitis A also reveals a decreasing trend – 18,70 %000 (21,69 %000 in 2019). There were 88 HEV cases (1,27 %000 in 2020 and 3,10 %000 in 2019 г.). Extense invasion of giardiasis was 0.22% (0.26% in 2019) among all 303 575 persons investigated for enteric parasites. The number of investigated children from kindergartens was 42 703 and 356 among them were positive. Two cryptosporidiosis cases were registered. **CONCLUSION.** The incidence rate of enteral infections in 2020 decreases as compared to 2019 – 6358 cases and morbidity 91.46%000; and 15 923 cases and morbity 227.4%000, rexpectively.

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

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

И.Н. Иванов[1],, С. Събчева[2] , К. Иванова[1] , Д. Дончев[1], Н. Корсун[1], И. Алексиев[1], Е. Добрева[1], Р. Христова[1] , С. Лозенов[1], И. Стойков[1,2], И. Филипова[1] , С. Ангелова[1], Т. Тенев[1], Р. Харизанов[1], И. Кафтанджиев[1], Н. Владимирова[1], Х. Даскалов[3], Т. Кантарджиев[1]
Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, гр. София

Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология, гр. София
Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт, гр. София

Националният референтен център по микробна лекарствена резистентност и антибиотична консумация интегрира задълбочени проучвания на специалисти в областта на лекарствената резистентност при бактериални, гъбични, вирусни и паразитни причинители на инфекции в обществото, болничните заведения и проблемни изолати в селското стопанство и храните. От националната система за надзор на етиологичната структура на инфекциите, бактериалната резистентност и антибиотичната консумация в България - BulSTAR ще се представят последните тенденции обобщени за 2020 година и оформени след анализ на годишните отчети на над 150 микробиологични лаборатории в страната. Събраните данни засягат и въпроси свързани с наблюдаваните необичайни фенотипове при конкретни двойки микроорганизъм/антибиотик и правилното им интерпретиране. Анализират се възможностите за тяхното отстраняване в рутинната практика.
В тази връзка и с цел синхронизиране на работата на микробиологичните лаборатории с европейските изисквания, ще се отдели време да се разяснят повтарящите се грешки в интерпретацията (вкл. при вродена резистентност), както и неприложимостта на даден антибиотик за лечение на конкретен причинител. Ще се обсъдят повтарящите се и чести проблеми при електронното отчитане на контрола и докладването по BulSTAR. Ще се дискутират промените и новостите в европейския стандарт EUCAST.
Ще бъдат докладвани последните национални данни за нивата на антиретровирусна резистентност при HIV, резистентността към противогрипни, противо-хепатитни и антипаразитни и антимикотични препарати както и най- актуалните данни за консумацията на антимикробни препарати.

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

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

I.N Ivanov[1], S. Sabtcheva[2], D. Donchev[1], K.Ivanova[1], N. Korsun[1], I. Alexiev[1], E. Dobreva[1], R. Hristova[1], S. Lozenov[1], I. Stoykov[1,2], I. Philipova[1], S. Angelova[1], T. Tenev[1], R. Harizanov[1], I. Kaftandjiev[1], N. Vladimirova[1], H. Daskalov[3], T.Kantardjiev[1]

1- National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
2- University Specialized Hospital for Active Treatment in Oncology, Sofia
3- National Diagnostic and Research Veterinary Institute, Sofia

The National Reference Center for Microbial Drug Resistance and Antibiotic Use integrates in-depth studies from specialists in the field of drug resistance related to bacterial, fungal, viral and parasitic infections in the community and hospitals as well as antimicrobial resistance in the agriculture and food industry. The latest trends summarized up to 2020 from the National surveillance system of etiological structure of infections, bacterial resistance and antibiotic consumption in Bulgaria - BulSTAR will be presented after analysis of annual reports from more than 150 microbiology laboratories. Issues related to the unusual phenotypes registered in specific bug-drug combinations with respect to correct interpretation will be addressed. The means to avoid misinterpretation in routine practice will be discussed.

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

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

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

## НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ЗООАНТРОПОНОЗИ С ЕПИДЕМИЧЕН РИСК, НОВИ ИНФЕКЦИИ И УПРАВЛЕНИЕ НА БИОРИСКА - 2020 НРЦЗЕРНИ-УБ)

Т. Кантарджиев, И. Томова, Р. Ненова, И. Христова, И. Райнова, И. Иванов, П. Генова, Е. Георгиева, Н. Корсун, В. Толчков, Е. Панайотова, И. Трифонова, И. Кафтанджиев, Е. Кънева, Н. Миткова, М. Николова, Т. Лазарова, В. Левтерова, И. Симеоновски
Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ)

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

През 2020 няма потвърдени случаи на антракс. Диагностицирани при хора в страната са 1 случай на бруцелоза и 3 случая на туларемия без епидемична връзка. За годината бяха диагностицирани 1 случай на ККХТ и 1 - на ХТБС. Диагностицирани са
86 пациента с остра Q-треска, вкл. случаи регистрирани във връзка с 5 епидемични взрива от заболяването в страната. Проследени са и 3 пациента с хронична форма на инфекцията с развитие на ендокардит. През 2020 г. са изследвани 77001 респираторни проби на пациенти с подозрение за инфекция с SARS-CoV-2, от които положителни са били 16268 (21%). За годината са диагностицирани 13 пациента с трихинелоза, от които
10 са свързани с два епидемични взрива. Видовата идентификация на трихинелните ларви доказва T. britovi като причинител. Диагностицирани са 96 болни с ехинококоза. Изготвен анализ на зоонозните заболявания с епидемичен риск регистрирани и съобщени през 2020 г.

Специалисти на НРЦ ЗЕРНИ-УБ са участвали активно в разработването на научни тематики, вкл. по проект BG05M20P001-1.002 „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“; актуализиране методични указания за мрежата, наредби на МЗ, експертни съвети. Активно е и сътрудничеството към съответните мрежи на ECDC и WHO. НРЛ в състава на НРЦ ЗЕРНИ-УБ, успешно участваха в международни схеми за оценка качеството на диагностика на зооантропонозни инфекции при хора. Във връзка с повишаване квалификацията на медицинските специалисти са проведени курсове в различни специалности в инфектологията. Разнообразната дейност на НРЦ ЗЕРНИ-УБ през изтеклата година бе популяризирана чрез редица публикации и участия в и конгреси.

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

## NATIONAL REFERENT CENTER OF ZOONOSES WITH EPIDEMIC RISK, NEW INFECTIONS AND BIOHAZARD MANAGEMENT – 2020 (NRC ZERNI-BM)

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

National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)

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

In 2020, NRC ZERNI-BM maintained preparedness for timely and competent reaction for detection of potential bioterrorist agents. There were no confirmed cases of human anthrax in the country. One case of brucellosis and 3 tularemia cases, without epidemiological link were found during the year. One case of CCHF and 1 of HFRS were diagnosed. Eighty-six patients were with acute Q fever incl. those from 5 outbreaks. Three chronic Q fever patients with endocarditis were monitored. Respiratory samples from 77001 patients with suspected SARS-CoV-2 infection, were tested In 2020. From them 16268 (21%) were positive. For the year, 13 patients with trichinosis were diagnosed, of which 10 were associated with 2 outbreaks. The species identification of Trichinella larvae proves T. britovi as the causative agent. There have been 96 cases of Echinococcosis registered in 2020. Analysis of zoonotic diseases with epidemic risk registered and reported in Bulgaria during 2020 was prepared.

NRC ZERNI-BM experts participated actively in the development of scientific projects, incl. project BG05M20P001-1.002 “Fundamental Translational and Clinical Investigations in Infections and Immunity”, update of guidelines for the country, Ministry of Health regulations, expert commissions, etc. They were also active collaborators to the respective networks within ECDC and WHO. NRLs from ZERNI-BM participated successfully in several international EQAs and conducted training courses for colleagues from the country. The results from various NRC ZERNI-BM activities during 2020 were presented in a number of articles and congresses.

*Key words*: zoonoses, emerging and reemerging infections, biohazard management

## БАКТЕРИАЛНИ, ВИРУСНИ И ПАРАЗИТНИ ВЕКТОР-ПРЕНОСИМИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2020 Г.

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

НЦЗПБ

През 2020 г. бяха регистрирани 151 случая на Лаймска борелиоза (393 случая за 2019 г.), 84 случая на Марсилска треска (143 за 2019 г.) и 95 случая на Ку-треска (50 случая за 2019 г.). Доказан беше 1 случай на Кримска-Конго хеморагична треска ККХТ (3 за 2019 г.) и 2 случая на кърлежов енцефалит (2 за 2019г.). При 86 пациента беше доказана остра форма на инфекция от Ку-треска, хоспитализирани в различни клиники на страната. През 2020 г. в страната са регистрирани пет епидемични взрива от Ку-треска в 4 села от района на гр. Габрово, в 4 села от района на гр. Ямбол, в 3 села около гр. Етрополе и гр. Ботевград, в 3 животновъдни обекти в община Сливен и в 2 села от района на гр. Шумен. От изследваните 205 пациенти от местата с регистрирани епидемични взривове от Ку-треска, 46 лица са с положителни проби за Ку-треска (PCR и anti-*C. burnetii* ph. II IgM антитела), като от тях 9 деца на възраст 4 – 15 години. Въз основа на Споразумение между НЦЗПБ и БАБХ в НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“ са постъпили за изследване кръвни проби на 245 щатни ветеринарни лекари от 27 областни ОДБХ на БАБХ, от които с остра форма на ку-инфекция са диагностицирани 29 лица. При 3 пациента (двама от София и един от Варна) беше доказана хронична форма на инфекцията с развитие на ендокардит. През 2020 г. бяха регистрирани 5 случая на вносна малария с причинител *P. falciparum*. Четирима от заболелите са български граждани и един е студент от Нигерия. През годината е регистриран и един случай на висцерална лайшманиоза при дете на 8 г. от гр. София, след пребиваване в един от ендемичните райони за това заболяване – обл. Стара Загора. Проведени бяха 38 лабораторни изпитвания върху инсектицидната и репелентна ефективност на биоциди с химични, микробни и етерични активни субстанции.

## BACTERIAL, VIRAL AND PARASITIC VECTOR-BORNE INFECTIONS IN BULGARIA, 2020

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

A total of 151 cases of Lyme borreliosis (393 cases in 2019), 84 cases of Mediterranean spotted fever (143 in 2019) and 95 cases of Q-fever (50 cases in 2019) were registered in 2020. A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever (3 in 2019) and 2 cases of tick-borne encephalitis (2 cases on 2019) were detected. In 86 patients, an acute form of Q fever infection was demonstrated, hospitalized in different hospitals in the country. In 2020, five epidemic outbreak of Q fever occurred in 4 villages in the region of Gabrovo, in 4 villages around Yambol, in 3 villages around Etropole and Botevgrad, 3 livestock farms in the municipality of Sliven and in 2 villages in the region of Shumen. Of the studied 205 patients of the places with registered outbreaks of Q fever, 46 persons were positive for Q fever (PCR and anti-*C. burnetii* ph. II IgM antibodies), of which 9 children aged 4 – 15 years. On the basis of Agreement between NCIPD and BFSA in NRL "Cell cultures, rickettsiae and oncogenic viruses" were tested blood samples of 245 veterinarians from 27 Departments of BFSA, of which 29 persons were diagnosed with acute form of Q fever. In 3 patients (two from Sofia and one from Varna), chronic form of the infection with endocarditis was demonstrated. In 2020, 5 imported malaria cases were registered, caused by *P. falciparum*. Four of the patients are Bulgarians and one is foreigner. Indigenous visceral leishmaniasis was registered in one Bulgarian citizen– an eight-year-old child from Sofia. A total of 38 laboratory investigations on insecticidal and repellent efficacy of biocides with chemical, microbial and essential active compounds were conducted.

Key words: vector-borne infections, Lyme borreliosis, CCHF, Mediterranean spotted fever, Q-fever, visceral leishmaniasis

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

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

Националният референтен център (НРЦ) по СПИ и вирусни хепатити е създаден през 2013 г. и функционално обединява експерти от Националната референтна лаборатория по Микози и СПИ, Националната рефрентна лаборатория Молекулярна микробиология, Националната рефрентна лаборатория по Имунология, Националната референтна лаборатория Диагностика на паразитозите, Секция епидемиология и надзор на заразните болести, Националната рефрентна лаборатория Хепатитни вируси, Националната рефрентна лаборатория Херпесни и Онкогенни вируси, Националната рефрентна потвърдителна лаборатория по HIV.
Основна цел на НРЦ по СПИ и вирусни хепатити е осигуряване на интегриран мултидисциплинарен подход (микробиолози, имунолози, вирусолози, паразитолози, епидемиолози) при контрола, диагностиката, превенцията, профилактиката и етиотропното лечение на СПИ и вирусните хепатити, както и осъществяване на ефективно взаимодействие с Министерство на Здравеопазването (МЗ), Регионалните здравни инспекции (РЗИ), Европейския Център за Контрол и Профилактика на заболяванията (ECDC) и Световната Здравна Организация (СЗО).
В тази връзка ще бъдат обобщени и анализирани резултатите от диагностичната дейност, имунологичният мониторинг и епидемиологичния надзор на най-често срещаните сексуално предавани бактериални и вирусни инфекци и паразитози през 2020, както и ще бъдат обсъдени някои от съвременните тенденции при СПИ в Европа и у нас.

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

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

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

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

In this regard, the results of the diagnostic activity, immunological monitoring and epidemiological surveillance of the most common sexually transmitted bacterial and viral infections and parasitoses in 2020 will be summarized and analyzed as well as some of the current trends in STIs in Europe and in Bulgaria .

## ДЕЙНОСТИ НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, СВЪРЗАНИ С МЕДИЦИНСКО ОБСЛУЖВАНЕ (НРЦ-ИСМО) ПРЕЗ 2020Г.

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

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

Дейностите на НРЦ-ИСМО за 2020г. са организирани в ключови направления, свързани с ежегодния надзор и анализ на ИСМО; молекулярно-генетични изследвания на бактериални и вирусни причинители с рисков потенциал за здравето на пациенти и медицински персонал; проследяване на вирусно носителство сред медицински лица; обследване на вътреболнични взривове и проучвания, относно процесите на стерилизация и дезинфекция в болнична среда.

В съответствие с годишния план за 2020 дейностите на отдел „Епидемиология“ бяха в областта на епидемиологичния надзор на инфекциите, свързани с медицинското обслужване (ИСМО) през 2019г. и епидемиологичния анализ на ИСМО за 2020г.

Извършени са генетични анализи за идентификация и потвърждение на *Clostridioides difficile,* като при амбулаторни пациенти положителен резултат е доказан при 15.9% от изследваните лица, докато сред лежащо болни достига 54.5%.

Сред 40.4% от изследваните болнични изолати *Klebsiella pneumoniae* от страната с фенотипно доказана резистентност към карабапенеми се запазва тенденцията за широко разпространение на NDM-ензими.

Продължават дейностите по мониториране на вътреболнични легионелни инфекции, като сред диагностицираните седем случая през 2020г. не се установяват данни за наличие на нозокомиална легионерска болест.

През 2020г. е проследено носителството на HBsAg и anti HCV на медицински специалисти от различни здравни и лечебни заведения в страната, и са проведени проучвания на имунитета срещу хепатит В вирусна инфекция при 21 души медицински персонал.

В изпълнението на Националната програма за контрол и лечение на ротавирусните гастроентерити през 2020г. се доказва, че 19.3% от изследваните материали са с положителен резултат за ротавируси, като се установява едновременно и циркулацията на различни генотипове. Доминира генотип G9P[4], а в 59.3% от пробите е установена смесена инфекция с повече от един генотип. При един ваксиниран пациент е установен ротавирус от генотип, който не е включен във ваксината.

През 2020г. е отчетен продължаващ взрив от морбили в страната с последен регистриран случай на 21.05.2020г. През изминалата година бяха регистрирани общо 275 случая на морбили от 8 области в страната. Доказани бяха морбилен генотип B3 и D8. Беше определен имунния статус срещу морбили на медицински персонал, контактни на заболели, а наличие на оптимален защитен морбили IgG титър беше доказан при >90% от изследваните лица. В края на 2020г. стартира провеждане на Национално сероепидемично проучване за наличие на колективен имунитет срещу морбили и рубеола в страната като всички лабораторни изследвания ще бъдат проведени в НРЛ „Морбили, паротит, рубеола“, НЦЗПБ.

През 2020г. дейността на лаб. „Дезинфекция и стерилизация“ беше насочена основно към превенция на COVID-19. В тази връзка са извършени 288 изпитвания за

ефективност на дезинфектанти, предназначени за повърхности и хигиена на ръце, както и на апаратура, предназначена за дезинфекция на въздух и/или повърхности. Голяма част от изпитаните продукти са предназначени за приложение в лечебните заведения с цел редуциране на патогенните микроорганизми, включително причинители на ИСМО. В обучителна дейност, извършена от специалистите на лабораторията, специално внимание е отделено на алтернативните методи, които биха могли да се използват в лечебните заведения за дезинфекция на повърхности, въздух, лични предпазни средства и др. обекти. В допълнение на това е направено задълбочено проучване на метод за дезинфекция с УВ светлина на работни обувки в болнични заведения. Подробно е проучена и остатъчната бактерицидна и фунгицидна активност на продукт, съдържащ наносребро, като възможността за контрол на ИСМО. През 2020г. НРЦ-ИСМО осъществи редица дейности във връзка с функцията на НЦЗПБ като компетентна институция по нозокомиални инфекции към ECDC.

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

## ACTIVITIES OF NATIONAL REFERENCE CENTER OF HEALTHCARE - ASSOCIATED INFECTIONS (NRC-HAI) IN 2020

E. Dobreva, N. Vladimirova, I. N. Ivanov, I. Tomova, M. Nikolova, S. Yordanova, T. Tenev, E. Golkocheva-Markova, S. Krumova, L. Nikolaeva-Glomb, A. Detcheva, R. Hristova and K. Ivanova

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

The main activities of the NRC-HAI in 2020 are organized in key areas related to the annual surveillance and analysis of the healthcare-associated infections (HAIs); molecular-genetic approaches of bacterial and viral pathogens with potential risk for patient and medical staff; investigation of hospital outbreaks; viral screening studies among healthcare specialties and performance of surveys on sterilization and disinfection in hospitals.

In 2019 and 2020 the main activities of the Department of Epidemiology were executed according to the annual plans and were arranged in several basic directions as surveillance of HAIs reported during 2019 and 2020, and epidemiological analysis of HAIs. *Clostridioides difficile* genetic analyzes for identification and confirmation were performed, as in outpatient a positive result was found in 15.9%, while in hospitalized patients reached 54.5%.

The country widespread of NDM-enzymes tendency was maintained in 40.4% among investigated hospital isolates *Klebsiella pneumoniae* with carbapenem resistance.

Continue important activities for monitoring of legionella infections in the hospitals, but among seven cases diagnosed in 2020 has not been established evidence of nosocomial Legionnaires' disease.

The carriage of HBsAg and anti-HCV among medical staff and HBV immunity has been studied in 21 individuals from various healthcare facilities in the country.

In implementation of the National Program for Control and Treatment of Rotavirus Gastroenteritis in 2020, 19.3% of the tested materials were positive for rotaviruses and the dominate genotype is G9P[4]. In 59.3% of the samples was detected a mixed infection with more than one genotype. In one vaccinated patient has been demonstrated genotype Rotavirus not included in the vaccine.

Surveillance of measles outbreak was conducted in 2020, with the last registered case on May 21, 2020. During the last year the total of 275 measles cases were reported from eight regions in the country. Measles B3 and D8 genotypes have been detected. The immune status against measles was tested in medical staff contacted with confirmed measles cases and presence of optimal protective immunity measles IgG titre was demonstrated in > 90% of investigated. At the end of 2020, the National seroprevalence study for detection of collective immunity against measles and rubella in the country was started. All laboratory tests will be conducted in NRL "Measles, mumps, rubella", NCIPD.

In 2020, the activity of the lab. "Disinfection and sterilization" was aimed primarily at the prevention of COVID-19. In this regard, 288 tests for evaluation bactericidal and fungicidal activity of products for surfaces, hand hygiene and devices for surface and air disinfection were performed. Most of the tested products are intended for use in hospitals in order to reduce pathogens including agents responsible for HAI. In the training activities performed by the specialists of the laboratory, special attention is paid to the alternative methods that could be used in the healthcare facilities for disinfection of surfaces, air, personal protective equipment, etc. In addition, an in-depth study of a method for UV disinfection of work shoes in hospitals has been made. The residual bactericidal and fungicidal activity of a product containing nanosilver, such as the possibility of controlling nosocomial infections, has also been studied in detail. In 2019 the NRC-HAI performed a

number of activities in regard to the NCIPD function as the competent body for healthcare-associated infections to ECDC.

**Key words:** Healthcare-associated infections (HAI)

## ДЕЙНОСТ НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМИ ИНФЕКЦИИ: ГОДИШЕН ДОКЛАД ЗА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2020 Г. И ЗА 1-ВО ПОЛУГОДИЕ НА 2021 Г.

Н. Владимирова[1] Л. Николаева-Гломб[2], С. Крумова[2], Т. Тенев[2], В. Левтерова[3] НЦЗПБ, Национален референтен център по ваксинопредотвратими инфекции, [1]Отдел Епидемиология
[2]Отдел Вирусология [3]Отдел Микробиология

**Цел** на годишният доклад е да представи обобщение на работата на Националния референтен центърпо ваксинопредотвратими и нфекции(НРЦ-ВПИ) по епидемиологичния и лабораторния надзор, както и по профилактиката на ВПИ.
**Материали и методи:** обобщена е информацията относноизпълнението на противоепидемичната, научната, учебната и организационно-методичната дейност предвидени в годишните планове на НРЦ- ВПИ за 2020 и 2021 г.

Резултатите са:
Анализи на ваксинопредотвратимите болести в България ( за 2019 и 2020 г.);
Анализи на имунизациите и имунизационния обхват с профилактични ваксини в България (за 2019 и 2020 г.) ;
Извършване на референтна лабораторна диагностика за доказване причинители на ВПИ, подлежащи на лабораторен надзор;
Подготвени и разпространени информационни материали за Европейската имунизационна седмица в България (2020 и 2021 г.);
Подготвяне на периодична информация от надзора на ВПИ в страната и изпращане към Министерство на здравеопазването;
Изработване на научен проект за сероепидемиологично проучване на морбили/рубеола/ВРС според работния план на националната програма за елиминация на морбили и рубеола (2019-2022) и работа по първи етап от научния проект- събиране на серумни проби и епидемиологична информация;
Извършване на анализ на актуалното състояние по елиминацията на морбили и рубеола за 2019 г. и предоставяне на НВК към МЗ и на ЕРБ на СЗО;
Работа с регионалния офис на СЗО за оценка на елиминацията на двете инфекции в България;оценяване на НРЛ-МПР от експерти на СЗО и пълна акредитация на лабораторията за извършване на серологична диагностика на морили и рубеола и молекулярна детекция;
Интензивна дейност с ECDC – участие в уебинари по тема ваксини и ваксинации срещу COVID 19;
Представяне на резултатите от научната работа по ВПИ в български и международни научни форуми;
Преподавателска работа на експертите от НРЦ-ВПИ в следдипломното обучение по Програмата за СДО на НЦЗПБ;
Предоставяне на информация за разпространението на конкретни ВПИ и за начините за предпазване от тях.
Организиране на ваксинации срещу хепатит Б и срещу COVID 19 на служители на НЦЗПБ.
**Заключение:**Работата на НРЦ-ВПИ е в подкрепа на здравните власти в превенцията и управлението на ВПИ.

**Ключови думи:** ваксинопредотвратими болести, надзор, имунизации
**Адрес за кореспонденция:** д-р Надежда Владимирова отдел Епидемиология Национален център по заразни и паразитни болести, гр. София Ел. поща: nvladimirova@ncipd.org

## ACTIVITIES OF THE NATIONAL REFERENCE CENTER "VACCINE PREVENTABLE INFECTIONS": ANNUAL REPORT FOR 2020 AND SEMIANNUAL REPORT FOR 2021

N. Vladimirova[1], L. Nikolaeva-Glomb[2], S. Krumova[2], T.Tenev[2] V. Levterova[3] NCIPD, National Reference Center for Vaccine Preventable Diseases,[1]Department of Epidemiology, [2]Department of Virology, [3]Department of Microbiology

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

**Materials and methods:** Information on the realization of the NRC- VPI annual plans for 2020 and 2021 is summarized**.**

Results:

Epidemiological analyses of all reported vaccine preventable diseases in Bulgaria (for 2019 and 2020) are elaborated and published;

Epidemiological analyses of immunizations and immunization coverage in Bulgaria (for 2019 and 2020) are elaborated and published;

Performance of lab diagnostics of VPI etiological agents, subject of reference lab surveillance is reported;

Information materials for European Immunization Week (EIW) (2020 and 2021) were elaborated and distributed;

Preparing periodic epidemiological information coming from the VPI surveillance and sending it to the Ministry of health;

Elaborating of a project for seroepidemiological study of measles/rubella/CRS in accordance to the working plan of the national programme for measles and rubella elimination(2019-2022); collection of sera and epidemiological information;

Annual measles and rubella elimination status update(2019) was performed and provided to NVC in MoH and ERB of WHO;

Collaboration with the regional office of WHO for assessment of measles and rubella elimination in Bulgaria is realized; NRL-MMR was assessed by WHO experts during an accreditation review and based on this, the assessors recommend to fully accredit the NRL for measles and rubella serology and molecular detection;

Collaboration with ECDC – active participation in webinars related to the vaccines, vaccinations and surveillance of COVID 19;

Scientific work on VPI is presented at national fora;

Teaching activities of NRC-VPD experts in the annual NCIPD Continuous Professional Development education programme;

Updated information regarding VPD morbidity, prevention and control measures, was disseminated to the community;

Vaccinations against hepatitis B and against COVID 19 were organized for the NCIPD staff.

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

**Key words:** vaccine preventable infections, surveillance, immunizations

**Corresponding author:**
Dr Nadezhda Vladimirova, M.D. Dept. Epidemiology
National Centre of Infectious and Parasitic Diseases e-mail: nvladimirova@ncipd.org

## Сесия II

### РАЗПРОСТРАНЕН ЛИ Е *MYCOBACTERIUM CHIMAERA* СРЕД ПАЦИЕНТИ С БЕЛОДРОБНА ПАТОЛОГИЯ В БЪЛГАРИЯ?

Е. Бачийска, Ю. Атанасова, С. Йорданова, А. Байкова
Национална референтна лаборатория по туберкулоза (НРЛ ТБ), НЦЗПБ

**Ключови думи:** NTM, *M. intracellulare*, *M. chimaera*

**Въведение:** *M. chimaera* е бавнорастящ нетуберкулозен микобактерий (NTM), наскоро описан вид в *Mycobacterium avium* complex, отдиференциран от *M.intracellulare*. Асоцииран е с кардиоваскуларни и белодробни инфекции.

**Цел:** Да се проучи разпространението на *M. intracellulare*/*M. chimaera* сред пациентите с белодробни заболявания в България, 2018-2020г.

**Методи:** В ТБ лабораторната мрежа в страната бяха изследвани 82 780 проби на 44 247 пациента с белодробна патология. Културите бяха видово идентифицирани в НРЛ ТБ, НЦЗПБ чрез LPA: Geno Type Mycobacterium CM, AS и NTM-DR, Hain Lifescience, Германия, базирани на DNA Strip технология.

**Резултати:** Изолирани бяха 184 NTM, като 17,5% от тях идентифицирахме като *M. intracellulare.* Жените преобладаваха в 62,5%. Най-засегната беше възрастовата група над 65г. – 38%. Пациентите бяха концентрирани в 3 области: Пловдив, София-град и Добрич – 71,8%. Изолирани бяха предимно от спутум – 78,2%. Ziel-Neelsen положителни за КУБ бяха 34,4%. *M. chimaera* беше идентифициран двукратно, в един имунокомпрометиран пациент.

**Заключение:** Предвид дългото и трудно лечение на микобактериозите, точната видова идентификация е от съществено значение при определяне на етиотропната терапия.

***Благодарности.*** *Проучването е осъществено с подкрепата на Европейския фонд за регионално развитие чрез ОП „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2020, BG05M2OP001-1.002- 0001-C04 „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“ и Проект, ФНИ: „Разпространение и еволюция на ендемичен мултирезистентен генотип на M.tuberculosis (SIT41, подгрупа TUR) в България“, ДН 13/4, 15.12.2017.*

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

## IS *MYCOBACTERIUM CHIMAERA* WIDESPREAD AMONG PATIENTS WITH PULMONARY DISEASES IN BULGARIA?

E. Bachiyska, Y. Atanasova, S. Yordanova, A. Baykova
National Reference Laboratory for Tuberculosis (NRLTB), NCIPD, Bulgaria

**Key words:** NTM, *M. intracellulare*, *M. chimaera*

**Introduction:** *M. chimaera* is a slow-growing non-tuberculous mycobacterium (NTM), a recently described species in the *Mycobacterium avium* complex, which was differentiated by *M. intracellulare*. It is associated with cardiovascular and pulmonary infections.

**Objective:** To study the prevalence of *M. intracellulare/M. chimaera* among patients with pulmonary pathology in Bulgaria, 2018 - 2020.

**Methods:** 82,780 samples of 44,247 patients with pulmonary pathology were tested in the TB laboratory network in the country. The cultures were species identified in NRL TB, NCIPD by LPA: Geno Type Mycobacterium CM, AS and NTM-DR, Hain Lifescience, Germany, based on DNA Strip technology.

**Results:** As *M. intracellulare* were identified 17.5% of 184 NTMs in the 3-year period. Women predominated in 62.5%. The most affected was the age group over 65 years. - 38%. Patients were concentrated in 3 districts: Plovdiv, Sofia-city and Dobrich - 71.8%. The strains were isolated mainly from sputum - 78.2%. Ziel-Neelsen staining for AFB was positive in 34.4%. *M. chimaera* was identified twice in one immunocompromised patient.

**Conclusions:** Given the long and difficult treatment of mycobacteriosis, accurate species identification is essential in determining etiotropic therapy.

***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 and NSF Project: Distribution and evolution of an endemic multi-resistant genotype of M. tuberculosis (SIT41, subgroup TUR) in Bulgaria, DN 13/4, 15.12.2017.*

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

## ЦИРКУЛАЦИЯ НА РЕСПИРАТОРНИ ВИРУСИ ПО ВРЕМЕ НА COVID-19 ПАНДЕМИЯТА

И. Трифонова[1], В. Добринов[1], И. Григорова[1], С. Ангелова[1], С. Волева[1], Ч. Исмаилова[1], Л. Григорова[1], И. Алексиев[1], Т. Червенякова [2], Н. Корсун[1]

[1]НРЛ „Грип и ОРЗ", Отдел Вирусология, Национален център по заразни и паразитни болести, София;
[2]Инфекциозна болница „Проф. Иван Киров", София

***Въведение:*** Острите вирусни респираторни инфекции (ОРИ) са свързани с висока заболеваемост, особено при деца и възрастни. Целта на това проучване бе да характеризира циркулацията на респираторните вируси по време на COVID-19 пандемия и да идентифицира ко-инфекциите между SARS-CoV-2 и други респираторни вируси в България.

***Методи:*** Назофарингеални проби на пациенти от всички възрастови групи и различни региони на страната бяха събрани и тествани с помощта на RT-PCR в реално време за SARS-CoV-2, грипни вируси тип A и B и други 8 респираторни вируса - респираторно синцитиален вирус (RSV), човешки метапневмовирус (HMPV), парагрипни вируси (PIV) 1/2/3, риновируси (RV), аденовируси (AdV) и бокавируси (BoV).

***Резултати:*** От март 2020 г. до края на юни 2021 г. бяха тествани за SARS-CoV-2 90080 клинични проби от суспектни пациенти, от които 24% бяха положителни. През сезон 2020/2021 г. бяха изследвани общо 2426 назофарингеални секрета на пациенти с грипоподобно заболяване /ОРЗ за грипни вируси тип A/B. Не бяха доказани грипни вируси. Общо 439 респираторни проби от деца и юноши на възраст ≤16 години с ОРИ бяха тествани за гореспоменатите 8 респираторни вируса. Сред 327 деца и юноши, които бяха отрицателни за SARS-CoV-2, най-често бяха установени RV (35 случая), последвани от RSV (32 случая), PIV-3 (20 случая), BoV (19 случая), HMPV (12 случая) и AdV (9 случая). Доказани бяха 15 случая на двойни инфекции. Сред 112 деца и юноши, положителни за SARS-CoV-2, бяха идентифицирани общо 18 (16%) случая на коинфекции между SARS-CoV-2 и други респираторни вируси. Респираторните проби на 317 пациенти на възраст ≥65 години, положителни за SARS-CoV-2, бяха изследвани също за тези 8 респираторни вируса и бяха доказани 17 (5,4%) случая на коинфекции, включващи SARS- CoV-2: HMPV (6 случая), RSV (5 случая), AdV (4 случаи), RV (2 случая).

***Заключение:*** По време на пандемията от COVID-19 през 2020/2021 г. бе установена липса на циркулация на грипни вируси и слаба циркулация на други респираторни вируси. Честотата на ко-инфекциите между SARS-CoV-2 и други респираторни вируси беше по- висока при деца и юноши ≤16 год. в сравнение с тази при възрастни ≥65 години.

## CIRCULATION OF RESPIRATORY VIRUSES DURING THE COVID-19 PANDEMIC

I. Trifonova[1], V. Dobrinov[1], I. Grigorova[1], S. Angelova[1], S. Voleva[1], Ch. Ismailova[1], L.Grigorova1, I. Alexiev[1], T. Cherveniakova[2], N. Korsun[1]

[1]National Laboratory "Influenza and ARD", Department of Virology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia;

[2]Infectious Hospital "Prof. Ivan Kirov", Sofia

***Introduction:*** Acute viral respiratory infections (ARI) are associated with high morbidity, especially in children and elderly. Objective of this study was to characterise the circulation of respiratory viruses during the COVID-19 pandemic and to identify co-infections between SARS- CoV-2 and other respiratory viruses in Bulgaria.

***Methods:*** Nasopharyngeal samples of patients in all age groups from different regions of the country were prospectively collected and tested using a real-time RT-PCR for SARS-CoV-2, influenza type A and B viruses and 8 other respiratory viruses - respiratory syncytial virus (RSV), human metapneumovirus (HMPV), parainfluenza viruses (PIV) 1/2/3, rhinoviruses (RV), adenoviruses (AdV) and bocaviruses (BoV).

***Results:*** From March 2020 to the end of June 2021, 90080 clinical specimens of suspected patients were tested for SARS-CoV-2 and 24% of them were positive. During the 2020/2021 season, a total of 2426 nasopharyngeal swabs of patients with influenza-like illness/ARI were tested for influenza type A/B viruses. No influenza viruses were identified. A total of 439 respiratory specimens of children and adolescents aged ≤16 years with ARI were tested for the above mentioned 8 respiratory viruses. Among the 327 children and adolescents, who were SARS-CoV-2 negative, most frequently were detected RV (35 cases), following by RSV (32 cases), PIV-3 (20 cases), BoV (19 cases), HMPV (12 cases) and AdV (9 cases). 15 cases of double infections were detected. Among the 112 children and adolescents, who were SARS- CoV-2 positive, a total of 18 (16%) cases of coinfections between SARS-CoV-2 and these respiratory viruses were identified. Respiratory specimens of 317 patients aged ≥65 years, who were SARS-CoV-2 positive were also tested for these 8 respiratory viruses and 17 (5,4%) cases of coinfections involving SARS-CoV-2 were detected: with HMPV (6 cases), RSV (5 cases), AdV (4 cases) and RV (2 cases).

***Conclusion:*** During the COVID-19 pandemic 2020/2021, missing circulation of influenza viruses and weak circulation of other respiratory viruses were established. The proportion of coinfections involving SARS-CoV-2 and other respiratory viruses was higher in children and adolescents ≤16 years than in adults aged ≥65 years.

COVID-19

# КОМБИНИРАНИ ИНФЕКЦИИ ОТ *B. PERTUSSIS* И РЕСПИРАТОРНИ ВИРУСИ

Ангелова А.[1,2,3], Ленгерова Г.[1,2,3,] , Калчев Й.[1,2,3], Кетев К. [3,4], Комитова Р.[5], Левтерова В.[6], Корсун Н.[6], Кантарджиев Т. [6], Атанасова М. [1,2,3], Мурджева М.[1,2,3]

Катедра микробиология и имунология, ФФ, Медицински университет - Пловдив
Научно-изследователски институт на Медицински университет - Пловдив (НИМУ)
УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив
Медицински Симулационен Тренировъчен Център към НИМУ на МУ-Пловдив
Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина, МУ-Пловдив
Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ)

Макар и ваксинопредотвратим, коклюшът продължава да се разпространява и дори с увеличаващи се напоследък заболяемост и смъртност при кърмачета. Относително малко се знае за ко-инфекциите между *B. pertussis* и респираторни вируси.
**Цел:** Да се представят случаи на кърмачета с коклюш, съчетан с вирусна инфекция, диагностицирана с мултиплексен PCR (mPCR).
**Материали и методи:** Назофарингеални секрети от две момчета на 1 и 2 мес. и две момичета на 2 и 9 мес., пациенти на Клиниките по Педиатрия и Инфекциозни болести на
УМБАЛ „Св.Георги“-Пловдив, са изследвани чрез мултиплексен PCR (FilmArray, Biomerieux) за респираторни патогени.
**Резултати:** При двете момченца - с прояви на пристъпна коклюшоподобна кашлица и диспнея, са открити съчетани инфекции от *B. pertussis* и *Human rhinovirus/enterovirus*. При едно от момиченцата - със спастична кашлица с реприз и данни за контакт с лице с подобни симптоми, е установена ко-инфекция с *Human rhinovirus (hRV1-4)*. Девет- месечното момиченце е в тежко състояние, със затруднено дишане и кашлични пристъпи, водещи до повръщане и цианоза. При нея освен *B. pertussis* се доказват *Coronavirus 229E* и *Human rhinovirus (hRV1-4).* Патогените са потвърдени чрез RT-PCR в НЦЗПБ, като при второто момиченце се открива и *Human bocavirus (*който не е в спектъра на mPCR панел).

**Заключение:** Коклюшът може да се асоциира с вирусни инфекции, които могат да утежнят клиничното протичане при кърмачета. Изследването с mPCR осигурява бърза диагноза и адекватно лечение, преди да настъпят сериозни усложнения. Този подход може да предотврати и появата на епидемични огнища.

**Ключови думи:** Коклюш, мултиплексен PCR, вируси

Адрес за кореспонденция:

Д-р Андреана Ангелова
Асистент към Катедра микробиология и имунология Медицински Университет - Пловдив
бул. "Васил Априлов" 15-А 4002,
Пловдив България тел: 0897764494

## *B. PERTUSSIS* CO-INFECTIONS WITH RESPIRATORY VIRUSES

Angelova A.[1,2,3], Lengerova G.[1,2,3], Kalchev Y.[1,2,3], Ketev K. [3,4], Komitova R.[5], Levterova V.[6], Korsun N.[6], Kantardjiev T.[6], Atanasova M. [1,2,3], Murdjeva M.[1,2,3]

Department of Microbiology and Immunology, Medical University of Plovdiv
Research Institute at MU- Plovdiv (RIMU)
St. George University Hospital – Plovdiv
Medical Simulation Training Center at RIMU
Department of Infectious Diseases, Parasitology and Tropical medicine, MU-Plovdiv
National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)

Although it is a vaccine-preventable infection pertussis continues to spread with increasing infant morbidity and mortality in recent years. Relatively little is known about co-infections between *B. pertussis* and respiratory viruses.

**Objective:** To present cases of infants having pertussis associated with viral infections, diagnosed with multiplex PCR (mPCR).
**Materials and methods**: Nasopharyngeal swabs from two boys aged 1 and 2 months and two girls aged 2 and 9 months, hospitalized in the Pediatrics and Infectious Diseases Clinics of "St. George " University hospital were examined by multiplex PCR (FilmArray, bioMerieux) for respiratory pathogens.
**Results:** Both boys were found to have *B. pertussis* co-infections with *Human rhinovirus/enterovirus,* manifested by recurrent spastic cough and inspiratory dyspnea. In one of the girls with whooping cough after a contact to a relative with similar symptoms, co-infection with *Human rhinovirus (hRV1-4)* was found. The nine-month-old girl was severely ill, with violent cough paroxysms, leading to vomiting and cyanosis. In addition to *B. pertussis* from this patient, *Coronavirus 229E* and *Human rhinovirus (hRV1-4)* were detected. The pathogens were confirmed by RT-PCR at the NCPID, where it was found that in combination with the described microorganisms, the nine- month-old girl was also infected with *Human bocavirus (HBoV,)* (which is not in the mPCR panel spectrum).
Conclusion: Pertussis can be associated with viral infections, which may aggravate its clinical course in infants. The analysis with multiplex PCR allows timely diagnosis and adequate treatment of patients before serious complications occur. Furthermore, this approach can prevent the onset of outbreaks.

**Key words:** Pertussis, multiplex PCR, viruses

## КИСТНА ЕХИНОКОКОЗА С НЕОБИЧАЙНА ЛОКАЛИЗАЦИЯ: РЕТРОСПЕКТИВЕН АНАЛИЗ ЗА ДЕСЕТ ГОДИШЕН ПЕРИОД

Румен Харизанов[1], Искра Райнова[1], Искрен Кафтанджиев[1]

[1] НЦЗПБ, София – Отдел „Паразитология и тропическа медицина“
Адрес за кореспонденция: 1504 София, бул. Янко Сакъзов 26, тел. 02/9446999, вътр. 310

**Въведение.** Сред страните членки на Европейския съюз, България заема водеща позиция по брой регистрирани случаи на КЕ сред населението независимо от установената тенденция за намаляване на случаите регистрирани годишно. Според различни литературни източници заболяването засяга основно черния дроб и на второ място белите дробове, като тези локализации се установяват в най-малко 90% от случаите.

**Цел** на нашето проучване е да определим честотата на случаите с органна локализация различна от чернодробна и белодробна и какви са били диагностичните и терапевтични подходи, и изходът от заболяването.

**Пациенти и методи.** Проучването е ретроспективен анализ на регистрираните случаи на КЕ с екстра-хепатопулмонарна локализация и обхваща десет годишен период от януари 2010 до декември 2019 г. От него са изключени случаите със засягане на черен дроб и/или бели дробове. Използвани са данни от карти за епидемиологично проучване на случаи с КЕ, съдържащи медицинска информация за органната локализация, броя на ехинококовите кисти, метода за диагностика и потвърждаване, терапевтичния подход и изхода от заболяването.

**Резултати.** Общо за периода в страната са регистрирани 2863 случая на КЕ (средно 286.3±60.52 SD), от които 148 (средно 14.8±2.97 SD) с органна локализация различна от чернодробна и/или белодробна. Относителния дял на тези случаи е вариабилен през годините, като средно за периода той е 5.17%. Основна част от пациентите с екстра- хепатопулмонарна локализация на КЕ са лица над 18-годишна възраст, а разпределението по полов признак показва превес на пациентите от женски пол (n=85, 57.43%). Първичните случаи (n=126, 85.14%) надвишават значително случаите на рецидив (n=22, 14.86%), като в 81.08% (n=120) се установява наличие на солитарна ехинококова киста. С най-висока честота се установява засягането на слезката, следвано от това на коремната кухина и бъбреците, както и на мускули/подкожна тъкан.

**Заключение.** Настоящото проучване показва, че екстра-хепатопулмонарната локализация на КЕ не е толкова рядка и че в повечето случаи се касае за първично заболяване. Това налага клиницистите да имат предвид заболяването в диференциално-диагностичния план при установяване на кистозна формация, независимо от органната локализация.

**Ключови думи:** кистна ехинококоза, необичайна локализация, диагноза, изход

## CYSTIC ECHINOCOCCOSIS WITH UNUSUAL LOCALIZATION: A RETROSPECTIVE ANALYSIS OVER A TEN-YEAR PERIOD.

Rumen Harizanov[1], Iskra Rainova[1], Iskren Kaftandjiev[1]

[1] NCIPD, Sofia – Department "Parasitology and tropical medicine"
Address for correspondence: 1504 Sofia, 26 Yanko Sakazov Blvd., tel. 02/9446999, ext. 310

**Introduction.** Among the member states of the European Union (EU), Bulgaria holds a leading position by the number of cases of CE among its population, regardless of the established trend of decreasing annual number of cases. According to a various literature sources, the disease most often affects the liver with the lungs being in second place, and these organ localizations are found in at least 90% of all cases.
**Aim** of present study is to define the proportion of cases with unusual organ localization, the diagnostic and therapeutic approaches in such cases, and the outcome of them.

**Patients and Methods.** The study is a retrospective analysis of cases of CE with extra-hepatopulmonary localization recorded for a 10-year period from January 2010 to December 2019. Cases involving the liver and/or lungs alone, or in combination with other affected organs were excluded from the study to determine the frequency of cases in which only other organs and systems of the human body were affected. Data from epidemiological survey cards of cases with CE registered in the country and containing medical information about the organ localization and number of hydatid cysts, the method of diagnosis and confirmation of disease, the therapeutic approach and clinical outcome were processed.

**Results.** A total of 2863 cases of CE (mean 286.3 ± 60.52 SD) were registered in the country, of which 148 (mean 14.8 ± 2.97 SD) with organ localization other than liver and / or lung. The relative share of these cases is variable over the years, averaging 5.17% for the period. The majority of patients with extra-hepatopulmonary localization of CE were adults. The distribution by gender showed predominance of female patients (57.43%) over those of males and primary cases (85.14%) exceeded the cases of recurrence. According to our study most common is the spleen involvement, followed by involvement of the abdominal cavity, kidneys and muscle/subcutaneous tissue.
**Conclusion.** This study shows that the extra-hepatopulmonary localization of CE is not so rare, and in most cases it is a primary disease. In respect of this, clinicians should consider hydatidosis in the differential diagnosis when cystic formation(s) is found, regardless of the organ involved.

**Key words:** cystic echinococcosis, unusual localization, diagnosis, outcome

# СЕСИИЯ III: COVID-19

## УПОТРЕБА НА АНТИБИОТИЦИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПОТВЪРДЕНА COVID-19 ИНФЕКЦИЯ. КОНСЕНСУС НА ЕКСПЕРТНИЯ СЪВЕТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ КЪМ БАМ

Людмила Боянова[1], Грозданка Лазарова[2]
[1]Катедра медицинска микробиология, Медицински университет- София
[2]Катедра Микробиология и паразитология, Тракийски университет-Стара Загора

**Цел** на проучването беше анализ на антибиотичната употреба при пациенти с COVID-19 и предлагане на алтернативни антибиотици според тежестта на инфекцията**.** **Материали/методи:** Проучена беше честотата на бактериални коинфекции при пациенти с COVID-19, употребата и ръководствата за употреба на антибиотици за 4 групи пациенти според клиничната картина и са направени препоръки за алтернативни антибиотици в случаите, в които се налага. **Резултати:** Бактериални коинфекции при COVID-19 развиват средно около 7% от пациентите. В условията на COVID-19 пандемия, употребата на антибиотици и други антимикробни лекарствени препарати трябва да се реазглежда като част от емпиричната стратегия за лечение на по-тежките суспектни или потвърдени случаи на COVID-19, при условие че тяхната употреба редовно се преоценява. Емпирично прилагане на антибиотици не се препоръчва при пациенти с леки форми на COVID-19. При необходимост, определихме ползите на алтернативни антибиотици като clarithromycin, moxifloxacin и meropenem за пациенти с COVID-19 според тежестта на заболяването. **Заключение:** Свръхупотребета на антибиотици при болните с COVID-19 може да направи лечението на бактериалните инфекции в близко бъдеще трудно и понякога невъзможно. При пациенти с леки клинични форми на COVID-19 инфекция, с изключение на най-рисковите и най-възрастните пациенти, не се препоръчват антибиотици. За определени групи болни с бактериална суперинфекция, може да се включат clarithromycin, moxifloxacin или meropenem. Когато се налага, антибиотичната терапия трябва да се преразглежда ежедневно и да се дезескалира, или спре, ако няма клинични или микробиологични данни за бактериална инфекция. Важно е лечението да се адаптира според микробиологичните резултати. Изборът трябва да бъде от по-широкоспектърни към по-тясноспектърни антибиотици според чувствителността на бактериалните причинители.

Ключови думи: COVID-19, множествена резистентост, антибиотици

**Проф. д-р Людмила Боянова, дмн**
**Катедра медицинска микробиология, Медицински университет-София**
**Телефон: 02 91 72 730**
**Е-мейл: l.boyanova@hotmail.com**

## USE OF ANTIBIOTICS IN PATIENTS WITH CONFIRMED COVID-19 INFECTION. CONSENSUS OF THE EXPERT COUNCIL ON MICROBIOLOGY AT BAM

Lyudmila Boyanova[1], Grozdanka Lazarova[2]
[1]Department of Medical Microbiology, Medical University of Sofia, Zdrave street 2, 1431 Sofia, Bulgaria
[2]Department of Microbiology and Parasitology, Thrakiacian University-Stara Zagora, Bulgaria

**Aim:** The aim of the study was to analyze antibiotic use in patients with COVID-19 and to offer alternative antibiotics according to the severity of the infection. **Materials/Methods:** The frequency of bacterial coinfections in patients with COVID-19, the use and guidelines for the use of antibiotics in 4 groups of patients according to the clinical picture were analyzed and recommendations for alternative antibiotics were made in cases where necessary. **Results:** Bacterial coinfections with COVID-19 develop in an average of about 7% of patients. In a COVID-19 pandemic, the use of antibiotics and other antimicrobial drugs should be considered as part of an empirical strategy for treatment of the more severe suspected or confirmed cases of COVID-19, provided that their use is regularly reassessed. Empirical administration of antibiotics is not recommended in patients with mild COVID-19 infections. Where appropriate, we determined the benefits of alternative antibiotics such as clarithromycin, moxifloxacin and meropenem in groups of patients with COVID-19 according to the severity of the disease. **Conclusion:** Overuse of antibiotics in patients with COVID-19 can make the treatment of bacterial infections difficult and sometimes impossible in the near future. Antibiotics are not recommended in patients with mild clinical forms of COVID-19 infection, except in the most at-risk and elderly patients. For certain groups of patients with bacterial superinfection, clarithromycin, moxifloxacin or meropenem may be included. When necessary, antibiotic therapy should be reassessed each day and de-escalated, or discontinued if there is no clinical or microbiological evidence of bacterial infection. It is important to adapt the treatment according to the microbiological results. The choice should be from broad-spectrum to narrower-spectrum antibiotics according to the susceptibility of bacterial agents.

**Keywords: COVID-19, multidrug resistance, antibiotics**

## АНАЛИЗ НА ВЪВЕДЕНИТЕ И РАЗПРОСТРАНЕНИ SARS-COV-2 ВАРИАНТИ В БЪЛГАРИЯ ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА ЦЕЛОГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНЕ ОТ НОВО ПОКОЛЕНИЕ

Ивайло Алексиев, Иван Иванов, Ива Филипова, Савина Стоицова, Иван Стойков, Деян Дончев, Ренета Димитрова, Любомира Григорова, Анна Ганчева, Нели Корсун, Ивелина Трифонова, Веселин Добринов, Илияна Григорова и Тодор Кантарджиев

Национален център по заразни и паразитни болести, София, България

**Ключови думи**: секвениране, SARS-CoV-2, пандемия

**Цел:** Пандемията от COVID-19 е причинена от нововъзникналия коронавирус SARS-CoV-2. В момента SARS-CoV-2 е повсеместно разпространен в целия свят и доведе до безпрецедентна пандемия, свързана с предизвикателства пред националните здравни системи, социалните системи и глобалната икономика. Целта на проучването е да се анализират въведените и разпространени SARS-CoV-2 варианти в България чрез използване на целогеномно секвениране от ново поколение (ЦСНП).

**Материали и методи:** Клинични проби от лица с COVID-19 от различни региони на страната и от различни времеви периоди от началото на пандемията бяха избрани за национално представително проучване. ЦСНП беше извършено чрез ампликоново секвениране с модифицирана версия на ARTIC v3 с и с използването на секвенатор MiSeq System - Illumina. За получаването на консенсусни секвенции и за дефиниране на вирусните варианти на SARS-CoV-2 бяха използвани най-съвременни софтуерни и биоинформационни методи за анализ.

**Резултати:** Нашето проучване установи, динамично разпространение на различни варианти на SARS- CoV-2 са в различните региони на страната още от началото на пандемията. Идентифицирани са бързо разпространяващи се варианти с повишено значение за общественото здраве, включително алфа (B.1.1.7), бета (B.1.351) и делта (B.1.617.2). Открити са различни мутации, улесняващи взаимодействията между вирусния S протеин и клетъчния рецептор, което води до ускорено разпространение, променена вирулентност и имуногенност.

**Изводи:** Бързото разпространение на SARS-CoV-2 и особено на варианти с повишено значение за общественото здраве е свързано с ускорено вълнообразно развитие на пандемията от COVID-19. Наблюдението на вариантите на SARS-CoV-2, чрез ЦСНП се препоръчва от СЗО и ECDC и е от голямо значение за предприемането на целенасочени действия за ограничаване на пандемията.

**Благодарности:** Проучването е финансирано по проект от Министерството на образованието и науката (договор: КП-06-Н43/1 27.11.2020) 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, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“.

## ANALYSIS OF THE INTRODUCED AND DISSEMINATED SARS-COV-2 LINEAGES IN BULGARIA BY USING WHOLE GENOME NEXT GENERATION SEQUENCING

Ivailo Alexiev, Ivan Ivanov, Ivva Philipova, Savina Stoitsova, Ivan Stoykov, Deyan Donchev, Reneta Dimitrova, Lubomira Grigorova, Anna Gancheva, Nelly Korsun, Ivelina Trifonova, Veselin Dobrinov, Iliana Grigorova and Todor Kantardjiev

National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

**Keywords:** sequencing, SARS-CoV-2, pandemic

Aim

The emerging coronavirus SARS-CoV-2 has caused an unprecedented pandemic of COVID-19 associated with challenges to the national health and social systems and the global economy. The aim of the study was to analyze introduced and disseminated SARS-CoV-2 lineages in Bulgaria by using whole genome next generation sequencing (WGNGS).

Materials and Methods

Samples from individuals with COVID-19 from different regions of the country and from different time frames after the onset of the pandemic were selected for a national representative study. WGNGS was performed by using modified version of the ARTIC v3 tailed-amplicon sequencing with MiSeq System – Illumina. State-of-the-art software and bioinformatics methods for analysis were used to obtain consensus sequences and define SARS-CoV-2 lineages.

Results

A variety of SARS-CoV-2 lineages have been introduced in different regions of the country since the beginning of the pandemic. Rapidly expanding variants of concern have been identified, including alpha (B.1.1.7), beta (B.1.351) and delta (B.1.617.2). Various mutations that facilitate virus – receptor interactions have been found.

Conclusions

The rapid spread of SARS-CoV-2 and especially of variants of concern is associated with accelerated wave-like development of the COVID-19 pandemic. The monitoring of SARS-CoV-2 lineages is recommended by the WHO and ECDC and is of great importance for targeted actions by public health authorities to limit the pandemic.

**Acknowledgments:** The study was supported by the by a grant from the Ministry of Education and Science, Bulgaria (contract: КП-06-Н43/1 27.11.2020); 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".

## SARS-COV-2-СПЕЦИФИЧЕН Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР ПРИ ВАКСИНИРАНИ ЛИЦА

Яна Тодорова[1], Радослава Емилова[1], Ива Христова[2], Татяна Червенякова[3], Веселина Колева[4], Мария Николова[1]

[1] *НРЛ по Имунология, Национален център по заразни и паразитни болести, София*

[2] *НРЛ по Вектор-предавани инфекции, НЦЗПБ, София*

[3] *СБАЛИПБ „проф. Иван Киров“, София*

[4] *Аджъбадем Ситиклиник МБАЛ Токуда, София*

**Въведение:** Т-клетъчният имунен отговор ограничава и елиминира острите вирусни инфекции и способства формирането на трайна имунна памет, предотвратяваща реинфекции. Стратегическа цел на имунизацията срещу SARS-CoV-2 е генериране на ефекторни и паметови вирус-специфични Т-лимфоцити.
**Цел:** Характеризиране на SARS-CoV-2 специфичния Т-клетъчен имунен отговор при лица, имунизирани с регистрираните в България ваксинални препарата: Comirnaty (Pfizer/Biontech) и Vaxzevria (Oxford/AstraZeneka).
**Материали и методи:** Изследвани са мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMC) на лица, имунизирани с Comirnaty (n=49) и с Vaxzevria (n=18). Вирус- специфичният Т-клетъчен отговор е определен 55 и 110 дни след прилагане на първата доза по броя IFN-γ продуциращи клетки (SFC/$10^6$ PBMC) след 16 часова *in vitro* стимулация с пептиди от SASR-CoV-2 S-протеин (T-SPOT.COVID,Oxford Immunotech), предхождана при ограничен брой проби от 5-дневна стимулация със SASR-CoV-2 пептиди и IL-2.
**Резултати:** SARS-CoV-2-специфични IFN-γ+T лимфоцити след имунизация с Comirnaty се установиха при 87% от изследваните на 55 ден (средно 176 SFC/$10^6$ PBMC). С положителен/граничен резултат преди втората доза, (21-ви ден) бяха 40% от изследваните (средно 186 SFC/$10^6$ PBMC), а на 110-ти ден -57% (111 SFC/$10^6$ PBMC). При имунизираните с Vaxzevria резултатите бяха 62% (124 SFC/$10^6$ PBMC) на 60-ти и 65% (средно 173 SFC/$10^6$ PBMC) на 110 ден. След дългосрочно стимулиране 100% от негативните на 110-ти ден проби дадоха положителен резултат за наличие на SARS- CoV-2 IFN-γ+T.
**Заключение:** SARS-CoV-2 специфичните ефекторни Т-клетки достигат максимум след завършен цикъл на имунизация, след което нивата им в периферната кръв намаляват и не са показателни за наличието на протективен имунитет. Доказването на SARS-CoV-2 паметови Т-клетки изисква различни условия на стимулация и не се препоръчва за рутинна оценка на ефекта от имунизация.
***Благодарности:*** *Това проучване е извършено с подкрепата на Европейския фонд за регионално развитие чрез ОП „Наука и образование за интелигентен растеж“, договор BG05M2OP001-1.002-0001-C04 „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“ и Сдружение “Българско дружество по инфекциозни болести”*

**Ключови думи:** SARS-CoV-2, Т-клетъчен отговор, ELISPOT

За кореспонденция:
проф. д-р Мария Николова, дмн НРЛ по имунология, НЦЗПБ
e-mail: mstoimenova@ncipd.org

## POST-VACCINAL SARS-COV-2-SPECIFIC T-CELL IMMUNE RESPONSE

Yana Todorova[1], Radoslava Emilova[1], Iva Christova[2], Tatyana Tchervenyakova[3], Veselina Koleva[4], Maria Nikolova[1]

[1] *NRL of Immunology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria*

[2] *NRL of Vector-borne Infections, NCIPD, Sofia*

[3] *Specialized Hospital for Active Treatment of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia*

[4] *Acibadem City Clinic Tokuda Hospital, Sofia*

**Background.** T-cell immune response restricts and eliminate acute viral infections and potentiates formation of long-lasting immune memory preventing reinfection. The strategic aim of immunization against SARS-CoV-2 is the generation of effector and memory virus- specific T-cells.

**Aim** Characterization of SARS-CoV-2 specific T-cell immune response in volunteers immunized with one of the COVID-19 vaccines registered in Bulgaria: Comirnaty (Pfizer/Biontech) or Vaxzevria (Oxford/AstraZeneka).

**Material and methods.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from volunteers immunized with Comirnaty (n=49) and individuals, immunized with Vaxzevria (n=18) were studied. Virus-specific T-cell response was evaluated 55 and 110 days after the first dose according to the number of IFN-γ producing cells (SFC/$10^6$ PMNC) after 16-hour *in vitro* activation with peptides from SASR-CoV-2 S-protein (T-SPOT.COVID, Oxford Immunotech); in a restricted number of samples the final activation was preceded by 5-day stiumlation in the presence of SASR-CoV-2 peptides plus IL-2 ($10^4$ IU/ml).

**Results.** After immunization with Comirnaty, SARS-CoV-2-specific IFN-γ+T cells were established in 87% of the samples on day 55 (mean 176 SFC/$10^6$ PBMC). A positive/borderline result just before the second dose (day 21) was established in only 40 % of the studied samples (mean 186 SFC/$10^6$ PBMC), and on day 110 – in 57% (mean 111 SFC/$10^6$ PBMC). After one dose Vaxzevria, 62% of the studied samples were positive on day 55 (124 SFC/$10^6$ PBMC) and 65% (173 SFC/$10^6$ PBMC) – on day 110. Noteworthy, after a long-term stimulation 100% from the negative samples studied on day 110 were positive for SARS-CoV-2 IFN-γ+T cells.

**Conclusions**. SARS-CoV-2 specific effector T-cells reach a maximum only after a complete vaccination cycle; further on they disappear from peripheral blood, and are not indicative of the presence of protective immunity. Detection of SARS-CoV-2 memory T-cells requires different stimulation conditions, and is not recommended for routine evaluation of vaccine efficacy.

***Acknowledgement*: *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 "Fundamental Translational and Clinical Investigations on Infections and Immunity" and Association Bulgarian Society of Infectious Diseases"*

**Key words:** SARS-CoV-2, T-cell response, ELISPOT

Corresponding author:

Prof. Maria Nikolova, MD, DSc
NRL of Immunology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases e-mail: mstoimenova@ncipd.org

## ХУМОРАЛЕН И Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНИТЕТ ШЕСТ МЕСЕЦА СЛЕД ПРЕБОЛЕДУВАНЕ ОТ COVID-19 И ВАКСИНАЦИЯ СРЕЩУ SARS-COV-2: ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ

М. Божкова[1,2], Й. Калчев[1,2], Г. Ленгерова[1,2]. М. Калчева[1,2] , Х. Тасков[1,2], М. Мурджева[1,2]

Катедра Микробиология и имунология, Медицински университет – Пловдив
Научно-изследователски институт, Медицински университет – Пловдив

**Цел:** Да се направи оценка и сравнение на хуморалния и клетъчния имунитет шест месеца след преболедуване на COVID-19 и след имунизация срещу SARS-CoV-2.
**Материали и методи:** Включени са общо 40 лица: 17 преболедували, 15 ваксинирани (Pfizer-BionTech) и 8 здрави контроли. IgG антителата срещу S1 RBD на SARS-CoV-2 са изследвани с VIDAS® SARS-CoV-2, а вируснеутрализиращите антитела с SARS- CoV-2 sVNT кит на GenScript. Клетъчният имунитет е определен чрез T-spot.COVID.
**Резултати:** Шест месеца след преболедуване при 15 от 17 случая (88.2%) се откриват IgG над референтната граница, а след имунизация при 12 от 15 случая (73.3%). Средните стойности на IgG не се различават съществено в групите на преболедувалите и ваксинираните (8.24; SD=8.14 срещу 9.04; SD=6.51; p=0.79). При преболедувалите при 8 от 15 случая (53.3%) IgG са под 5 единици, докато в групата имунизирани ниски стойности под 5 единици са отчетени само при 1 от 12 случая (8.3%). Средните стойности на процента на инхибиция на свързването с RBD при преболедувалите не се различават съществено от тези при имунизираните (73.18%; SD=20.7 срещу 73.56%; SD=18.3; p=0.96). При преболедувалите неутрализиращи антитела се откриват при 15 от 17 случая (88.2%) срещу 86.7% (13 от 15 случая) при имунизираните. T-ELISPOT е
положителен при 15 от 17 случая (88.2%) от преболедувалите срещу 13 от 15 (86.7%) от имунизираните. Дискордантни резултати между антитела и специфични Т-клетки са установени в два случая: един при преболедувалите и един при имунизираните.
**Заключение:** Проучването показва висока степен на корелация между стойностите на специфичните антитела срещу SARS-CoV-2, процента на инхибиция на неутрализиращи антитела и наличието на специфични Т-клетки 6 месеца след преболедуване от COVID-19 и 6 месеца след ваксинация. Резултатите за специфичните антивирусни антитела демонстрират по-висока хомогенност 6 месеца след ваксинация, като групирането им е в по-високите стойности на скалата.
**Ключови думи:** COVID-19, COVID ваксина, IgG антитела, T-ELISPOT

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

## HUMORAL AND T-CELL MEDIATED IMMUNITY SIX MONTHS AFTER RECOVERY FROM COVID-19 AND VACCINATION AGAINST SARS-COV-2: A PILOT STUDY

M. Bozhkova[1,2], Y. Kalchev[1,2], G. Lengerova[1,2], M. Kalcheva[1,2], H. Taskov[1,2], M. Murdjeva[1,2]
Department of Microbiology and Immunology, Medical University - Plovdiv
Research Institute, Medical University - Plovdiv

**Aim:** To evaluate and compare humoral and cell-mediated immunity at six months after recovery from COVID-19 and after vaccination against SARS-CoV-2.
**Materials and methods:** A total of 40 people were included in the study: 17 recovered patients, 15 vaccinated (Pfizer-BionThech), and 8 healthy controls. IgG antibodies against S1 RBD of SARS-CoV-2 were tested 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.
**Results:** Six months after recovery specific IgG antibodies were detected above the reference threshold in 15 of 17 cases (88.2%), and in 12 of 15 cases (73.3%) after immunization. Mean IgG values did not differ significantly between the groups of recovered and vaccinated (8.24; SD = 8.14 vs. 9.04; SD = 6.51; p = 0.79). In the recovered group IgG antibodies were below 5 units in 8 out of 15 cases (53.3%), while in the group of vaccinated low value below 5 units was found only in 1 of 12 cases (8.3%). Mean values of the percentage of RBD binding inhibition did not differ significantly between recovered and vaccinated groups (73.18%; SD
= 20.7 vs. 73.56%; SD = 18.3; p = 0.96). In recovered patients neutralizing antibodies were found in 15 of 17 cases (88.2%) against 86.7% (13 of 15 cases) in vaccinated. T-ELISPOT
was positive in 15 of 17 cases (88.2%) in the recovered group, compared to 13 of 15 (86.7%) of those vaccinated. Discordant results between specific antibodies and specific T cells have been found in two cases: one in recovered and one in the vaccinated group.
**Conclusion:** The study showed a high degree of correlation between the values of specific anti-SARS-CoV-2 antibodies, the percentage of inhibition of neutralizing antibodies, and the presence of specific T cells 6 months after COVID-19 and 6 months after vaccination. The results for specific antiviral antibodies show higher homogeneity 6 months after vaccination and cluster into higher scale values.
**Keywords**: COVID-19, COVID vaccine, IgG antibodies, T-ELISPOT

## ПОЯВА НА COVID-19 СИМПТОМИ ПРИ 1044 ПАЦИЕНТИ С ПОЛОЖИТЕЛЕН РЕЗУЛТАТ ЗА ТРИ ГЕНА НА SARS-COV-2

М. Средкова[1], Ц. Попов[1,2], А. Попова[1,2], Р. Могилска[1], В. Делчева[1], П. Тончев[3], Г. Големанов[1], В. Нанков[1], А. Блажев[1], Е. Кутева[1]
Вирусологична лаборатория, МУ-Плевен
Медицински център „Клиничен институт за репродуктивна медицина"- Плевен
Катедра "Сестрински хирургични грижи", МУ-Плевен

**Цел:** Да се опишат клиничните характеристики при 1044 пациенти, които са били с положителен резултат за три гена на SARS-CoV-2, и да се анализира манифестацията на различни симптоми в интервала от нулевия до десетия ден от първата поява на суспектни симптоми за COVID-19 .
**Материали и методи**: Извършен е ретроспективен анализ на данни, получени в деня на вземане на материала за изследване от 1044 пациенти, които са с положителен резултат за SARS-CoV-2. Селекцията на пациентите е извършена въз основа на два критерия: наличие на симптоми за COVID-19 и положителен резултат едновременно за три гена на SARS- CoV-2. Вирусната нуклеинова киселина се изолираше мануално и чрез автоматизирана екстракционна система. RdRp, N и E гените се доказваха чрез RT-PCR с търговски кит.
**Резултати:** От всички 1044 пациенти с положителен резултат за RdRp, N и E гените на SARS-CoV-2, 499 (47,8%) бяха жени и 545 (52, 2%) мъже. Средната възраст беше 56,7 години и по-възрастната (>50 години) популация съставляваше 71,6% от всички пациенти. Най-честите симптоми, съобщени от пациентите при вземането на материала за изследване, бяха фебрилитет (74,7%), кашлица (67,2%), диспнея, (39,6%) и пневмония (35,7%). Фебрилитетът и кашлицата бяха водещи симптоми при всички пациенти в интервала от нулевия до десетия ден от началото на поява на симптомите. По-редки симптоми бяха ринорея (28,8%), болки в гърдите (23,7%) и липса на апетит (13,4%). Липсата на вкус и обоняние беше съобщена от 8,5% от пациентите. В това проучване 39,9% от SARS-CoV-2 положителните пациенти бяха с коморбидни заболявания, включващи сърдечно-съдови заболявания (22,6%), диабет (5,8%) и белодробни заболявания (5,5%). В популацията с диспнея и пневмония, пациентите със сърдечно- съдови заболявания бяха, съответно 57,1% и 53,9%.
**Заключение:** Анализът на клиничните характеристики на SARS-CoV-2 положителните лица показва, че грипоподобните симптоми, като фебрилитет и кашлица, са водещи симптоми при мнозинството от пациентите в интервала от нулевия до десетия ден от появата на инфекцията. Следователно, целесъобразно е да да се разшири RT-PCR тестването при всички лица със симптоми от респираторния тракт, за да се идентифицира COVID-19 инфекцията.
**Ключови думи:** SARS-CoV-2, COVID-19 симптоми, поява

## OCCURRENCE OF COVID-19 SYMPTOMS IN 1044 PATIENTS WHO WERE POSITIVE FOR THREE SARS-COV-2 GENES

M. Sredkova[1], C. Popov[1,2], A. Popova[1,2], R. Mogilska[1], V. Delcheva[1], P. Tonchev[3], G. Golemanov[1], V. Nankov[1], A. Blazhev[1], E. Kuteva[1]
Laboratory of Virology, Medical University-Pleven
Clinical Institute for Reproductive Medicine, CIRM-Pleven
Department of Surgical Nursing, Medical University-Pleven

**Aim:** To describe clinical characteristics of 1044 patients positive for three SARS-CoV-2 genes, and to analyze manifestation of various symptoms in the interval from zero to tenth day of the first onset of COVID-19 symptoms.

**Materials and methods**: A retrospective analysis of data obtained on the day of specimen collection, from 1044 patients who were tested positive for SARS-CoV-2 was carried out. The main two criteria for selection of patients were: presence of COVID-19 symptoms and positive results for all three SARS-CoV-2 genes detected. Viral RNA was isolated manually and by automated RNA extraction system. RdRp, N and E genes were ascertained by RT-PCR assay using a commercial kit.
**Results**: Out of 1044 patients positive for RdRp, N and E genes of SARS-CoV-2, 499 (47,8%) were female and 545 (52,2%) were male. The mean age was 56.7 years and the elder (>50 years) population constituted 71.6% of all patients. The most common symptoms reported at the time of specimen collection were fever (74.7%), cough (67.2 %), dyspnea (39, 6%) and pneumonia (35, 7%). Fever and cough were leading in all patients in the interval of zero to tenth day since the onset of symptoms. Less common symptoms were rhinorrhea (28, 8%), chest pain (23, 7%) and loss of appetite (13,4%). Loss of taste and smell was reported by 8.5% of patients. In this study 39.9% of SARS-CoV-2 positive patients were with comorbidities, including cardiovascular diseases (22.6%), diabetes (5.8%) and pulmonary diseases (5.5%). In population with dyspnea and pneumonia, individuals with cardiovascular diseases were 57, 1% and 53, 9%, respectively.
**Conclusion**: In this study, analysis of clinical characteristics of SARS-CoV-2 positive individuals showed flu-like symptoms, such as fever and cough, as leading symptoms in the majority of patients during the time interval from zero to tenth day of the onset of infection. Therefore, it is prudent to extend RT-PCR testing to all individuals with symptoms of the respiratory system to identify COVID-19 infection.
**Key words**: SARS-CoV-2, COVID-19 symptoms, occurence

## КОРЕЛАЦИЯ МЕЖДУ ЕКСПРЕСИЯТА НА SARS-COV-2 ГЕНИТЕ И ПЕРИОДА СЛЕД ПОЯВАТА НА COVID-19 СИМПТОМИ ПРИ 1044 ПАЦИЕНТИ

Ц. Попов[1,2], Г. Големанов[1], В. Нанков[1], А. Блажев[1], П. Тончев[3], А. Попова[1,2], Р. Могилска[1], Е. Кутева[1], В. Делчева[1], М. Средкова[1]
Вирусологична лаборатория, МУ-Плевен
Медицински център „Клиничен институт за репродуктивна медицина"- Плевен
Катедра "Сестрински хирургични грижи", МУ-Плевен

**Цел:** Целта на нашето проучване беше да потърсим възможна зависимост между Cq
стойностите на qPCR анализа към дните след проявата на COVID-19 симптомите.
**Материали и методи:** Пациенската група включваше 1044 лица с положителен резултат за RdRp, N и E гени на SARS-CoV-2. Данните, отнасящи се до периода след появата на симптоми, бяха получени от въпросник, попълнен за всеки пациент при вземането на материал за изследване. Вирусната РНК се получаваше чрез мануална или автоматизирана екстракция, съгласно инструкциите на производителя. Детекцията на трите SARS-CoV-2 гени беше извършена с GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp kit.
**Резултати:** Отчетохме различия в експресията на RdRP, N и E гените в изследваната група. При сравняване на qPCR резултатите и данните, касаещи появата на симптомите, ние установихме обща тенденция. При изследваните пациенти в първите дни след появата на симптоми (0, 1, 2 или 3 ден) ние наблюдавахме по-ниски Cq стойности за всичките три гени в сравнение с останалите пациенти, специално тези, тествани по-късно (8, 9 или 10 ден). Ние също установеихме, че при трите тествани гена, Cq стойностите на RdRP бяха леко по-високи, отколкото при N и E гените. При използване на средните Cq стойности на трите гена, ние наблюдавахме сигнификантна разлика между ден 0 и дните 3-10, също така ден 1 беше статистически различен от дните 4-10, ден 2 от дните 4-10 и ден 3 в сравнение с дните 8-10.
**Заключение:** В нашето проучване ние намерихме корелация между експресията на SARS- CoV-2 гените и дните след проявата на COVID-19 симптомите. Нашите резултати показват, че вирусният товар (представен чрез Cq стойности) беше значително по-висок в първите дни на COVID-19 инфекцията, след което намалява до достигането им до плато.
**Ключови думи:** SARS-CoV-2 гени, Cq стойности, COVID-19 симптоми

## CORRELATION BETWEEN LEVELS OF GENE EXPRESSION OF SARS-COV-2 AND DAYS AFTER COVID-19 SYMPTOMS ONSET IN 1044 PATIENTS

C. Popov[1,2], G. Golemanov[1], V. Nankov[1], A. Blazhev[1] , P. Tonchev[3], A. Popova[1,2], R. Mogilska[1],
Kuteva[1], V. Delcheva[1], M. Sredkova[1]
Laboratory of Virology, Medical University-Pleven
Clinical Institute for Reproductive Medicine, CIRM-Pleven
Department of Surgical Nursing, Medical University-Pleven

**Aim:** The aim of our study was to search for potential correlation between the Cq data of qPCR and days after symptom onset of COVID-19.
**Materials and methods:** Patients cohort included 1044 individuals positive for RdRp, E and N genes of SARS-CoV-2. The data concerning the days after symptom onset were obtained from the questionnaire filled in for each patient during the specimen collection. Viral RNA was obtained by manual or automated extraction according to the manufacturer instructions. Detection of the three SARS-CoV-2 genes (RdRp, E and N) was carried out with GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp kit.
**Results:** We observed difference between RdRp, E and N-gene expression within the patient cohort. Comparing the qPCR results and the data related to the onset of symptoms, we found a common trend. In patients tested in the first days after symptom onset (0, 1, 2 or 3 day), we observed a lower Cq value for all three genes compared to the other patients, especially those tested in the later days (8, 9 or 10 day). We also found that among the three commonly tested genes, the Cq levels of RdRp were slightly higher than the N- and E-genes. Interestingly, when we used mean value to all three genes we found a significant difference between day 0 and day 3 to 10, similarly day 1 was significantly different from day 4 to 10, day 2 from day 4 to 10 and
day 3 from day 8 to 10.
**Conclusion:** In our study we found a correlation between the gene expression of SARS-CoV-2 and the days after the onset of COVID-19 symptoms and our data demonstrated that the viral load (represented by the Cq values) was significantly higher in the early stage of COVID-19 infection and then decreased as they reached a plateau.
**Key words**: SARS-CoV-2 genes, onset of COVID-19 symptoms

## ВЪТРЕБОЛНИЧЕН ВЗРИВ ОТ SARS-COV-2 В ОТДЕЛЕНИЕ ЗА КАРДИОЛОГИЧНО ИНТЕНЗИВНО ЛЕЧЕНИЕ (ОКИЛ) КЪМ ВТОРА МБАЛ СОФИЯ, ЕАД

Иванова Д, Йонова В., Микробиологична лаборатория, Втора МБАЛ София, ЕАД

**ЦЕЛ:** Разпространението на SARS-CoV-2 в лечебните заведения засяга както пациентите, така и здравните работници, както и институционалния капацитет за предоставяне на основни здравни услуги. Целта на нашето проучване беше да опишем и да анализираме вътреболничния взрив от COVID-19, регистриран през март 2021 г. В ОКИЛ към Втора МБАЛ София.
**МАТЕРИАЛИ/МЕТОДИ:** Беше извършено проучване на възникналия през месец март 2021г. вътреболничен взрив в ОКИЛ. Всички случаи бяха потвърдени с RT-PCR. За установяване на епидемиологична връзка беше извършен скрининг на SARS-CoV-2 RNA вариантите с мултиплекс RT-PCR.
**РЕЗУЛТАТИ:** За периода 11-25 март 2021 в ОКИЛ беше регистриран вътреболничен взрив на COVID-19, като от изследваните общо 47 лица бяха лабораторно потвърдени
10 случая на SARS-CoV-2 (6 медицински персонал и 4 хоспитализирани пациента). Първият потвърден случай беше на лекар в отделението, който в края на януари 2021г беше приключил имунизацията си за COVID-19. В рамките на един инкубационен период (14 дни) се регистрираха останалите случаи. Повечето от заразените лица нямаха изявена клиничната симптоматика и се лекуваха в къщи, но 3 от тях бяха преведени или хоспитализирани в COVID-19 отделението на болницата. С цел установяване на епидемиологична връзка беше направен скрининг за наличие на SARS-CoV-2 RNA, който установи основните за SARS-CoV-2 VOC202012/01 RNA вариант мутации (UK вариант).
**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Ежедневното тестуване на пациентите за SARS-CoV-2 в болничните звена е от съществено значение, особено в отделенията за интензивни грижи. PCR скринингът на безсимптомните случаи, особенно сред медицинския персонал, помогна за изясняване на модела на разпространение. Незабавната изолация, проследяване на контактните лица и противоепидемичните мерки бяха от съществено значение за ограничаване на взрива.

## NOSOCOMIAL OUTBREAK OF SARS-COV-2 IN CARDIOLOGICAL INTENSIVE CARE UNIT (CICU) OF SECOND MULTIPROFILE HOSPITAL FOR ACTIVE TREATMENT, SOFIA

Ivanova D., Yonova V.; Microbiology Laboratory, Second Multiprofile Hospital for Active Treatment, Sofia

**Objectives:** Dissemination of SARS-CoV-2 in healthcare facilities affects both patients and health-care workers, as well as the institutional capacity to provide essential health services. The goal of our survey is to describe and analyze the nosocomial outbreak registered in cICU of our hospital.
**Methods:** A study was conducted of the occurred in cICU nosocomial outbreak in March 2021. All cases were confirmed by RT-PCR. SARS-CoV-2 RNA variants were screened with RT-PCR multiplex to establish an epidemiological link.
**Results:** During 11-25 March 2021, a nosocomial outbreak of COVID-19 was registered in cICU, and of the total 47 people examined, 10 cases of SARS-CoV-2 were laboratory confirmed (6 medical staff and 4 hospitalized patients). The first confirmed case was of ward's medical staff (physician), who at the end of January 2021 had completed his immunization for COVID-19. The remaining cases were registered within one incubation period (14 days). Most of the infected individuals had no a significant clinical symptoms and were treated at home, but 3 of them were transferred or hospitalized in the hospital's COVID-19 ward. In order to establish an epidemiological link, a screening for SARS-CoV-2 RNA variants was performed, which identified the main for SARS-CoV-2 VOC202012 / 01 RNA variant mutations (UK variant).
**Conclusions:** In the hospital setting, daily patients surveillance for SARS-CoV-2 is essential, especially in ICU's. PCR screening of asymptomatic cases especially within medical staff helped clarify the pattern of spread. Immediate isolation, contact persons tracing, and large-scale epidemiological measures were important to containing outbreak.

## ВЛИЯНИЕ НА ВЪВЕДЕНИТЕ НЕФАРМАЦЕВТИЧНИ МЕРКИ ЗА ОГРАНИЧАВАНЕ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА COVID-19 ВЪРХУ ОБЩАТА ИНФЕКЦИОЗНА ЗАБОЛЯЕМОСТ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2020 Г.

Николай Богданов, Галин Каменов, Надежда Владимирова, Антоанета Минкова
Национален център по заразни паразитни болести

Пандемията от Ковид-19 и прилаганите за нейното ограничение нефармацевтични мерки (НФМ) повлияват разпространението и на другите заразни болести. Наблюдава се значителен спад в тяхното разпространение. Причината за тази промяна е многопластова, като се включват поведенчески, институционални, икономически и социални фактори. Целта на проучването е да сравни заболяемостта от някои респираторни и чревни инфекции през последните четири години (2017-2020 г.). и анализира въздействието на НФМ върху тяхното разпространение. Несъмнено влияние имат и други фактори, но намаленото бреме от заразните заболявания без Ковид-19 в резултат на НФМ е обнадеждаващо и бъдещото проследяване и анализи на данните ще осигурят по-голяма представа за дългосрочните ефекти при прилагането им. Комплексното провеждане на НФМ за ограничаване на разпространението на Ковид-19 намалява общата инфекциозна заболяемост. В допълнение, бъдещите оценки ще покажат дали ще настъпят фундаментални промени в борбата със заразните болести и поведението на хората.

**Ключови думи:** Ковид-19, инфекциозни болести, нефармацевтични мерки.

Лице за кореспонденция - д-р Николай Богданов, София 1504, бул. "Янко Сакъзов" 26, НЦЗПБ, ел. поща: nkbogdanov@ncipd.org, тел. 0888936217.

## INFLUENCE OF THE INTRODUCED NON-PHARMACEUTICAL MEASURES FOR LIMITING THE SPREAD OF COVID-19 ON THE INCIDENCE OF INFECTIOUS DISEASES IN BULGARIA IN 2020

Nikolay Bogdanov, Galin Kamenov, Nadezhda Vladimirova, Antoaneta Minkova National Center for Infectious and Parasitic Diseases

The COVID-19 pandemic and the non-pharmaceutical measures (NFM) used to limit it are also affecting the spread of other infectious diseases. There is a significant decline in their incidence. The reason for this change is multifaceted, including behavioral, institutional, economic and social factors. The aim of the study is to compare the incidence of some respiratory and intestinal infections in the last four years (2017-2020). and analyze the impact of NFM on their distribution. Undoubtedly, other factors have an impact, but the reduced burden of infectious diseases without COVID-19 as a result of NFM is encouraging and future monitoring and analysis of the data will provide a better idea of the long-term effects of their application. The complex implementation of NFM to limit the spread of COVID-19 reduces the overall infectious morbidity. In addition, future assessments will show whether there will be fundamental changes in the fight against communicable diseases and human behavior.

**Key words:** COVID-19, infectious diseases, non-pharmaceutical measures.

# ДЕМОГРАФСКИ ПОСЛЕДСТВИЯ ОТ КОВИД КРИЗАТА В БЪЛГАРИЯ

Владимир Толчков

Национален център по заразни и паразитни болести, София, България

**Ключови думи**: пандемия, COVID-19, демографски последствия

**Цел:** Пандемията, причинена от SARS-CoV-2 доведе до коренна промяна в начина на живот в целия свят, в това число и в България, явявайки се голямо предизвикателство пред икономиката, политиката, здравната система и всички сфери от ежедневието. Целта на настоящото проучване е да се определи въздействието на разпространението на COVID-19 в България върху основните демографски показатели в страната.

**Материали и методи:** Събрани са, обобщени и анализирани официални данни от държавни институции и научни организации (основно НСИ и МЗ) за развитието на епидемиологичната обстановка в страната и основните демографски показатели като раждаемост, смъртност и миграция, по време на пандемията и преди нея, показано е влиянието на разпространението на коронавируса върху тях.

**Резултати:** Проучването установи следните демографски рекорди през 2020 година, следствие от възникналата тогава пандемия, считано от Освобождението на България през 1878 година: 1 – минимален брой родени деца - 59 086; 2 – максимален брой починали – 124 735; 3 – за пръв път от тогава смъртността превишава раждаемостта повече от два пъти; 4 – след десетилетия отрицателно миграционно салдо през 2020 е отчетен най- високия механичен прираст на население – 30 715 души, почти наполовина покриващ огромното превишаване на смъртността над раждаемостта; 5 – Населението на София и повечето по-големи в процентно отношение намалява с няколко пъти по-бързи темпове, отколкото населението на България като цяло. Наблюдават се наченки на субурбанизация

**Изводи:** Кризата, причинена от COVID-19 има драстични последствия върху демографското развитие, които следва да се наблюдава и анализира при планиране на всички дейности в стопанската, социалната, здравната и други сфери, засегнати от промяната в броя на населението и неговото териториално преразпределение.

## DEMOGRAPHIC CONSEQUENCES OF COVID CRISIS IN BULGARIA

Vladimir Tolchkov

National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

**Key words**: pandemic, COVID-19, demographic consequences

**Aim:** Pandemic caused by SARS-CoV-2 led to dramatic change of human life in Bulgaria and worldwide being huge challenge for the economy, politics, health system and all aspects of everyday life. Aim of present study is to estimate influence of the COVID-19 in Bulgaria on general demographic indicators in the country.

**Materials and Methods:** Official data about main demographic indicators such as birth and death rate and migration during the pandemic and before of state institutions and scientific organizations (mainly National Statistical Institute and Health Ministry) are collected summarized and analyzed influence of spread of the coronavirus is shown.

**Results:** Present investigation found the follow demographic records in 2020 as a result of the pandemic since the liberation of Bulgaria in 1878: 1 – minimal number of newborns - 59 086; 2 – maximal number of deaths – 124 735; 3 – first time the death rate is more than double that birth rate; 4 – after many decades of negative migration rate in 2020 is observed the highest grow of population as a result of migration, covering almost half of the exceeding of death over birth rate
– 30 715 people; 5 – Population decrease rate of Sofia and other big cities is several times higher than all population of Bulgaria. First beginnings of suburbanization are observed.

**Conclusions:** The crisis caused by COVID-19 led to dramatic changes on the demographic development which have to be observed and analyzed to plane all activities in the economic, social, health and other fields affected of the change in the number of the population and its territorial spread.

# Сесия IV

## АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА ИЗОЛАТИ ОТ ПАЦИЕНТИ ОТ УМБАЛ:“ПРОФ. Д-Р СТ.КИРКОВИЧ“ АД С ДОКАЗАНА COVID-19 ИНФЕКЦИЯ ЗА ПЕРИОД ОТ 1.03.2020 ДО 1.08.2021 Г.

С.Исенджик[1], П.Георгиева[1], Д.Руканова[2], Х.Дженева[2], Г.Лазарова[1]
[1] УМБАЛ:“Проф.д-р Ст.Киркович“ , Стара Загора[2], МФ-ТУ, Стара Загора

**Цел**: Да се проучи етиологичната структура и антимикробната резистентност на изолати от пациенти с потвърдена COVID-19 инфекция.
**Материали и методи :** Анализирани са данни от всеки първи изолат от различни материали : бронхоалвеоларен лаваж, трахеобронхиални секрети, хемокултури, пунктати и др. Идентификацията на изолатите е извършена с конвенционални и полуавтоматизирани методи. Антибиотичната резистентност на изолатите е определяна с фенотипни методи.
**Резултати** : Изследвани са общо 215 материала от 162 пациенти . Анализирани са данните за идентификация и антимикробна резистентност на общо 123 изолата. Етиологичната структура показва , че 40 % са инфекции от МРБ (множествено резистентни бактериални изолати ) и 60 % са причинени от *Candida spp.* Сред общо 45 бактериални изолата преобладават Gram (-) бактерии – 85% ( 38/45) , сред които най-често се изолира *A.baumannii* - 63% (24/38) , *Enterobacterales* -26% (10/38) , други *GNNF*- 11%. От Грам(+) бактерии най- често се изолират *Enterococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* 60 % от всички изолати принадлежат към Candida spp. , предимно C.albicans ( 65 %) . Резултатите от антибиотичната резистентност показват , че 90% от *A.baumannii* са МРБ , чувствителни само на *Colistin,* други – чувствителни на *Colistin* и *Tobramycin.* Повече от 50% от *Enterobacterales* са продуценти на ESBLs. Не са установени Carbapenemases (+) *Enterobacterales* . От Enterococcus spp. изолатите, преобладават щамове с HLAR ( високо ниво на аминоглюкозидна резистентност) .
**Заключение** : Липсата на правила и консенсус за употреба на антибиотици при хоспитализирани болни с потвърдена COVID-19 инфекция , включително и профилактично, доведе до ръст на бактериалните инфекции и инфекциозни усложнения от множествено резистентни щамове и микотични инфекции. Необходимо е широко обсъждане и анализ на наличните предложения за употреба на антибиотици при пациенти с COVID-19 инфекция.

***Ключови думи*** : множествена резистентност, COVID-19 инфекция.

## ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ISOLATES FROM PATIENTS FROM UMHAT: "PROF. DR. ST. KIRKOVICH AD WITH PROVEN COVID-19 INFECTION FOR THE PERIOD FROM 1.03.2020 TO 1.08.2021.

S.Isendzhik1, P.Georgieva1, D.Rukanova2, H.Dzheneva2, G.Lazarova1

1 University Hospital : "Prof. Dr. St. Kirkovich", Stara Zagora
2 Trakia University- Medical Faculty , Stara Zagora

**Objective:** To study the etiological structure and antimicrobial resistance of isolates from patients with confirmed COVID-19 infection.
**Materials and methods**: Data from each first isolate of different materials were analyzed: bronchoalveolar lavage, tracheobronchial secretions, blood cultures, punctures, etc. Identification of isolates was performed by conventional and semi-automated methods. The antibiotic resistance of the isolates was determined by phenotypic methods.
**Results**: A total of 215 materials from 162 patients were studied. The data for identification and antimicrobial resistance of a total of 123 isolates were analyzed. The etiological structure shows that 40% are infections of MDR (multidrug-resistant) bacterial isolates and 60% are caused by Candida spp. Among a total of 45 bacterial isolates, Gram (-) bacteria predominate - 85% (38/45), among which *A.baumannii* is most often isolated - 63% (24/38), *Enterobacterales* -26% (10/38), others GNNF ( Gram negative non-fermentative) - 11%. *Enterococcus spp*. was most often isolated from Gram (+) bacteria. ,followed by *Staphylococcus spp.* 60% of all isolates belong to *Candida spp.* , mainly *C. albicans* (65%). The results of antibiotic resistance show that 90% of *A. baumannii* are MDR, sensitive only to *Colistin,* or to *Colistin* and *Tobramycin*. More than 50% of *Enterobacterales* are producers of ESBLs. No Carbapenemases (+) positive *Enterobacterales* have been identified. Among *Enterococcus* spp. isolates, HLAR strains (high level of aminoglycoside resistance) predominate.
**Conclusion**: The lack of rules and consensus for the use of antibiotics in hospitalized patients with confirmed COVID-19 infection, including for prevention, has led to an increase in bacterial infections and infectious complications from multiple resistant strains and fungal infections. There is a need for extensive discussion and analysis of available proposals for the use of antibiotics in patients with COVID-19 infection.
Key words: multiple resistance, COVID-19 infection.

## АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ *MYCOPLASMA GENITALIUM* В ЕВРОПА И БЪЛГАРИЯ

Ива Филипова, Виктория Левтерова, Иван Симеоновски, Любомира Боянова, Зоя Иванова, Тодор Кантарджиев

Ключови думи: *Mycoplasma genitalium*, антибиотична резистентност, България

Въведение

Инфекциите с *Mycoplasma genitalium* засягат между 1,0 и 3,5% от сексуално активните хора от общата популация в Европа. Разпространението в България остава относително ниско (2.49%), но тежестта на тези заболявания не бива да се подценява. *M. genitalium* причиняват негонококов уретрит (НГУ) при мъжете и уретрит, цервицит, тазово възпалителна болест (ТВБ) и инфертилитет при жените. Понастоящем в Европа азитромицинът е средство на избор и в случаите когато това лечение е неуспешно, за терапия от втора линия се използват флуорохинолони.

Резултати и дискусия

В България и Европа е налице недостиг на данни за антибиотичната резистентност при *M. genitalium*, тъй като съществуващите системи за надзор не предоставят подобна информация. Резултатите от научноизследователските проучвания показват, че разпространението на макролидната резистентност бързо се увеличава в Европа, като в някои страни резистентните щамове надхвърлят 50%. Неуспешно лечение с азитромицин и резистентност към макролиди се наблюдава в 47.6 % от случаите в България. Въпреки че в Европа хинолоновата резистентност при *M. genitalium* все още представлява изключение, в единични доклади се съобщава за появата на резистентност достигаща до 5%. Тези данни подкрепят въвеждането на комбинирани изследвания за откриване както на *M. genitalium*, така и на генетични детерминанти за антибиотична резистентност. По този начин не само ще се оптимизира антибиотичната употреба, но и ще се контролира появата и разпространението на антибиотичната резистентност. Освен това, това проучване подкрепя необходимостта от провеждане на надзор антибиотичната резистентност при *M. genitalium* както на местно, така и на европейско ниво. При този сценарий са необходими по-нататъшни изследвания на нови антибиотици за борба с инфекциите с *M. genitalium*, които с евентуалната поява на мултирезистентни щамове могат да станат нелечими.

Благодарности:

Това проучване е финансирано от ФНИ по проект ДН13/5 от 15.12.2017 „Молекулярно- генетичен подход за подпомагане надзора на антибиотичната резистентност на гонорея и генитална микоплазмена инфекция“

## ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *MYCOPLASMA GENITALIUM* IN EUROPE AND BULGARIA

Ivva Philipova, Viktoriya Levterova, Ivan Simeonovski, Lyubomira Boyanova, Zoya Ivanova, Todor Kantardjiev

Keywords: *Mycoplasma genitalium*, antimicrobial resistance, Bulgaria Introduction

*Mycoplasma genitalium* infects between 1.0 and 3.5% of sexually active people in the general European population. The prevalence in Bulgaria remains relatively low (2.49%), but the severity of these diseases should not be underestimated. Infection with *M. genitalium* causes non-gonococcal urethritis (NGU) in men and urethritis, cervicitis, pelvic inflammatory disease (PID) and tubal factor infertility in women. In Europe, azithromycin is currently the preferred therapy and, when this treatment fails, fluoroquinolones are used for second-line therapy.

Results and discussion

In Bulgaria and Europe, there is a shortage of data on antibiotic resistance in *M. genitalium*, as existing surveillance systems do not provide such information. The results of research studies show that the prevalence of macrolide resistance is increasing rapidly in Europe, with resistance strains exceeding 50% in some countries. Azithromycin treatment failure and resistance to macrolides is observed in 47.6% of cases in Bulgaria. Although quinolone resistance in *M. genitalium* is still an exception in Europe, resistance of up to 5% has been reported in several studies. These findings call for the use of combined assays for detection of *M. genitalium* and antimicrobial resistance genotypic markers in order to optimize antimicrobial stewardship, and control the selection and spread of resistances. Additionally, this study supports the need to conduct representative and well-defined surveillance on antimicrobial resistance in *M. genitalium* at both local and European level. In this scenario, further investigations on new antibiotics are required to fight against *M. genitalium* that may soon become untreatable with the appearance of multidrug-resistant infections.

Acknowledgment

Supported by Research grant DN 13/5-15.12.2017, Bulgarian National Science Fund

# РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА РАЗЛИЧНИТЕ СЕРОТИПОВЕ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIA* В БЪЛГАРИЯ, КОЛОНИЗИРАЩИ НАЗОФАРИНКСА ПРИ ДЕЦА

В. Левтерова[1] , И. Симеоновски[1], Н. Бранкова[1], И. Филипова[1],З. Иванова[1], Л. Боянова[1], М. Малчева[2], Т. Кантарджиев[1]

[1] Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ)
[2] УМБАЛСМ "Н.И.Пирогов"

**Увод:** ***Streptococcus pneumoniae*** е един от често срещащите се причинители на заболявания, които са с глобално разпространение. По настоящем, на основата на химически различия в строежа на капсулните полизахариди, на пневмококите се причисляват вече над 100 серотипа. В България е въведена 10-валентна пневмококова конюгирана ваксина (PCV10). В периода 2011-2017 г., тя е била с над 90% покритие (оценка на СЗО и УНИЦЕФ за националните имунизации през 2010 г.). Ваксиналните серотипове (серотип 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F), които са най-чести причинители на инвазивни пневмококови заболявания, след ваксинация са изолирани с по – ниска честота при деца носители на пневмококи. В момента се наблюдава относително увеличение на честотата на носителство на неваксинални серотипове.

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

**Материали и методи:** Изследвани са общо 100 деца на възраст от 3 месеца до 5 години за период от 9 месеца. Те са изследвани културелно и чрез генетични методи. Вземаха се назофарингеални секрети с два тампона, един в среда eSwab (Copan, Italy) и един сух за изолиране на ДНК. Пробите бяха култивирани на агар Columbia CNA с 5% овча кръв, като се поставяше оптохинов диск, за да бъдат разграничени пневмококите от друга микробна флора. От сухите тампони беше паралелно изолирана ДНК и културелно отрицателните проби бяха подложени на скрининг с RT-PCR за наличие на пневмококова ДНК. Изолати, които бяха положителни по cpsA и lytA гени бяха типизирани чрез полимеразно верижна реакция и след това с алелна хибридизация за 75 серотипа.

**Резултати:** Носителство беше установено в голям процент от пробите. От директно изолираната ДНК бяха установени някои проби с повече от един серотип - два или с три серотипа/серогрупи, колонизиращи назофаринкса по едно и също време. Установено е преобладаващо носителство на два ваксинални серотипа - 4 и 23F и преобладаване на серотип 6C при неваксиналните серотипове.

**Заключение:** Проведените лабораторни изследвания в НРЛ „Молекулярна микробиология" показаха, че при деца до 5 годишна възраст в България има висок процент носителство, характеризиращо се основно с неваксинални серотипове. Колонизацията с ваксинални серотипове при деца е силно намаляла, но въпреки това остава налична десет години след въвеждането на PCV10 при не ваксинирани.

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

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

## DISTRIBUTION OF DIFFERENT SEROTYPES STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IN BULGARIA, COLONIZING THE NASOPHARYNX OF CHILDREN

V. Levterova[1], I. Simeonovski[1], N. Brankova[1], I. Filipova[1], Z. Ivanova1[1], L. Boyanova[1], M. Malcheva[2], T. Kantardzhiev[1]

1 National Center for Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)

2 UMBALSM "NI Pirogov"

**Introduction:** *Streptococcus pneumoniae* is one of the most common causes of diseases that are globally prevalent. Currently, based on chemical differences in the structure of capsular polysaccharides, pneumococci are already more than 100 serotypes.
A 10-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV10) has been introduced in Bulgaria. In the period 2011-2017, it had over 90% coverage (based on WHO and UNICEF data for national immunizations in 2010). Vaccine serotypes (serotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F), most common causes of invasive pneumococcal disease, were isolated with a lower incidence in children after vaccination. There is currently a relative increase in the number of non-vaccine serotypes.
**Objective:** The aim of this study was to investigate the circulating serotypes of Streptococcus *pneumoniae* in nasopharyngeal children carriers in Bulgaria vaccinated with PCV10.
**Materials and methods:**The research covered 100 children aged 3 months to 5 years for a period of 9 months. They have been tested culturally and by genetic methods. Nasopharyngeal secretions were taken with two swabs, one in eSwab medium (Copan, Italy) and one dry to isolate DNA. Samples were cultured on Columbia CNA agar with 5% sheep blood using an optochin disk to separate pneumococci from other microbial flora. DNA was isolated from the dry swabs. Culture-negative samples were screened by RT-PCR for pneumococcal DNA. The positive isolates for cpsA and lytA genes were typed by polymerase chain reaction and then by allelic hybridization for 75 serotypes.
**Results:** *S. pneumoniae* was detected in a large percentage of samples. From the directly isolated DNA, some samples were indentified with with more than one serotype - two or three serotypes / serogroups, colonizing the nasopharynx at the same time. There is a predominant carriage of two vaccine serotypes - 4 and 23F and serotype 6C in non-vaccine serotypes.
**Conclusion:** The tests in NRL "Molecular Microbiology" showed that in children up to 5 years of age in Bulgaria there is a high percentage of carriage, characterized mainly by non-vaccine serotypes. Colonization with vaccine serotypes in children has greatly decreased, but ten years after introduction of PCV10 still remains.
**Key words:** pneumococcal carriage, typing, PCV10
**Acknowledgment:** Supported by Research grant № КП-06Н43/4 от 30.11.2020г., Bulgarian National Science Fund

## НАЦИОНАЛНО СЕРОЕПИДЕМИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА НАЛИЧИЕ НА КОЛЕКТИВЕН ИМУНИТЕТ СРЕЩУ МОРБИЛИ И РУБЕОЛА, 2021 - ПЪРВОНАЧАЛНО ПРОУЧВАНЕ

Ст. Крумова[1], С. Стоицова[1], И. Андонова[1], Р. Стефанова[1], Н. Владимирова[1], Кр. Пармакова[2], епидемиолози от РЗИ[3]

[1]Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София, България

[2]Министерство на здравеопазването, МЗ, София, България

[3]Регионални здравни инспекции (РЗИ)

РЕЗЮМЕ

Морбили и рубеола са ваксинопредотвратими инфекции, чието значение като основна причина за заболяемост и смъртност в детската възраст не намалява в глобален мащаб. Дори и през първото десетилетие на 21 век, на фона на достигната ниска заболяемост, епидемични взривове на морбили и рубеола се регистрират в редица държави от Западна и Централна Европа. Основна причина за нетрайността на успеха при контрола на морбили и рубеола е недостатъчно високото имунизационно покритие

**ЦЕЛ:** Да се проучи наличието на колективен имунитет (доказване на специфични IgG антитела) срещу морбили и рубеола сред българското население през 2021 година.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ:** В настоящото изследване са включени 2719 серумни проби от лица във всички възрастови групи и региони на страната. Проучването е проведено във връзка с изпълнение на Национална програма за елиминация на морбили и рубеола в България (2019-2022). Използвани са имуноензимни (доказване на специфични морбилни и рубеолни IgG антитела чрез ELISA анализ) методи с цел определяне на ниво на защитен имунитет.

**РЕЗУЛТАТИ**: Сред изследваните 2719 пациенти, наличие на защитен имунитет срещу морбили е определен при 2418/2719 (89%), а срещу рубеола при 2462/2719 (91%). В изследването са включени 27 от 28-те области в страната, като процента серопозитивност по области е запазен. Към м. юни 2021 РЗИ София област не е изпратило проби.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Проблемите с имунизационния обхват сред определени групи от населението на европейския континент възпрепятстват постигането на целта на Стратегическия план на Световната здравна организация (СЗО) за елиминация на морбили и рубеола. Стриктното спазване на националните имунизационни програми, както и регулярната проверка за имунен статус, особено на рискови групи, са основна предпоставка за постигане на елиминационния процес.

**Ключови думи:** морбили, рубеола, ELISA IgG, елиминация

## NATIONAL SEROEPIDEMIC STUDY FOR THE PRESENCE OF COLLECTIVE IMMUNITY AGAINST MEASLES AND RUBELA, 2021 - PRELIMINARY STUDY

St. Krumova[1], S. Stoitsova[1], I. Andonova[1], R. Stefanova[1], N. Vladimirova[1], Kr. Parmakova[2], epidemiologists from RHI[3]

[1]National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia, Bulgaria

[2]Ministy of Health, Sofia, Bulgaria

[3]Regional Health Inspectorates (RHI)

ABSTRACT

Measles and rubella are vaccine-preventable infections whose importance as a major cause of morbidity and mortality in childhood is not declining globally. Even in the first decade of the 21st century, against the background of low morbidity, epidemic outbreaks of measles and rubella have been reported in a number of countries in Western and Central Europe. The main reason for the unsustainable success of measles and rubella control is the insufficiently high immunization coverage

**Aim:** The study aims to present of collective immunity (detected specific IgG antibodies) against measles and rubella among the Bulgarian population in 2021.

**MATERIALS AND METHODS:** The study included 2719 serum samples from individuals in

all age groups and regions of the country. The study was conducted in connection with the implementation of the National Program for the Elimination of Measles and Rubella in Bulgaria (2019-2022). Enzyme-linked immunosorbent assays (detection of specific measles and rubella IgG antibodies by ELISA analysis) were used to determine the level of protective immunity.

**RESULTS:** Among the 2719 tested patients, the presence of protective immunity against measles was determined in 2418/2719 (89%) and against rubella in 2462/2719 (91%). The study included 27 of the 28 districts in the country, and the percentage of seropositivity was preserved. As of June 2021, RHI Sofia District has not sent samples.

**CONCLUSION:** The goal of the World Health Organization (WHO) Strategic Plan for the Elimination of Measles and Rubella on the European Continent is hampered by problems with the immunization coverage among certain groups of the population. The main prerequisite for achieving the elimination process is the observance of the national immunization programs, as well as the regular check for immune status, especially of risk groups.

**KEY WORDS:** measles, rubella, ELISA IgG, elimination

# СЕСИЯ V

## ТЕЛЦАТА НА ХАЙНЦ ИМАТ ПРЕДПОЛАГАЕМ МИКРОБЕН ПРОИЗХОД

Стефан Панайотов[1], Борислава Цафарова[1], Йордан Ходжев[1],
Владимир Толчков[1], Рени Калфин[2]

1. Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. Институт по невробиология – БАН, София

**Въведение:** Телцата на Хайнц са открити в еритроцитите и описани от д-р Роберт Хайнц през 1890 година. Наблюдават се при хора с дефицит на G6PD и хемофилия. При животни може да се индуцира появата им при консумация на храна комбинирана с тиосулфати. Оцветяват се с метиленово синьо. Често се наблюдават при пациенти претърпяли спленектомия. Приемът на някои лекарства може да провокира появата на Хайнцови телца. Изследванията са показали, че това са хемоглобинови преципитати във и извън еритроцитите без това да е категорично. Природата на Хайнцовите телца е активно изучавана през 50те години на миналия век. След 1970 г. интересът към тях постепенно затихва.
**Хипотеза:** Цел на нашето проучване бе да изследваме хипотезата, че Хайнцовите телца имат предполагаем микробен произход.
**Материали:** Бяха ин витро получени Хайнцови телца при култивиране на 20 кръвни проби в глюкозен буфер с аминофенол, натриев тиосулфат, фенилхидразин хидрохлорид и менадион натриев бисулфит (витамин К3). Бе изолирана ДНК от чисти Хайнцови телца. Приложи се случайно (shotgun) метагеномно секвениране с дълбочина 140 милиона рида. Биоинформатичната обработка на резултатите включваше софтуерните продукти KRAKEN и други.
**Резултати:** Въпреки приложеният метод за максимално елиминиране на човешката ДНК от чистите култури от Хайнцови телца в част от пробите присъствието на секвенции от човешка ДНК бе значително >90%. Доказаните микробни видове принадлежат към типове Proteobacteria, Firmicutes и др. Експеримента бе повторен с цел да се изчисти методологията на получаване на Хайнцовите телца в чист вид, изолирането на ДНК, секвениране на пробите до 200 милиона рида и подобряване на биоинформатичния подход за анализ. Предстои завършване на експеримента и обработка на резултатите.
**Заключение:** Получените морфологични, генетични и биоинформатични резултати дават основание да се предположи, че Хайнцовите телца имат микробен произход. Необходими са допълнителни разширени изследвания, които да потвърдят изказаната хипотеза.
**Благодарности:** Изследването е финансирано от Национална научна програма „ВИХРЕН” и договор с Фонд „Научни изследвания” КП-06-ДВ/10 от 21.12.2019, ‘SARCOIDOSIS’

## HEINZ BODIES ARE OF SUPPOSED MICROBIAL ORIGIN

Stefan Panaiotov[1], Borislava Tsafarova[1], Yordan Hodzhev[1], Vladimir Tolchkov[1], Reni Kalfin[2]

1. National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria
2. Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

**Introduction:** Heinz's bodies were discovered in erythrocytes and described by Dr. Robert Heinz in 1890. They are observed in people with G6PD deficiency and hemophilia. In animals, their appearance can be induced when fed in combination with thiosulphates. Heinz‘s bodies are colored with methylene blue. They are commonly seen in patients who have undergone splenectomy. Taking certain medications can provoke the appearance of Heinz bodies. Studies have shown that Heinz bodies are hemoglobin precipitates inside or outside the erythrocytes, but not definitively. The nature of Heinz bodies was actively studied in the 1950s. After 1970, interest in them gradually waned.
**Hypothesis:** The aim of our study was to investigate the hypothesis that Heinz bodies have a presumed microbial origin.
**Materials:** Heinz bodies were obtained in vitro by culturing 20 blood samples in glucose buffer with aminophenol, sodium thiosulfate, phenylhydrazine hydrochloride and menadione sodium bisulfite (vitamin K3). DNA was isolated from pure Heinz bodies. Shotgun metagenomic sequencing with a depth of 140 million reads was applied. The bioinformatics processing of the results included the software products KRAKEN and others.
**Results:** Despite the applied method for elimination of human DNA from the pure cultures of Heinz bodies, in some of the samples the presence of human DNA sequences was significantly high > 90%. Proven microbial species belong to the phylum Proteobacteria, Firmicutes and others. The experiment was repeated in order to improve the methodology of isolation of Heinz bodies in pure form, isolation of DNA, sequencing the samples up to 200 million reads and improving the bioinformatics approach for analysis. The experiment is to be completed and the results processed.
**Conclusions:** The obtained morphological, genetic and bioinformatics results give grounds to assume that Heinz bodies have a microbial origin. Further extended research is needed to confirm this hypothesis.
**Acknowledgements:** This research was funded by the Bulgarian National Science Fund within National Science Program VIHREN, contract number KP-06-DV/10-21.12.2019.

# ТЕНДЕНЦИИ В ЕТИОЛОГИЧНАТА СТРУКТУРА И АНТИБИОТИЧНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ ИЗОЛАТИ ОТ ХЕМОКУЛТУРИ В ПЛОВДИВ, БЪЛГАРИЯ (2015-2020Г.)

Г. Ленгерова [1,2,3], Й. Калчев [1,2,3], В. Кирина [1,2], Р. Райчева [4], ММ. Петров [1,3], М. Мурджева [1,2,3]

1. Катедра по микробиология и имунология, Фармацевтичен факултет, Медицински университет - Пловдив
2. Лаборатория по Микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“- Пловдив
3. Научноизследователски институт на Медицински университет - Пловдив
4. Катедра Социална медицина и обществено здраве, Факултет по Обществено здраве, Медицински университет - Пловдив

**Въведение:** Познаването на честотата и етиологията на инфекциите на кръвта (BSIs) е важно за определяне на приоритетите в здравеопазването и научните изследвания, а също-и за вземане на ефективни мерки за превенция на BSIs, както на локално, така и на национално ниво.
**Цел:** Да се проучи текущото състояние и промените в етиологичната структура и антибиотичната резистентност на BSIs в университетската болница „Св. Георги”– Пловдив, България.
**Материали и методи:** Изследването е проведено в Катедрата по микробиология и имунология, МУ-Пловдив, за периода януари 2015 г. до август 2020 г. Всички хемокултури са култивирани в BactAlert 3D система (bioMerieux) и микроорганизмите са идентифицирани чрез рутинни биохимични методи, полу- автоматизирани и автоматизирани системи за микробна идентификация. Антимикробната чувствителност е определена чрез дисково-дифузионния метод на Bauer-Kirby и минимални потискащи концентрации (MIC) от автоматизираната система VITEK-2 Compact (bioMerieux).
**Резултати:** За изследвания период тествахме 10 173 кръвни култури, като 3166 (31,1%) от тях бяха положителни. Средногодишно в лабораторията постъпват 1695,5 хемокултури, а средното увеличение на получените материали е с 16,6%. Грам-положителните изолати (69%; n=182) преобладават над Грам-отрицателните (28%; n=898) и гъбичките (3% n=86). Над 70% от коагулазо-негативните стафилококи са с конститутивен фенотип на MLS-резистентност. Наблюдава се тенденция на намаляване на честотата на метицилин резистентните *S. aureus*, но *P. aeruginosa* и *A. baumannii* продължават да бъдат проблемни вътреболнични патогени с изразена полирезистентност. Наблюдава се повишаване на антибиотичната резистентност към бета-лактами и карбапенеми при Грам-отрицателните чревни бактерии.
**Заключение:** Познаването на етиологичната структура на BSIs и антимикробната чувствителност на изолатите помага на здравните специалисти да вземат информирани решения и да намерят по-добри грижи за своите пациенти. Това е ключът за успешно емпирично и окончателно антимикробно лечение при тези инфекции.
**Ключови думи:** хемокултури, BSIs, антибиотична резистентност

---

*Д-р Гергана Ленгерова*
*Асистент към катедра Микробиология и Имунология*
*Медицински Университет Пловдив*
*бул. "Васил Априлов" 15-А*
*4002-Пловдив, България*
*тел. 00359898546450*

## TRENDS IN THE ETIOLOGICAL STRUCTURE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ISOLATES FROM BLOOD CULTURES IN PLOVDIV, BULGARIA (2015-2020)

G. Lengerova [1,2,3], Y. Kalchev [1,2,3], V. Kirina [1,2], R. Raycheva [4], MM. Petrov [1,3], M. Murdjeva [1,2,3]

1. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Medical University - Plovdiv, Bulgaria
2. Laboratory of Microbiology, University Hospital St. George, Plovdiv, Bulgaria
3. Research Institute at Medical University - Plovdiv, Bulgaria
4. Department of Social Medicine and Public Health, Faculty of Public Health, Medical University – Plovdiv

**Introduction:** Current knowledge of the frequency and etiology of bloodstream infections (BSIs) is important for guiding research and setting health policies, as well as for taking effective measures to prevent BSIs at the local and national levels.
**Aim**: The present study characterizes the current status and changes in etiological structure and antimicrobial resistance of BSIs in University Hospital St. George, Plovdiv, Bulgaria.
**Materials and methods**: The study was conducted at the Department of Microbiology and Immunology, MU-Plovdiv from January 2015 to August 2020. All blood cultures were cultivated in the BactAlert 3D system (bioMerieux) and the microorganisms were identified by routine biochemical methods, semi-automated and automated systems for microbial identification. Antimicrobial susceptibility was determined by the Bauer-Kirby disk-diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC) by the VITEK-2 Compact automated system (bioMerieux).
**Results:** For the studied period we tested 10 173 blood cultures and 3166 (31.1%) of them were positive. The laboratory receives an average of 1695.5 blood cultures per year, and the average increase in the received materials is by 16.6%. Gram-positive isolates (69%; n=2182) predominate over Gram-negative (28%; n = 898) and fungi (3% n = 86). Over 70% of coagulase-negative staphylococci (CoNS) demonstrated constitutive MLS resistance phenotype. There was a decreasing tendency in methicillin-resistant *S. aureus,* but *P. aeruginosa* and *A. baumannii* continued to be problematic nosocomial pathogens with pronounced polyresistance. An increase in antibiotic resistance to beta-lactams and carbapenems in Gram-negative enteric bacteria was observed.
**Conclusion**: The knowledge of the etiological structure of BSIs and the antimicrobial susceptibility of the isolates helps health professionals make informed decisions and find better care for their patients. These are the keys to a successful empiric and definitive antimicrobial treatment of these infections.
**Keywords:** blood cultures, BSIs, antimicrobial susceptibility

---

*Gergana Lengerova, MD*
*Asst. Prof. Dept. Microbiology and Immunology*
*Medical University Plovdiv*
*15-A Vasil Aprilov Blvd.*
*4002, Plovdiv*
*Bulgaria*
*tel.: 00359898546450*

## ПАРАЗИТНИТЕ БОЛЕСТИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2020 Г.

И. Райнова, Р. Харизанов, Н. Цветкова, Р. Борисова, Е. Кънева, А. Иванова, И. Кафтанджиев, М. Виденова, О. Миков,
Отдел „Паразитология и тропическа медицина”
Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София

Дейностите по медицинска паразитология през 2020 г. бяха свързани до голяма степен с пандемията от Sars-Cov 2 и обявеното извънредно положение в РБългария. Въпреки това паразитните болести до голяма степен запазват своето разпространение в страната както като брой случаи, така и като екстензитет и заболяемост. **Цел** на настоящия доклад е анализ на състоянието на отделните групи паразитни заболявания през 2020 г. Като материали са използвани данните от периодичните и годишните отчети на РЗИ, ЛЗ и НЦЗПБ. Общо през 2020 г. за паразити са изследвани 628 826 лица, от които диагностицирани с различни паразитози са 1.74% от тях. При местните хелминтозоонози като ехинококозата и трихинелозата се наблюдава значително понижение в заболяемостта – 1.37‰ и 95 доказани с ехинококоза и 0.18‰, 13 регистрирани (2 епидемични взрива) с трихинелоза. За геохелминтозите аскаридоза и трихоцефалоза са изследвани 505 889 лица, като съответно установената заболяемост е 6.4‰ и 0.49‰. По отношение на контактните паразитози леко се понижава екстензинвазията при ентеробиозата средно за страната (1.54%), но сред организираните детски колективи, тя продължава да е висока (2.76%). При гиардиазата също 71.2% от съобщените случаи са при деца на възраст от 0 до 9 години. От опортюнистичните паразитози при токсоплазмозата се запазва сравнително висока серопозитивност от 15.37%, но през годината са диагностицирани 5 новородени с данни за конгенитална форма на тази зооноза. За малария са изследвани 1609 пациенти, като заболяване е установено при 5 от тях - 4 български граждани и 1 студент от Нигерия. В заключение може да отбележим, че въпреки настъпилата пандемична обстановка и затрудненията в работата на РЗИ и ЛЗ за паразитози през 2020 г. са извършени 1 110 241 г. анализи и тази патология запазва своето място в нашата страна.

Ключови думи: паразитози, заболяемост, зоонози, геохелминтози

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

## PARASITIC SISEASES IN BULGARIA IN 2020

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

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

Medical parasitology activities in 2020 were largely related to the Sars-Cov 2 pandemic situation and the declared state of emergency in the Republic of Bulgaria. However, parasitic diseases remain widespread in the country both in number of cases and in prevalence and incidence. The aim of this report is the analysis of the state of different groups parasitic diseases in 2020. The data from the periodic and annual reports of RHI, medical institutions and NCIPD are used as materials. In 2020, a total of 628,826 people were tested for parasites, of which 1.74% were diagnosed with various parasitic diseases. In indigenous helminthiases such as echinococcosis and trichinellosis there is a significant decrease in morbidity - 1.37‰ and 95 proven cases with echinococcosis and 0.18‰, 13 registered individuals (2 epidemic outbreaks) with trichinellosis. For soil transmitted parasitoses - ascariasis and trichuriasis, 505 889 persons were examined, and the established morbidity was 6.4‰ and 0.49‰, respectively. With regard to communicable parasitic diseases, the prevalence of enterobiasis slightly decreased on average for the country (1.54%), but among organized children's groups, it remains high (2.76%). In giardiasis, 71.2% of reported cases are in children aged from 0 to 9 years. Of the opportunistic parasitoses in toxoplasmosis, a relatively high seropositivity of 15.37% is preserved, but during the year 5 newborns were diagnosed with data for a congenital form of this zoonosis. 1609 patients were examined for malaria and 5 of them were diagnosed with the disease - 4 Bulgarian citizens and 1 student from Nigeria. In conclusion, we can note that despite the pandemic situation and the difficulties in the work of RHI and medical institutions for parasitic diseases in 2020, 1,110,241 analyzes were performed and this pathology retains its place in our country.

Kew words: parasitoses, incidence, zoonoses, soil transmitted parasitoses

Address for correspondence: Prof. Rainova, NCIPD, Sofia 1504, bul. "Yanko Sakazov" 26;
Tel: 02 8438002

# РЕПЕЛЕНТНИ СВОЙСТВА НА ПРОДУКТИ СЪДЪРЖАЩИ ЕТЕРИЧНИ МАСЛА

Н.Миткова, С. Буковска
Национален център по заразни и паразитни болести, София

**Въведение**: Етеричните растителни масла са летливи смеси на въглеводороди и кислородни съединения. Репелентните им свойства се дължат предимно на наличието на монотерпени. В списъка на Европейската агенция по химикали са включени девет броя етерични субстанции, одобрени за производство на репеленти срещу кръвосмучещи членестоноги. Смесването на някои етирични масла в състава на репелентите е възможно да доведе до синергистичен ефект.
**Цел** на настоящата работа е да представи данните за отблъскващата ефективност срещу комари на няколко продукта произведени на натурална основа – етерични масла добивани от растения.
**Материали и методи:** През периода 2018 – юни 2021 г. в лаборатория «Медицинска арахноентомология и зоология с ДД» са тествани седем репелента с етерични масла, сред които цитронелово, кедрово, ментово, розмариново, евкалиптово. В повечето продукти, маслата са приложени като смес в определено количествено съотношение. Изпитваната формулация е една и съща – лосион. При опитите са използвани комари *Aedes aegypti*, отглеждани лабораторно. Оценката на ефективността е направена по отношение времето на пълна защита на човешката кожа от ухапвания (при експозиция на третирани с репелент ръце на доброволци).
**Резултати и обсъждане:** Отблъскващият ефект на продуктите варираще между нула и четири часа. Репелентни свойства показаха четири лосиона, всички с обща съставка *цитриодиол*, добивана от дестилирано масло на *Eucalyptus citriodora*. Концентрацията на цитриодиол беше в диапазона 7,5 – 30%. Три лосиона с концентрации 7,5%; 20% и 30% осигуриха защита 4 часа. При този с 15% съдържание, предпазването продължи едва до първия час. По-краткото му времетране в сравнение с това при 7,5% -ия цитриодиол, вероятно се дължи на разлики в начина на добиване на първичната суровина чрез парна дестилация и/или разлики в концентрацията на основния монотерпен *p-menthane-3,8-diol*.
При останалите три продукта репелентна активност не беше установена. Като възможни причини може да се посочат сравнително ниските концентрации на отделните компоненти (най-много до 2,8%) и характерната им висока летливост.

**Ключови думи:** етерични масла, репелетност, комари

## REPELLENT PROPERTIES OF PRODUCTS CONTAINING ESSENTIAL OILS

N.Mitkova, Sf. Bukovska
National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

**Introduction:** Essential oils are volatile mixtures of hydrocarbons and oxygenated compounds. Their repellent activity mostly has been linked to the presence of monoterpenes. There are nine number of essential oils approved from the European Chemicals Agency for repellent manufacturing process. Mixing of some essential oils in the ready-to-use repellents may lead to synergistic effects.
The **aim** of the study is to present the data on mosquito repellent activity of some natural product with essential plant oils.
**Materials and methods:** During the period 2018 – June 2021, the efficacy of 7 products with essential oils (some of them: citronella, cedar, peppermint, rosemary, eucalyptus) was studied under laboratory conditions. In the most of products the oils were applied as mixture in a certain quantitative proportion. The tested formulation was a lotion. The repellents were tested against mosquitoes of the species *Aedes aegypti*, laboratory strain. The efficacy was evaluated based on the complete protection time on human skin (by exposing volunteers` repellent-treated arms)
**Results and discussion:** Repellent efficacy of the products varied from 0 to 4 hours. Four lotions showed repellent properties. All of them had the same ingredient "citriodiol" that is produced from distilled *Eucalyptus citriodora* oil. The concentration of citriodiol was in the range of 7.5 - 30%. Three lotions (7.5%; 20% and 30%) provided protection for 4 hours. For the product with a 15%, the protection lasted only until the first hour. The shorter duration compared to 7.5% citriodiol was probably due to differences in the raw material derivation and/or the concentration of the main monoterpene *p-menthane-3,8-diol*.
No repellent activity was found in the resting three products. That was likely due to the relatively low concentration of every component (up to a maximum of 2.8%) and their specific high volatility.

**Keywords:** essential oils, repellence, mosquitoes

## РЕТРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА КОЛИЕНТЕРИТИ В БЪЛГАРИЯ ЗА ПЕРИОД ОТ ДЕСЕТ ГОДИНИ (2011-2020)

М. Павлова[1], Ек. Александрова[1], Г. Каменов[1], В. Велев[2], М. Попов[2]

[1] Национален център по заразни и паразитни болести – София
[2] СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“, Медицински университет – София

Колиинфекциите представляват важен проблем за инфекциозната патология на човека. Чревните заболявания, причинени от диарогенни *E. coli* съставят значителен дял от инфекциите у децата. Колиентеритите могат да се явят като спорадични случаи, но често приемат епидемичен характер в детски колективи с ясно подчертана висока заболяемост, а в някои страни и висок леталитет.
**Цел:** Да се определи значението и разпространението на инфекциите, причинени от диарогнни *E. coli* в страната за период от десет години - 2011 – 2020г.
**Материали и методи**. Чрез ретроспективни клинико-епидемиологични дани беше определена етиологичната роля и разпространението на диарогенни *E. coli* сред българското население за последното десетилетие.
**Резултати.** Обобщените данни от извършеното проучване за периода 2011 – 2020г определят ролята на токсигенните (ETEC) *E. coli* O6 като водещ етиологичен причинител на епидемични и спорадични колиентерити в страната, следвани от токсигенните серотипове O 25; ентеропатогенните (EPEC) O 86; O 127, O 18; O 44. Всички изолати, принадлежащи на ентерохеморагичните (EHEC) O 157 са негативни за H:2 и клиничните прояви не са свързани с характерните усложнения за ХУС. Относно възрастовата структура и полово разпределение на инфекциите, най-засегнати са децата на възраст 0 – 4г, като броят на заразените превалира при мъжете, изключение прави само периодът на 2016г. Най-често са регистрирани колиентерити са през топлите месеци Май – Септември. Регистрирани са няколко епидемии при малки деца и пациенти на различни неонатолигии в страната, като етиологичен причинител е ETEC O6. Прави впечатление, че след 2013г данни за доказани и съобщени в НЦЗПБ епидемии от колиентерити за страната липсват.
**Заключение.** Основен етиологичен причинител на колиентерити в България е ETEC O6, най-засегнати са малките деца, а кърмачетата са рискова група. След 2013г епидемии, причинени от диарогенни *E. coli* в страната не са регистрирани, диагностиката на колиинфекциите е занижена, което повишава рисковият фактор за разпространението на патогените.

## A RETROSPECTIVE STUDY ON THE DISTRIBUTION OF E. COLI ENTERITIS IN BULGARIA FOR A PERIOD OF TEN YEARS (2011-2020)

M. Pavlova[1], Ek. Alexandrova[1], G. Kamenov[1], V. Velev[2], M. Popov[2]

[1] National Center of Infectious and Parasitic Diseases – Sofia
[2] University Hospital for Infectious and Parasitic Diseases "Prof. Ivan Kirov", Medical University – Sofia

*E. coli* infections are an important problem for human infectious pathology. Intestinal diseases caused by diarrheagenic *E. coli* account for a significant proportion of infections in children. *E. coli* enteritis can occur as sporadic cases but often assumes an epidemic nature in children's groups with a clear high incidence and in some countries high mortality.
**Objective:** To determine the significance and prevalence of infections caused by diarogenic E. coli in the country for a period of ten years - 2011 - 2020.
**Materials and methods.** The etiological role and distribution of diarogenic E. coli among the Bulgarian population for the last decade was determined by retrospective clinical and epidemiological data.
**Results**. The summarized data from the study for the period 2011 - 2020 determine the role of toxigenic (ETEC) *E. coli* O6 as a leading etiological cause of epidemic and sporadic enteritis in the country, followed by toxigenic serotypes O 25; enteropathogenic (EPEC) O 86; O 127, O 18; O 44. All isolates belonging to the enterohemorrhagic (EHEC) O 157 are negative for H: 2 and the clinical manifestations are not related to the characteristic complications of HUS. Regarding the age structure and sex distribution of infections, the most affected are children aged 0 - 4 years, with the number of infected prevailing among men, except the period of 2016. The most common registered *E. coli* infections are during the warm months of May - September. Several epidemics have been registered in young children and patients of various neonatologies in the country, as the etiological cause is ETES O6. It is noteworthy that after 2013 data on proven and reported in NCIPD epidemics of *E. coli* infections for the country are missing.
**Conclusion.** The main etiological cause of *E. coli* infections in Bulgaria is ETES O6, young children are most affected and infants are a risk group. After 2013, epidemics caused by diarrheagenic *E. coli* in the country were not registered, the diagnosis of these infections is reduced, which increases the risk factor for the spread of pathogens.

## АНАЛИЗ И ОЦЕНКА НА ЛАБОРАТОРИИ УЧАСТВАЛИ В МЕЖДУЛАБОРАТОРНИ СРАВНИТЕЛНИ ИЗПИТВАНИЯ – МАЙ 2021Г

Мария Павлова, Екатерина Александрова

НРЛ по Чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия
Национален център по заразни и паразитни болести- София

НРЛ по Чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия- НЦЗПБ ежегодно провежда междулабораторни сравнителни изпитвания на лабораториите в страната за идентификация и серотипиране на бактериални чревни патогени. Целта на изпитването е проследяване и оценяване прилаганите методите в диагностичната дейност на микробиологичните лаборатории при изследване за бактериални чревни патогени. Общият брой на участващите лаборатории е *217* за първи цикъл на външния контрол - 2021г, като от тях *170* са първо ниво - Идентификация на бактериални чревни патогени (определяне на бактерия до вид), *45* лаборатории са второ и едва *5* лаборатории са 3 ниво на изпитване - идентификация и серотипиране на бактериални чревни патогени (определяне на бактерия до серотип).
За съжаление резултатите от проведеното изпитване показват, че прилаганите методи в българските микробиологични лаборатории за идентификация на бактериални чревни патогени не са унифицирани, възможността за диагностика на салмонелози и колиентерити е ограничена, както от финансов, така и от техничен дефицит на лабораториите. Откри се и сериозен пропуск в правилата диагностика на колиентерити, сведен до обследване само на определена възрастова група- деца до 5 години, което е предпоставка за увеличаване на здравите носители сред възрастните лица. Най-наболял проблем за страната е занижената диагностика на най-разпространената в света чревна инфекция от *Campylobacter sp.* Диагностиката на кампилобактериози е и недокладвана, като над 200 случая са потвърдени единствено с бързи антигенни тестове, което компрометира точната антибиотична терапия и последващи усложнения.
В заключение ще обобщим, че е нужен точен и ясен алгоритъм за диагностика на бактериални чревни ентероколити, към който да се придържат всички микробиологични лаборатории в страната, както и навременно регистриране и докладване на всички доказани случай, както на областните РЗИ, така и на НРЛ по Чревни инфекции, патогенни коки и дифтерия- НЦЗПБ, за навременен епидемичен контрол.

## ANALYSIS AND EVALUATION OF LABORATORIES INVOLVED IN INTERLABOR LABORATORY COMPARATIVE TESTS – MAY 2021

Maria Pavlova, PhD, Ek. Alexandrova

NRL on Enteric Diseases, Pathogenic Cocci and Diphtheria
NCIPD- National Center for Infectious and Parasitic Diseases – Sofia

The NRL on Enteric Diseases, Pathogenic Cocci and Diphtheria- NCIPD annually conducts interlabor laboratory comparative tests of laboratories in the country for anddentification and serotyping of bacterial intestinal pathogens. The purpose of the test is to monitor and evaluate the methods applied in the diagnostic activities of microbiological laboratories when testing for bacterial intestinal pathogens. The total number of participating laboratories *is 217* for the first cycle of external control - 2021, of which *170 are the first* level - Identification of bacterial intestinal pathogens (determination of bacterium to *species), 45* laboratories are second and only *5 laboratories* are 3 level of testing - and dentification andserotyping of bacterial intestinal pathogens (determination of bacterium to serotype).
Unfortunately, the results of the test show that the methods applied in the Bulgarian microbiological laboratories for the identification of bacterial intestinal pathogens are not uniform, the possibility of diagnosis of salmonellologists and colienteritis is limited by both financial and technical deficiency of laboratories. There was also a serious flaw in the rules of diagnosis of colienteritis, reduced to examination of only a certain age group, children up to 5 years old, which is a prerequisite for an increase in healthy carriers among the elderly. The most ingesting problem for the country is the understated diagnosis of the world's most common intestinal infection *by Campylobacter sp.* Diagnosis of campylobacteriosis is also unreported, with over 200 cases confirmed only by rapid antigenic tests, which compromises accurate antibiotic therapy and subsequent complications.
In conclusion, we will summarize that an accurate and clear algorithm for the diagnosis of bacterial intestinal enterocolitis is needed to be adhered to by all microbiological laboratories in the country, as well as timely registration and reporting of all proven cases, both regional health inspectorates and The NRL on Enteric Diseases, Pathogenic Cocci and Diphtheria-NCIPD, for timely epidemic control.

# ПОСТЕРНА СЕСИЯ I

## 1. ИМУНОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ НА SARS-COV-2 ПРИ HIV+ ЛИЦА НА ПРОДЪЛЖИТЕЛНА АНТИРЕТРОВИРУСНА ТЕРАПИЯ (CART)

Радослава Емилова[1], Яна Тодорова[1], Нина Янчева[2], Ренета Димитрова[3], Ивайло Алексиев[3], Мария Николова[1]

[1]*Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София*
[2]*Отделение за придобити имунни дефицити, СБАЛИПБ Иван Киров, София*
[3]*Национална референтна потвърдителна лаборатория по ХИВ, НЦЗПБ, София*

**Въведение:** Данните за потенциално взаимодействие между SARS-CoV-2 и HIV инфекцията в условията на продължителна антиретровирусна терапия (Cart) са ограничени и противоречиви.
**Цел.** Да се оцени SARS-CoV-2 специфичния антитялов отговор, както и въздействието на COVID-19 върху остатъчната имунна активация при HIV+ART+ лица с неоткриваем HIV вирусен товар.
**Материали и методи.** В проучването са включени 32 HIV+лица (27 мъже, 5 жени) на възраст 41±11г.(средна, ± SD) съобщили в хода на рутинния имунологичен мониторинг за позитивен SARS CoV-2 PCR резултат преди 37±23 дни. Всички са били на непрекъсната Cart (62±49мес.), със стандартни тройни режими и потиснат вирусен товар (HIV VL<2.0 log10copies/ml). Флоуцитометрично са определени: процент и абсолютен брой (АС) CD 4 и CD8 Т лимфоцити, CD4/CD8 индекс (TRUCount, MultiTest, FACSCanto). Остатъчната активация е оценена по броя CD38 молекули (CD38ABS) върху CD4 и CD8T клетките (Quantibrite kit, BD Biosciences). Определени са SARS-CoV-2 специфични IgA и IgG (ELISA, Euroimmun) и неутрализиращи SARS-CoV-2 (ELISA, GenScript) в съответствие с инструкциите на производителя.
**Резултати.** Всички пациенти съобщаваха за леки/умерени симптоми на COVID-19. Отчетените процент и АС CD4 и CD8 Т и CD4/CD8 индекс не се различаваха значимо от последните измерени стойности преди SARS-CoV-2 инфекцията (33с/у32%; 39с/у40%; респективно 807с/у864АС; 1002с/у1039АС; 0.94с/у0.91 индекс, p>0.05 за всички). CD8CD38ABS (1502±493) не се различаваше от референтните стойности за HIV- здрави лица, а CD4CD38ABS беше увеличен само при трима (9%) от пациентите. SARS-CoV-2 специфични IgA (средна 3.7±4.7SD) се установиха при 23/32 (72%) от пациентите, а IgG (средна 4.1±3.5SD) – при 28/32 (87,5%). Неутрализираща активност на SARS-CoV-2 антитела (средна 48.3%±29.5SD) беше отчетена при 28/32(87,5%) от пациентите.
**Заключение**. SARS-CoV-2 ко-инфекцията не се отразява на остатъчната имунна активация и имунологичното възстановяване при HIV+ART+ лица с неоткриваем HIV VL. Отсъствието на SARS-специфични IgG при част от пациентите може да се обясни с променена динамика на отговора, което изисква доказване на SARS-CoV-2 специфични паметови В и Т лимфоцити.
**Ключови думи:** SARS-CoV-2, HIV, Cart
***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, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“*
**За кореспонденция:**
Радослава Емилова, дб, e-mail: reantova@abv.bg; НРЛ по имунология, НЦЗПБ

## 1. IMMUNOLOGICAL RESPONSES TO SARS-COV-2 IN PEOPLE LIVING WITH HIV ON CONTINUOUS ANTIRETROVIRAL THERAPY (CART)

Radoslava Emilova[1], Yana Todorova[1], Nina Yancheva[2], Reneta Dimitrova[3], Ivaylo Alexiev[3], Maria Nikolova[1]

[1]*NRL of Immunology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia*
[2]*Specialized Hospital for Active Treatment of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia*
[3]*NRL of HIV, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia*

**Background.** Data about the potential interaction between SARS-CoV-2 and HIV infection in the settings of continuous antiretroviral therapy (Cart) is still limited, and contradictory.
**Aim.** To assess SARS-CoV-2 specific antibody response, and the impact of COVID-19 on the residual immune activation in HIV+ patients with undetectable HIV viral load (VL).
**Material and methods.** Consecutive HIV+patients (27 male, 5 female; aged 41±11y (mean ±SD) who presented for immune monitoring after a positive SARS CoV-2 PCR result 37±23 days ago, were included in the study. All had been on continuous Cart for 62 ±49 mo, with standard triple regimens and sustained viral suppression SVR (HIV VL<2.0 log10copies/ml). Absolute counts (AC), and percentage of CD4 and CD8T, and CD4/CD8 ratio were determined by single-platform flow cytometry (TRUCount tubes, MultiTest, FACSCanto). The residual iune activation was assessed by the number of CD38 molecules (CD38ABC) on CD4 and CD8 T cells using Quantibrite kit (FACSDiva 6.1.2, BD Biosciences). SARS-CoV-2 specific IgA and IgG (ELISA, Euroimmun), and neutralizing SARS-CoV-2 (ELISA, GenScript) were determined according to manufacturer`s instructions.
**Results.** All patients reported mild/moderate symptoms of COVID-19. Percentage and AC CD4 and CD8, and CD4/CD8 index did not differ significantly from nadir values before SARS-CoV-2 infection (33vs.32%; 39vs.40%; and respectively: 807vs.864AC; 1002vs.1039AC; 0.94vs.0.91 index, p>0.05 for all). CD8CD38ABS (1502±493) did not differ from reference values for HIV- controls,, and CD4CD38ABS was increased in only 3 patients (9%). SARS-CoV-2 specific IgA (mean 3.7±4.7SD) was detected in 23/32 (72%) of patients, and IgG – in 28/32 (87,5%). The presence of neutralizing activity of SARS-CoV-2 (mean ± 48.3%±29.5SD) was detected in 23/32 (72%) of patients.
**Conclusions**. SARS-CoV-2 co-infection does not affect the residual immune activation and immune recovery in HIV+ART+ patients with undetectable HIV VL. The absence of SARS-specific IgG in part of the patients could be explained with altered response dynamics, which requires further detection of SARS-CoV-2 specific memory B and T cells.

**Keywords:** SARS-CoV-2, HIV, Cart
***Acknowledgments:*** *The study is supported by the 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"*

**Corresponding author:**
Radoslava Emilova
NRL of Immunology, NCIPD
e-mail: reantova@abv.bg

## 2.ОЦЕНКА НА ОТРИЦАТЕЛНОТО ВЛИЯНИЕ НА COVID-19 ВЪРХУ ДИАГНОСТИКАТА НА ТУБЕРКУЛОЗАТА В БЪЛГАРИЯ

С. Йорданова, Е. Бачийска, А. Байкова, Ю. Атанасова
Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), гр. София

**Цел.** Да се направи оценка на влиянието на ограниченията, въведени срещу разпространението на COVID-19, върху диагностиката на туберкулозата в България.
**Материали и методи.** НРЛ ТБ, НЦЗПБ изработи и разпространи анкета в лабораториите, извършващи микробиологична диагностика на туберкулозата, която не съдържа разпознаваеми детайли. Въпросите засягат вида на диагностичната дейност, промени в организацията на работа, личен състав и др. през предпандемичната 2019г. и през 2020г.
**Резултати.** В анкетата взеха участие всички лаборатории (n=33, 100%), извършващи микробиологична диагностика на туберкулозата в страната. Лабораториите, натоварени допълнително с диагностика на COVID-19, са n=27 (82%). По време на априлското затваряне 30% от лабораториите са отговорили с промяна на организацията на работния режим, а през ноември - 36% от запитаните. Изменение в достъпа на лабораторията за външни лица е въведено при 30% (n=10) диагностични звена, а само в шест е било увеличено времето за даване на резултат. Болничните дни, използвани от заетите специалисти поради заболяване от COVID-19 за 2020г. са били 495, брой карантинни дни 335, неплатен отпуск – 10 дни. Значително е снижен обемът на микробиологичните изследвания за туберкулозата през 2020г.: микроскопското изследване бележи спад от 38%, културелното изследване – 34%, а броят на потвърдените с клиничен изолат пациенти – с 23%.
**Заключение.** Пандемията и ограничителните мерки, предприети с цел ограничаването ѝ, са довели до значителен спад в навременно диагностицираните случаи на туберкулоза в България през 2020г.
**Ключови думи:** COVID-19, ТБ диагностика, туберкулоза

## 2.ASSESSMENT OF THE NEGATIVE IMPACT OF COVID-19 ON THE TB DIAGNOSIS IN BULGARIA

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

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

**Key words:** COVID-19, TB diagnosis, tuberculosis

**Aim.** To assess the negative impact of the restrictions related to COVID-19 pandemic on TB diagnosis in Bulgaria.
**Materials and methods.** NRL TB, NCIPD conducted a survey in the TB laboratory network in Bulgaria by a questionnaire with no recognizable details. The provided information included the range of laboratory activities, changes of the working process and human resources data in 2019 and 2020 respectively.
**Results.** All of the TB laboratories in the country (n=33, 100%) provided valuable information. Out of them 82% (n=27) have been also involved in COVID-19 testing. During the lockdown in April 2020 – 30% of the laboratories changed the working process organization and for November – 36% of the entire network did it. Reduced access to the unit was reported by 30% (n=10) of the facilities. Only six of laboratories increased the turnaround times for the TB diagnostic evaluations in 2020. The sick leaves due to COVID-19 disease for all TB network were 495 days, the number of the quarantine days - 335, the unpaid leaves - 10 days. A significant decrease in tuberculosis evaluations was detected in 2020: the microscopic examination has dropped by 38%, the cultures - by 34%, and the number of patients confirmed by positive for *M.tuberculosis* culture - by 23%.
**Conclusion.** The COVID-19 pandemic and the applied restrictive measures led to a significant reduction in the timely diagnosed TB cases in Bulgaria for year 2020.

## 3.ПРОУЧВАНЕ НА АНТИ-КОРОНАВИРУСНА АКТИВНОСТ НА ХАЛКОНИ С РАЗНООБРАЗНО ЗАМЕСТЕНИ АРОМАТНИ ПРЪСТЕНИ И КИНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА ЕФЕКТА ИМ ВЪРХУ РАННИТЕ ЕТАПИ НА ВИРУСНА РЕПЛИКАЦИЯ

Радослав Маринов[1], Георги Дянков[2], Мая Захариева[3], Надежда Маркова[4], Петя Генова-Калу[1]

*[1]НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси", НЦЗПБ, София; [2]Институт по оптически материали и технологии „Акад. Й. Малиновски", БАН, София; [3]Институт по микробиология „Стефан Ангелов", БАН, София; [4]Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия, БАН, София*

**Интродукция:** Халконите (1,3-диарил-проп-2-ен-1-они) са важни прекурсори на флавоноидите и изофлавоноидите с широк фармакологичен спектър на действие. Поради своята ниска токсичност и мутагенност представляват атрактивен обект за научни изследвания. Тъй като голяма част от фармакологичния им потенциал е все още недостатъчно проучен, изследвания относно антивирусният им ефект е особено актуален.
**Цели:** Да се проучи антивирусната активност на четири новосинтезирани халкона с разнообразно заместени ароматни пръстени върху инфектирани клетки с човешки коронавирус щам 229E (HCoV-229E). Да се извърши оценка на бимолекулното взаимодействие „клетка-гостоприемник – вирус", както и кинетичен анализ на ефекта им върху ранните етапи на вирусна репликация.
**Материали и методи**: Монослойна клетъчна линия от маймунски бъбрек (Vero E6) и HCoV-229E са използвани като моделна система за провеждане на антивирусните експерименти. За определяне на инхибиращата литична активност на HCoV-229E, както и за оценка на жизнеспособността на инфектираните и неинфектирани клетки са използвани колориметричния MTT-метод и ЦПЕ инхибиращ тест на 96 час. Взаимодействието „клетка–HCoV-229E", както и кинетичния анализ на ефекта на изследваните халкони и противовирусни препарати (положителни контроли) в експериментите върху ранните етапи от репликацията е оценено чрез метода на повърхнинен плазмонен резонанс (SPR) и атомно-силова микроскопия (AFM) при различна концентрация и време на експозиция.
**Резултати:** Получените резултати показват, че преживяемостта на третираните монослойни клетки под въздействие на изпитваните халкони, като наблюдаваният ефект нараства правопропорционално с увеличаването на концентрацията им. Приложени в максимална нетоксична концентрация (МНК) и близки до нея изследваните халкони показват различна степен на инхибиция на ЦПЕ на инфектирани с HCoV-229E клетки след 96 часа третиране. Най-добро потискане на ЦПЕ на HCoV-229E се наблюдава след третиране с халкон AV21, (2,5,3'-три метокси халкон) на инфектирани клетки, приложен в МНК (0,01 μg/mL). Чрез SPR метода е оценен ефекта на антивирусно действие на халконите върху ранните етапи на вирусната репликация и отговора „вирус-клетка" следва промяната в жизнеспособността на инфектираните и третирани клетки, оценен чрез MTT и AFM анализите.
**Изводи:** Въз основа на получените резултати може да се заключи, че халкон AV21 проявява обещаваща анти-коронавирусна активност в клетъчни култури. Направеното изследване е пилотно и получените резултати ще бъдат използвани за разработване и оптимизиране на сложна методология за оценка на връзката „структура – антивирусна активност".

## 3.RESEARCH IN ANTI-CORONAVIRUS ACTIVITY OF NEW SYNTHESIZED CHALCONES WITH VARIOUSLY SUBSTITUTED AROMATIC RINGS AND KINETIC ANALYSIS OF THEIR EFFECT ON THE EARLY STAGES OF VIRAL REPLICATION

Radoslav Marinov[1], Georgi Dyankov[2], Maya Zaharieva[3], Nadezhda Markova[4], Petia Genova-Kalou[1]

*[1]NRL "Cell cultures, rickettsia and oncogenic viruses", National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia; [2]Institute of Optical Materials and Technologies "Acad. J. Malinovski ", BAS, Sofia; [3]The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, BAS,, Sofia; [4]Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS, Sofia.*

**Introduction**: Chalcones (1,3-diphenyl-2-propene-1-on) are crucial precursors of flavonoids and isoflavonoids which have a wide pharmacological activity spectrum. Since of their low toxicity and mutagenicity they are an attractive object of research. Because the main pharmacological potential of chalcones is poorly researched, the synthesis of these compounds and their analogues, and studies on their antiviral activity, is particularly topical.

**Purpose**: Studing the antiviral activity of four newly synthesized chalcones with variously substituted aromatic rings on infected cells with human coronavirus strain 229E (HCoV-229E). To evaluate the bimolecular interaction "host-virus - virus", and kinetic analysis of their effect on the early stages of viral replication.

**Materials and methods**: Monkey kidney monolayer cell line (Vero E6) and HCoV-229E were employed as a model system for the antiviral research. The colorimetric MTT assay at 96 hour and CPE inhibition test were used to determine the inhibitory lytic activity of HCoV-229E, also to assess the viability of infected and uninfected cells. The cell-HCoV-229E interaction and the kinetic analysis of the effect of the studied chalcones and antiviral drugs (positive controls) in the experiments on the early stages of replication were evaluated by surface plasmon resonance (SPR) and atomic force microscopy (AFM) at different concentrations and exposure times.

**Results**: Results shows that the survival of the treated monolayer cells, affected by the tested chalcones, and the observed effect increases in direct proportion when concentration is increased. Applying investigated molecule at and above the maximum non-toxic concentration (MNC), the investigated chalcones showed varying degrees of CPE inhibition in HCoV-229E-infected cells after 96 hours of treatment. The best CPE inhibition of HCoV-229E was observed after treatment with the AV21 chalcone, (2,5,3'-tri methoxy chalcone) of infected cells in MNC (0.01 µg / mL). The SPR method assessed the effect of antiviral action of chalcones at the early stages of viral replication and the virus-cell response followed by the change in viability of infected and treated cells, assessed by MTT and AFM assays.

**Conclusions**: Based on the results obtained, it can be concluded that chalcone AV21 exhibits promising anti-coronavirus activity in cell cultures. The study is a pilot and the results will be used to develop and optimize a complex methodology for assessing the relationship "structure - antiviral activity".

**Key words**: chalcones, human coronavirus strain 229E (HCoV-229E), SPR and MTT methods

## 4.СПЕЦИФИЧЕН Т-КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР СЛЕД SARS-COV-2 ИНФЕКЦИЯ

Яна Тодорова[1], Радослава Емилова[1], Русина Гроздева[2], Магдалена Баймакова[3], Георги Попов[3], Мария Николова[1]

[1] *НРЛ по Имунология, Национален център по заразни и паразитни болести, София*
[2] *Отделение за придобити имунни дефицити, СБАЛИПБ Иван Киров, София*
[3] *Военномедицинска академия, катедра по Инфекциозни болести, София*

**Въведение:** Т-клетъчният имунен отговор има водеща роля за ограничаване и елиминиране на острите вирусни инфекции. В условията на пандемия от COVID-19, въпросът за характеристиките на SARS-CoV-2-специфичния Т-клетъчен отговор след прекарана инфекция е от първостепенно значение.

**Целта** на проучването е да се установи наличието и персистирането на SARS-CoV-2 специфични Т лимфоцити при лица, преболедували от COVID – 19 с различна тежест.

**Материали и методи:** Изследвани са проби от периферна кръв на 54 лица (25 мъже, 29 жени, средна възраст 53, 29-69г.), до 12 месеца след доказана COVID-19 инфекция. С тежка симптоматика, налагаща хоспитализация, са били 24, (подгрупа А), а с лека до умерена симптоматика и на *амбулаторно* лечение – 30 от изследваните (подгрупа В). Вирус-специфичният Т-клетъчен отговор е определен по броя IFN-γ продуциращи Т-клетки (спот-формиращи клетки – SFC), след 16-18 часова *in vitro* стимулация с антигени от SASR-CoV-2 (T-SPOT.COVID/Discovery, Oxford).

**Резултати:** Наличие на SARS-CoV-2 специфични IFN-γ секретиращи Т-лимфоцити се установи при 76% от изследваните, а граничен резултат - при 13% от тях. Т-клетъчният отговор имаше сравнително стабилна динамика. До три месеца (1-3) след инфекцията положителен резултат се отчете при 72% от изследваните, средно; (мин-макс) 46; (14–127) SFC/ямка. Около шест месеца след инфекцията (5-7) положителните резултати бяха 84%, 45 (11–138) SFC/ямка, а една година след преболедуване - 71% средно; (мин-макс) 33; (22-88) SFC/ямка, но без статистически значима разлика с предходните изследвания ($p>0.05$). Без съществени разлики беше и делът на пробите с граничен резултат, съответно – 11%, 11% и 12%. Значимо по – нисък процент положителни проби се установи в подгрупата с по-тежко протичане (А): 62% с/у 93% за В ($\chi 2$, $p<0.05$). Тази разлика бе най-силно изразена в първите 3 месеца след инфекцията: 33% с/у 80% (средно 41 с/у 65 SFC/ямка), не се наблюдаваше на 6 месец 81% с/у 87% (средно 51 с/у 31 SFC/ямка) и се проявяваше отново на 12-ти месец, без да е статистически значимо: 50% с/у 100% (средно29 с/у 36 SFC/ямка), ($p>0.05$).

**Заключение:** До една година след прекаран COVID – 19 в периферната кръв се откриват IFN-γ+ SARS-CoV-2-специфични Т-лимфоцити, като количеството им зависи от клиничната тежест на инфекцията. По-тежкото протичане се отразява на времето на проява на Т-клетъчния отговор, както и, вероятно, на неговата продължителност.

***Благодарности:*** *Това проучване е финансирано от ФНИ по проект КП-06-ДК1/9 от 29.03.2021*

**Ключови думи:** SARS-CoV-2, Т-клетъчен отговор, ELISPOT

ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ:
Яна Тодорова, дб
НРЛ по имунология, НЦЗПБ
бул. Янко Сакъзов 26, София
Тел. 02 943 56 36
e-mail: imlab@ncipd.org

## 4.SPECIFIC T-CELL IMMUNE RESPONSE AFTER SARS-COV-2 INFECTION

Yana Todorova[1], Radoslava Emilova[1], Rusina Grozdeva[2], Magdalena Baymakova [3], Georgi Popov[3], Maria Nikolova[1]

[1] NRL of Immunology, National Centre for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria
[2] Specialized Hospital for Active Treatment of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria
[3] Department of Infectious Diseases, Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria

**Background.** The T-cell immune response plays a major role in limiting and eliminating acute viral infections. In the context of the COVID-19 pandemic, the question of the characteristics of the SARS-CoV-2-specific T-cell response after infection is a prime consideration

**The aim** of the study is to assess the presence and persistence of SARS-CoV-2 specific T lymphocytes in patients with different severity of COVID-19.

**Material and methods.** Peripheral blood samples from 54 individuals (25 male, 29 female, median age 53, (29 - 69 years) up to 12 months after COVID-19 infection were analyzed. With severe symptoms, requiring hospitalization were 24 (subgroup A) and with mild to moderate symptoms and outpatient treatment - 30 (subgroup B). Virus-specific T-cell response were assessed by number of IFN-γ producing spot forming T cells (SFC) after 16-18h *in vitro* stimulation with SARS-CoV-2 peptide by ELISPOT (T-SPOT.COVID/Discovery,Oxford).

**Results.** Presence of SARS-CoV-2-specific T cells were detected in 76 % of patients, and borderline result - in 13% of them. The T-cell response had relatively stable dynamics. Up to three months (1-3) after infection, a positive result was found in 72% of subjects, median; (min-max) 46; (14–127) SFC/well. About six months after infection (5-7), positive results were 84%, median; (min-max) 45; (11–138 SFC/well), and one year after COVID-19, 71% median; (min-max) 33; (22-88) SFC/well, but not statistically significant from previous studies ( $p > 0.05$). No significant differences in the share of samples with a borderline result were found - 11%, 11% and 12% respectively. In subgroup A percentage of positive results were significantly lower: 62% vs. 93% for B ($\chi 2$, $p<0.05$). This difference was most pronounced in the first 3 months after infection: 33% vs 80% (median 41 vs. 65 SFC /well), not observed at 6 months 81% vs. 87% (median 55 vs 31 SFC/well) and reappeared at 12 months without statistical significance: 50% vs. 100% (median 29 vs. 36 SFC/well), ($p > 0.05$).

**Conclusions**. Up to one year after COVID-19 specific IFN-γ + SARS-CoV-2-specific T-lymphocytes are detected in the peripheral blood. The strength of the T-cell response depends of the clinical severity of the infection. The more severe illness affects the time of onset of the T-cell response, as well as probably its duration.

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

**Key words:** SARS-CoV-2, T-cell response, ELISPOT

**Corresponding author:**
Yana Todorova
NRL of Immunology, NCIPD
Sofia 1504; 26 Yanko Sakazov blvd.
e-mail: y_todorova@abv.bg

## 5. ВАКСИНАЦИЯТА СРЕЩУ COVID-19 - КЛЮЧ ЗА ОВЛАДЯВАНЕ НА ПАНДЕМИЯТА, УСПЕШНИ СТРАТЕГИИ, ПРОБЛЕМИ И ВЪЗМОЖНИ РЕШЕНИЯ

Г. Каменов
Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София, България

SARS-CoV-2 пандемията е едно от най-сериозните предизвикателство за общественото здраве в модерната история както поради здравните, така и заради икономическите последствия от заболяването. Цялостната стратегия на борба с пандемията бе насочена към забавяне на разпространението и смекчаване на тежестта на заболяването, а реализацията се осъществяваше чрез масирани нефармацевтични интервенции. Този подход бе успешен за забавяне темпа на пандемията и спечели време за създаване на ефективни ваксини. За невероятно къс срок бяха създадени ефективни ваксини на база различни платформи и организация за бързо ваксиниране на населението. Държавите от Европейския съюз, САЩ, Израел и други, за няколко месеца постигнаха много висок обхват на ваксиниране, което незабавно доведе до спад на заболяемостта от COVID-19. В огромната част от държавите в света, обаче обхватът на ваксиниране е нисък и постигането на популационен имунитет ще се забави, възможно с години.
Уроците от последните месеци от надпреварата между ваксинацията и разпространението на пандемията са предмет на съобщението. Разглеждат се успешните примери на постигане на бърз ваксинален обхват и влиянието на създадения колективен имунитет върху заболяемостта. Анализират се възможностите за допълнително разширяване на обхвата чрез ваксинация на деца над 12 г, прилагане на бустерни дози ваксина, въвеждане на различни стимули или рестрикции или комбинация от тях за колебаещите. Обсъжда се характера и влиянието на управленски, популационни, финансови и информационни фактори за забавяне темпа на ваксиниране. Посочват се причините, влиянието и начините за противодействие на новия феномен- онлайн разпространение на дезинформация относно ваксините. Подчертава се, че следващата вълна от пандемията ще бъде сред неваксинирани и предлаганите решения отчитат бързото разпространение на новия по-вирулентен Delta вариант на вируса, като необходимостта от нови ограничителни мерки на общественото здраве за контрол ще зависи от успеха на ваксинационния процес.
**Ключови думи:** ваксини, COVID-19, SARS-CoV-2 пандемия

## 5. COVID-19 VACCINATION - THE KEY TO PANDEMIC CONTROL, SUCCESSFUL STRATEGIES, PROBLEMS AND POSSIBLE SOLUTIONS

G. Kamenov
National Centre for Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia, Bulgaria

The SARS-CoV-2 pandemic is one of the most serious public health challenges in modern history because of both the health and economic consequences of the disease. The overall pandemic strategy was aimed at slowing the spread and mitigating the severity of the disease, and implementation was carried out through massive non-pharmaceutical interventions. This approach has been successful in slowing the pace of the pandemic and gaining time to create effective vaccines. In an incredibly short time, effective vaccines were created on the basis of various platforms as well as organization for rapid vaccination of the population. The countries of the European Union, the United States, Israel and others achieved a very high vaccination coverage in a few months, which immediately led to a decrease in the incidence of COVID-19. In the vast majority of countries in the world, however, vaccination coverage is low and the achievement of population immunity will be delayed, possibly for years. Successful examples of achieving rapid vaccine coverage and the impact of established collective immunity on morbidity are considered. The possibilities for further expansion of the range by vaccination of children over 12 years of age, administration of booster doses of vaccine, introduction of various stimuli or restrictions or a combination of them for the hesitant are analyzed. The nature and influence of managerial, population, financial and informational factors for slowing down the rate of vaccination are discussed. The reasons, influence and ways to counteract the new phenomenon - online dissemination of misinformation about vaccines are indicated. It is emphasized that the next wave of the pandemic will be among the unvaccinated and the proposed solutions take into account the rapid spread of the new more virulent Delta variant of the virus, and the need for new public health control measures will depend on the success of the vaccination process.

**Keywords :** vaccin**es,** COVID-19,SARS-CoV-2 pandemic

## 6. ПЪРВОНАЧАЛНИ ДАННИ ЗА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ПНЕВМОЦИСТОЗАТА СРЕД БЪЛГАРСКОТО НАСЕЛЕНИЕ

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

[1] Катедра по паразитология и тропическа медицина, НЦЗПБ, София, България

[2] Катедра по микробиология, НЦЗПБ, София, България

[3] Отделение за лечение на придобита имунна недостатъчност, Специализирана болница за активно лечение по инфекциозни и паразитни болести „Проф. Иван Киров“, София

Данните за разпространението на *Pneumocystis jirovecii* при хора със заболявания на дихателната система в България са ограничени. Целта на проучването е да се установи честотата на откриване на *P. jirovecii* както при имунокомпрометирани и имунокомпетентни индивиди с респираторни инфекции/заболявания, така и при клинично здрави лица, контактни на пациенти с пневмония, причинена от *P. jirovecii* (PCP).

За откриване на ДНК специфична за *P. jirovecii* е приложен PCR анализ в реално време, насочен към гена, кодиращ митохондриалната голяма субединица на рРНК на *P. jirovecii*. Критериите за включване на участниците в научно-изследователското проучване са настояща инфекция и/или заболяване на дихателната система и близък контакт с пациент, диагностициран с PCP. Включени са двеста тридесет и две лица, като съотношението между възрастни и педиатрични пациента е 1,47 пъти в полза на групата над 18 години (138 възрастни, 59%). Участниците от мъжки пол преобладават пред тези от женски пол, 62%:38%. Лицата с компрометирана имунна система поради ХИВ инфекция, лечение на раково заболяване или медицински състояния, изискващи потискане на имунната система, представляват 29% (9 педиатрични и 58 възрастни пациенти) от всички участници, включени в проучването.

Анализирани са общо 232 проби (секрети от долните дихателни пътища, включително бронхоалвеоларен лаваж (n=12) или индуцирани храчки (n=94)) и от горните дихателни пътища, включително трахеални аспирати (n=8) и гърлени секрети (n=118)).

ДНК на *P. jirovecii* беше открита при 16% (n=38) от всички изследвани проби, 7 педиатрични:31 възрастни. В 87% от положителните случаи участниците са с компрометирана имунна система (26 от 47 изследвани с ХИВ инфекция и 6 от 20 изследвани на имуносупресивна терапия). По-често PCP е диагностицирана сред представителите на мъжкия пол (84%, n=32).

Резултатите от нашето проучване показват, че хората от всички възрасти са изложени на риск от заразяване с патогенната гъбичка, но инфекцията превалира сред лица с компрометиран имунитет.

**Ключови думи:** *Pneumocystis jirovecii* пневмония (PCP), 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 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 инфекциозната имунология“) към Министерството на образованието и науката на Република България.

## 6. PRELIMINARY DATA ON THE PREVALENCE OF *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* AMONG BULGARIAN POPULATION

Tsvetkova, N.[1], A. Ivanova[1], I. Raynova[1], R. Harizanov[1], N. Yancheva-Petrova[3], D. Strashimirov[3], R. Enikova[1], M. Videnova[1], E. Kaneva[1], I. Kaftandjiev[1], V. Levterova[2], I. Simeonovski[2]

[1] Department of Parasitology and Tropical Medicine, NCIPD, Sofia, Bulgaria

[2] Department of Microbiology, NCIPD, Sofia, Bulgaria

[3] Department for AIDS, Specialized Hospital for Active treatment of Infectious and Parasitic Diseases „Prof. Ivan Kirov“, Sofia, Bulgaria

Data on the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* in humans with respiratory system diseases in Bulgaria are limited. The aim of the study was to describe the frequency of detection of *P. jirovecii* in both immunocompromised/immunocompetent individuals with respiratory infections/diseases and in clinically healthy individuals who were in contact with *P. jirovecii* pneumonia (PCP) diagnosed patients.

*P. jirovecii* specific DNA was detected by a real-time PCR assay targeting the *P. jirovecii* mitochondrial large subunit rRNA gene. The inclusion criteria of participants were a current infection/disease of the respiratory system and a close contact with a PCP diagnosed patient. For inclusion in the study 232 individuals were considered eligible and the ratio of adult to pediatric participants was 1.47 times in favor of the group over 18 years (138 adults, 59%). Male participants predominated over female ones, 62%:38%. Individuals with compromised immune systems due to HIV infection, cancer treatment or underlying medical conditions requiring immune system suppressing medication constituted 29% (9 pediatric and 58 adult patients) of all participants recruited in the study.

A total of 232 specimens (secretions from the lower respiratory tract, including bronchoalveolar lavage fluids (n=12) or induced sputums (n=94)), and from the upper respiratory tract, including tracheal aspirates (n=8) and throat secretions (n=118)) were analysed. *P. jirovecii* DNA was detected in 16% (n=38) of all examined specimens, 7 pediatric:31 adults. In 87% of the positive cases, participants were with compromised immune system (26 out of 47 examined with HIV infection and 6 out of 20 examined on immunosuppressive therapy). More often PCP was diagnosed among male subjects (84% males, n=32).

The results of our study shows that humans of all ages are at risk of acquiring infection with the pathogenic fungus, however, more susceptible are people with weakened immune system.

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

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.

## 7. СРАВНИТЕЛНО ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТИВНОСТТА НА ОЦВЕТИТЕЛНИТЕ МИКРОСКОПСКИ МЕТОДИ ЗА ДИГНОСТИКА НА ПНЕВМОЦИСТОЗАТА

Р. Борисова[1] , Н. Цветкова[1], А. Иванова[1], М. Виденова[1], В. Левтерова[2] , Н. Янчева[3], Д. Страшимиров[3]

[1] Национален Център по Заразни и Паразитни болести, Отдел Паразитология и тропическа медицина, [2]Национален Център по Заразни и Паразитни болести, Отдел Микробиология, [3]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 PCR. ***Цел*** на настоящето проучване и да установим и сравним практически ефективността на микроскопските оцветителни методи в диагностиката на пневмоцистната пневмония. ***Материали/Методи*:** За целите на проучването са използвани оцветителни микроскопски методи за морфологична диагностика, както и real-time PCR. Всички диагностични процедури са извършени в НРЛ „Диагностика на паразитозите“, НЦЗПБ. Използвани са също анамнестични, клинични, имунологични и параклинични данни. ***Резултати*:** За периода 2020 г. до юни 2021 г. са изследвани общо 56 клинични материала (храчки, трахеални аспирати и БАЛ) с оцветителни микроскопски методи. Всеки постъпил материал, освен с PCR, беше изследван и морфологично, с три от най- често използваните в практиката оцветителни микроскопски методи: Романовски- Гимза, толуидин- блау и Гомори. От всички изследвани материали, при 26 се доказа ДНК на *P. jirovecii*, от които при осем (30.7%) открихме цисти на *P. jirovecii* в трайни микроскопски препарати оцветени по Гомори. В клиничните материали оцветени по Романовски-Гимза и толуидин блау не се откриха форми на *P. jirovecii*. ***Заключение*:** Диагностичната стойност на оцветителните микроскопски методи при пневмоцистозата е над три пъти по-ниска от тази на real time - PCR. От всички използвани оцветителни микроскопски методи, с най-висока диагностична стойност е оцветяването по Гомори, прието за селективно по отношение на *P. jirovecii*. Макар и първоначални, данните от нашето проучване ни дават основание да считаме че използването на real-time PCR е препоръчително за недопускане на пропуски в диагностиката на пневмоцистозата.

***Ключови думи:*** пневмоцистоза; микроскопска диагностика; оцветителни методи;

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

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

R. Borisova[1], R. Harizanov[1], N. Tsvetkova[1], A. Ivanova[1], M. Videnova[1], V. Levterova[2], N. Yancheva[3], D. Strashimirov[3]

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

[2]National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Department of Microbiology

[3]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. Each clinical material, in addition to PCR, was examined morphologically, with three of the most commonly used in the practice of staining microscopic methods: Romanowski-Giemza, toluidine blue and Gomori.

**Aim** of the present study is to establish and compare in practice the effectiveness of microscopic methods used for diagnosis of human pneumocystosis.
**Materials/Methods:** For the purposes of the study, staining microscopic methods for morphological diagnosis were used, as well as real-time PCR. 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 2020 to June 2021, a total of 56 clinical materials (sputum, tracheal aspirates and BAL) were examined by staining microscopic methods. Of all the examined materials, in 26 was detected *P. jirovecii* DNA, of which in eight (30.7%) were found cysts of *P. jirovecii* in permanent stained by Gomori method slides. No forms of *P.*
*jirovecii* were detected in clinical materials stained by Romanowski-Giemza and toluidine blue methods.
**Conclusion:** The diagnostic value of microscopic methods in pneumocystosis is more than three times lower than that of the real time - PCR. Of all microscopic methods used in our study, with highest diagnostic value was staining method by Gomori, which is considered as selective for *P. jirovecii*. Although initial, the data from our study give us reason to believe that the use of real-time PCR is recommended to prevent gaps in the diagnosis of pneumocystosis.
**Keywords**: pneumocystosis; microscopic diagnosis; staining methods

**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 (ProjectBG05M2OP001-1.002-0001,“Fundamental,Translational and Clinical Investigations On Infections and Immunity”) to the Ministry of Education and Science of the Republic of Bulgaria.

## 8. СРАВНЕНИЕ НА ДИАГНОСТИЧНАТА СТОЙНОСТ НА ДВА ТАРГЕТНИ ГЕНА ЗА ОТКРИВАНЕ НА PNEUMOCYSTIS JIROVECII В КЛИНИЧНИ ПРОБИ ЧРЕЗ REAL-TIME PCR

А. Иванова[1], Н. Цветкова[1], Р. Харизанов[1], Р. Борисова[1], М. Виденова[1], И. Райнова[1],И. Кафтанджиев[1], Е. Кънева[1], В. Левтерова[2], И. Симеоновски[2], Н. Янчева-Петрова[3], Д. Страшимиров

– Отдел Паразитология и тропическа медицина, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София; 2– Отдел Микробиология, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София; 3– СБАЛИПБ "Проф. Иван Киров", отделение за лечение на придобита имунна недостатъчност

***Ключови думи***: *Pneumocystis jirovecii,* real-time PCR, диагностика

*Pneumocystis jirovecii* може да причини животозастрашаваща пневмония основно при имунокомпрометирани пациенти. Класическата диагностика разчита на директна визуализация на патогена в оцветени препарати от бронхоалвеоларен лаваж, но методът е с ниска чувствителност и налага прилагането на инвазивни процедури. Високата чувствителност и специфичност на молекулярните методи за диагностика, в частност real-time PCR, позволяват използването на клинични материали, които не изискват инвазивни процедури за тяхното получаване (индуцирана храчка, храчка, аспирати от носоглътка, промивки на устната кухина). ***Цел*** на настоящото проучване е да се определи и сравни чувствителността и специфичността на real-time PCR с два различни таргетни гена – mt LSU и kex1. ***Материали/методи:*** В Националната референтна лаборатория „Диагностика на паразитозите", НЦЗПБ са изследвани 232 проби (трахеален аспират, индуцирана храчка и бронхоалвеоларен лаваж или изолирана ДНК) на пациенти суспектни за пневмоцистна пневмония или с друга белодробна патология. За извличане на ДНК от клиничните материали беше използван PureLink ™ Genomic DNA комплект (invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Северна Америка), следвайки инструкциите на производителя и Chelex 100® (Bio-Rad Laboratories, Inc). ***Резултати:*** От изследваните 232 проби с real-time PCR за детекция на mt LSU гена открихме 38 положителни проби (16,4%), като същите резултати получихме и с real- time PCR за детекция на kex1 гена. ***Заключение:*** Изследването на клинични проби за наличие/отсъствие на ДНК на *P. jirovecii* с real-time PCR увеличава откриваемостта на патогена и позволява своевременна диагностика и лечение на засегнатите пациенти. Въпреки че kex1 генът е еднократно представен в генома на патогена (mt LSU е многократно повторен), нашите данни са за идентична чувствителност и специфичност на методите за детекция на тези два таргетни гена.

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

## 8. COMPARISON OF THE DIAGNOSTIC VALUE OF TWO TARGET GENES FOR DETECTION OF *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* IN CLINICAL SAMPLES BY REAL-TIME PCR

A. Ivanova[1], N. Tsvetkova[1], R. Harizanov[1], R. Borisova[1], M. Videnova[1], I. Rainova[1], I. Kaftandjiev[1], E. Kaneva[1], V. Levterova[2], I. Simeonovski[2], N. Yancheva-Petrova[3], D. Strashimirov[3]
– Department of Parasitology and Tropical Medicine, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia 2 – Department of Microbiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia 3– Specialized hospital for infectious and parasitic diseases, AIDS department
**Keywords**: *Pneumocystis jirovecii*, real-time PCR, diagnostics
*Pneumocystis jirovecii* can cause life-threatening pneumonia, mainly in immunocompromised patients. Classical diagnosis is based on staining and direct microscopic visualization of the pathogen in bronchoalveolar lavage fluid, however the method has low sensitivity and invasive procedures for the specimen collection are applied. High sensitivity and specificity of molecular diagnostic methods, in particular real-time PCR, allow samples that do not require invasive procedures for their obtaining to be used (induced sputum, sputum, nasopharyngeal aspirates, mouthwashes, etc.).
The aim of the present study was to determine and compare the sensitivity and specificity of real-time PCR with two different target genes – mt LSU and kex1.

**Materials/Methods**: In the National Reference Laboratory for Diagnosis of Parasitic Diseases, NCIPD were tested 232 samples (tracheal aspirate, induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid or previously isolated DNA) of patients suspected of having *Pneumocystis* pneumonia or with other pulmonary pathology. DNA was extracted from the clinical materials using a PureLink ™ Genomic DNA kit (invitrogen, Thermo Fisher Scientific, North America) following the manufacturer's instructions and Chelex 100® (Bio-Rad Laboratories, Inc).

**Results**: From the 232 samples examined by real-time PCR targeting mt LSU gene 38 (16.4%) samples were positive. The same results were obtained with real-time PCR for detection of the kex1 gene.
**Conclusion**: The study of clinical specimens for the presence/absence of *P. jirovecii* DNA by real-time PCR increases the pathogen detection rates and allows timely diagnosis and treatment of infected patients. Although the kex1 gene is present at a single copy in the pathogen genome (mt LSU is multicopy gene), our data show identical sensitivity and specificity of the methods for detection of these two target genes.
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.

## 9. МОЛЕКУЛЯРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА МЕХАНИЗМИТЕ НА РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ КОЛИСТИН ПРИ КАРБАПЕНЕМАЗА ПРОДУЦИРАЩИ KLEBSIELLA PNEUMONIAE ИЗОЛИРАНИ В БЪЛГАРИЯ

К. Иванова* [1], И. Иванов[1], С. Събчева[2], В. Добринов[1], Е. Добрева[1], Р. Христова[1], Т. Кантарджиев[1]

Национален център по инфекциозни и паразитни болести, София, България, Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология (Национален онкологичен център), София, България

***Въведение*** **:** Разнообразни терапевтични алгоритми включващи колистин се използват успешно за лечение на инфекции от карбапенемаза продуциращи *Klebsiella pneumoniae* (CPKP). Все по-често обаче се съобщава за хромозомно и плазмидно медиирана резистентност към колистин (CR), компрометираща дори комбинаторните терапевтични режими. В това проучване бяха установени молекулярните механизми асоциирани с устойчивост на колистин и полимиксини в клинични CPKP изолати, потвърдени в Националната референтна лаборатория по контрол и мониториране на AMP в България в периода 2013 - 2018 г.

***Материали / методи*** **:** Колекция от 322 недублирани CPKP с PCR-потвърдени карбапенемази беше изпитана за резистентност към колистин съгласно EUCAST. Гените кодираши карбапенемази, ESBL, pAmpC, плазмидни аминогликозидни и детерминанти на резистентност към хинолони бяха изследвани чрез PCR и ДНК секвениране. Проведено беше генотизипиране чрез MLVA8, MLST и PBRT. PCR доказване на *mcr-1* до *8*, секвениране на целия *mgrB*, *phoPQ*, *pmrAB* и *crrB* както и qRT-PCR за нивата на експресия на *pmrCDH*, *phoP* и *crrC* бяха извършени за проучване на механизмите на резистентност към колистин.

***Резултати:*** Потвърдени бяха четиридесет CPKP щама устойчиви на колистин. От тях 23 (57%) бяха XDR, 9 (22%) бяха PDR и 8 бяха MDR. *bla*NDM-1 бе доказан в 33 щама (от осем болници), всички принадлежащи към ST11 и асоциирани с IncA/C плазмиди, докато седем щама бяха KPC-2 - продуценти, разпределени в ST15 и ST258. ArmA, допринасящ за PDR фенотипа, бе открит в единадесет щама ST11 от четири болници, всички ко-продуциращи NDM-1 и blaCTX-M-3/15. CMY-4 беше доказан в 25 щама всички ST11 NDM-1 продуценти. Гените *qnrB2* и *aac-(6')-Ib-cr* бяха открити съответно в 15 и 9 щама. Плазмидна *mcr*-медиирана резистентност не беше установена, но разнообразни мутации или пълна липса на *mgrB* се оказаха отговорни отговорни за CR при 80% от изолатите. Повечето от новите missense замени открити в *mgrB*, *pmrB* и *phoPQ*, както и един нов индел в *mgrB* бяха определени чрез in-silico биоинформатичния анализ като „вредни“ с висока степен на вероятност. Наблюдавахме сходен модел на експресия свързан със значителната позитивна регулация (стимулация) на оперона L-Ara4-N, в следствие на *pmrD*-медиирана активация на *phoPQ* и *pmrAB*.

***Заключения:*** Колистин беше регистриран в България през 2014 г., но по-широката му употреба в болниците започна през 2015 г. Това проучване показва, че CR-CPKP са въведени в страната преди употребата на колистин. От важно значение е, че до 2016г CR са асоциирани най-вече с MDR/XDR, а PDR щамовете се появяват вероятно през 2017 г. след придобиване на гена *armA*, обуславящ високо ниво на резистентност спрямо всички аминогликозиди.

***Финансиране***: Проучването е частично подкрепено от Фонд научни изследвания по проект № КП-06-М23/6

## 9. MOLECULAR INSIGHT INTO COLISTIN RESISTANCE MECHANISMS ASSOCIATED WITH CARBAPENEMASE- PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATED IN BULGARIA

K. Ivanova[1]*, I. Ivanov[1], S. Sabtcheva[2], V. Dobrinov[1], E. Dobreva[1], R. Hristova[1], T. Kantardjiev[1]

1- National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria, 2- National Oncology Center - USHATO, Sofia,

**Background:** Colistin-based antimicrobial regimes have been used successfully for the treatment of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* (CPKP) infections, but mutational and plasmid-mediated colistin resistance (CR) has been increasingly reported, compromising even the combinatorial therapeutic algorithms. We report molecular mechanisms in colistin-resistant clinical isolates detected among CPKP referred to the National Reference Laboratory for AMR in Bulgaria between 2013 and 2018.

**Materials/methods:** A collection of 322 non-duplicate CPKP from 18 hospitals with PCR-confirmed carbapenemases was screened for CR by the BMD method according to EUCAST v9. Carbapenemase genes, ESBL, pAmpC, plasmid aminoglycoside and quinolone resistance determinants were studied by PCR and sequencing. Genotyping by MLVA8, MLST and PBRT was conducted. PCR detection of mcr genes 1 to 8, sequencing of the entire mgrB, phoPQ, pmrAB and crrB and qRT-PCR for the expression levels of pmrCDH, phoP and crrC were performed for studying mechanisms of colistin resistance.

**Results:** Forty colistin resistant CPKP strains were confirmed. Of these, 23(57%) were XDR, 9(22%) were PDR and 8 were MDR. The blaNDM-1 was detected in 33 strains (from eight hospitals) all belonging to ST11 and associated with incA/C plasmids whereas seven strains were KPC-2 producers distributed in ST15 and ST258. *ArmA* contributing to the PDR phenotype was detected in eleven ST11 strains from four hospitals, all co-producing NDM-1 and CTX-M-3/15. CMY-4 was detected in 25 strains all ST11 and harbouring NDM-1. The qnrB2 and *aac(6')Ib-cr* genes were found in 15 and 9 strains respectively. While *mcr* genes were absent, various alterations or complete lack of the *mgrB* were responsible for CR in 80% of the isolates. Most of the novel missense substitutions found in *mgrB*, *pmrB* and *phoPQ* as well as an indel in *mgrB* were predictably deleterious. A common expression pattern was observed, consistent with a significant upregulation of the L-Ara4-N operon apparently through increased *phoPQ* and *pmrAB* activation and mediated by *pmrD*.

**Conclusions:** Colistin was registered in Bulgaria in 2014 but its use in hospitals was effectively initiated in 2015. This study shows that CR-CPKP has been introduced prior to colistin use. Noteworthy, CR has been associated mostly with MDR/XDR CPKP up to 2016 and the PDR strains seem to emerge in 2017 following the apparent acquisition of the *armA* gene resulting in complete resistance to aminoglycosides.

**Acknowledgements:** The study is partially supported by The Bulgarian National Science Fund under Grant No КП-06-М23/6

## 10. ОТКРИВАНЕ НА ГЕНИ ЗА АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И ВИРУЛЕНТНИ ФАКТОРИ ПРИ ИНТЕСТИНАЛНИ ВАНКОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНИ ЕНТЕРОКОКИ

П. Христова[1], В. Нанков[4], Д. Георгиева[1], Т. Българанова[1], И. Стойков[3], К. Стаменов[4], И. Иванов[3], Х. Хиткова[1],

[1] Катедра по Микробиология и Вирусология, Медицински университет - Плевен

[2] Университетска Лаборатория за Научни Изследвания, Медицински университет - Плевен

[3] Националната Референтна Лаборатория "Контрол и Мониториране на Антибиотичната Резистентност", НЦЗПБ, София

[4] Отделение по Клинична Микробиология, Болница Токуда - София

**Целта** на проучването беше да се установят гени, кодиращи антимикробна резистентност и фактори на вирулентност при интестинални VRE, изолирани от пациенти в интензивни отделения.

Материали и методи

Изследвани бяха 23 VRE (7 *E.faecium*, 9 *E.casseliflavus* и 7 *E.gallinarum*). МПК към девет антимикробни препарата бяха определени чрез Е-тест. Мултиплексен PCR беше използван за детекцията на гени, кодиращи ванкомицинова резистентност (*vanABCDMN*), аминогликозид-модифициращи ензими (*aac(6')-Ie-aph(2")-Ia, aph(3')-IIIa, ant(4')-Ia, aph(2")-Ic, aph(2")-Ib, aph(2")-Id, ant(3")-III, ant(6')-Ia*) и вирулентни фактори (*ace, asa1, cylA, efaA, esp, gelE* и *hyl*).

Резултати

VR *E.fm* показаха близки модели на чувствителност. Наблюдаваше се високо ниво на резистентност към ванкомицин (МПК≥256 μg/ml) и вариращи МПК за тейкопланин (6–256 μg/ml). При всички беше потвърден *vanA*. Шест *E.fm* бяха с МПК≥1024 μg/ml за гентамицин и един – 12 μg/ml. При всички изолати беше открит *aac(6')-Ie-aph(2")-Ia* и при един – *aph(3')-IIIa*. Генът *vanC1* беше идентифициран при *E.gall*, а *vanC2* – при *E.cass*. Четиринадесет vanC ентерококи показаха един и същ модел на чувствителност. Един *E.gall* беше високо резистентен на ампицилин, ципрофлоксацин, гентамицин и носеше *aac(6')-Ie-aph(2")-Ia* и 1 *E.casseliflavus* с резистентентност към ципрофлоксацин, умерена резистентентност към гентамицин и позитивен за *ant(3'')-III*. Генът *esp* беше потвърден при всички *E.fm*, а при един от тях и *hyl*. Всички vanC ентерококи носеха *hyl*, докато 4 *E.gall* и 2 *E.cass* имаха и *efaA*. Един *E.cass* беше позитивен за *hyl*, *gelE*, *esp* и *cylA*.

Заключение

VR *E.fm* показаха подобен модел на чувствителност с вариации на МПК за тейкопланин и гентамицин, което предполага циркулация на три различни щама. HLGR при VRE е най-често медиирана от *aac(6')-Ie-aph(2")-Ia* гена. Най-честите гени, кодиращи продукция на вирулентни фактори бяха *hyl*, *esp* и *efaA*. Гените за вирулентни фактори преобладаваха при vanC ентерококите, в сравнение с *E. fm*.

**Ключови думи**: ванкомицин-резистентни ентерококи, гени за резистентност, вирулентни фактори

**Кореспондиращ автор:** д-р Преслава Михайлова Христова
Катедра "Микробиология и Вирусология" Факултет „Фармация"
Медицински университет - Плевен ул. „Климент Охридски" 1
Плевен 5800, Телефон: +359 883 372 361

## 10. DETECTION OF GENES FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS IN INTESTINAL VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI

P. Hristova[1], V. Nankov[2], D. Georgieva[1], T. Bulgaranova[1], I. Stoikov[3], K. Stamenov[4], I. Ivanov[3], H. Hitkova[1]

[1] Department of Microbiology and Virology, Medical University - Pleven

[2] University Scientific Research Laboratory, Medical University - Pleven

[3] National Reference Laboratory for Control and Monitoring of Antimicrobial Resistance, National Center of Infectious and Parasitic Diseases - Sofia

[4] Department of Clinical Microbiology, Tokuda Hospital - Sofia

The **aim** of the study was to determine genes encoding antimicrobial resistance and virulence factors in intestinal VRE isolated from ICU patients.

Materials and methods

A total of 23 VRE (7 *E.faecium*, 9 *E.casseliflavus* и 7 *E.gallinarum*) were tested. MICs to nine antimicrobials were examined by E-test. Multiplex PCR was used for detection of genes encoding vancomycin resistance (*vanABCDMN*), aminoglycoside modifying enzymes (*aac(6')-Ie-aph(2")-Ia, aph(3')-IIIa, ant(4')-Ia, aph(2")-Ic, aph(2")-Ib, aph(2")-Id, ant(3")-III, ant(6')-Ia*) and virulence factors (*ace, asa1, cylA, efaA, esp, gelE* and *hyl*).

Results

VR *E.fm* showed similar susceptibility patterns. High-level resistance to vancomycin (MIC≥256 μg/ml) and varied teicoplanin MICs (6–256 μg/ml) were observed. The *vanA* was confirmed in all of them. Six *E.fm* had gentamicin MICs≥1024 μg/ml and one – 12 μg/ml. In all isolates was found *aac(6')-Ie-aph(2")-Ia* and in one of them – *aph(3')-IIIa*. The *vanC1* gene was identified in *E.gall* and *vanC2* – in *E.cass*. Fourteen vanC enterococci expressed the same susceptibility pattern. One *E.gall* was highly resistant to ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin and it carried *aac(6')-Ie-aph(2")-Ia* and 1 *E.cass* with resistance to ciprofloxacin and moderate resistance to gentamicin and positive for *ant(3'')-III*. The *esp* was confirmed in all *E.fm* and in one of them – *hyl*. All vanC enterococci were carrying *hyl*, whereas 4 *E.gall* and 2 *E.cass* had and *efaA*. One *E.cass* was positive for *hyl*, *gelE*, *esp*, c*ylA*.

Conclusion

VR *E.fm* isolates expressed a similar susceptibility pattern with MIC variations for teicoplanin and gentamicin that suggested circulation of three different strains. HLGR in VRE was most commonly mediated by *aac(6')-Ie-aph(2")-Ia*. The frequent genes encoding virulence factors were *hyl*, *esp* and *efaA*. The genes for virulence factors were prevalent in vanC enterococci compared to *E.fm*.

**Key words**: vancomycin-resistant enterococci, genes for resistance, virulence factors

Corresponding author

Preslava Mihaylova Hristova, MD Department of Microbiology and Virology Faculty of Pharmacy

Medical University - Pleven 1 St. Kliment Ohridski str. Pleven 5800

Telephone: +359 883 372 361

## 11. IN VITRO ПРОУЧВАНЕ НА СИНЕРГИЗМА И АНТАГОНИЗМА НА РАЗЛИЧНИ АНТИБИОТИЧНИ КОМБИНАЦИИ СРЕЩУ ЕКСТЕНЗИВНО РЕЗИСТЕНТНИ *K. PNEUMONIAE* ОТ ИНТЕНЗИВНИ ОТДЕЛЕНИЯ

Е. Добрева[1], И. Н. Иванов[1], К. Иванова[1], Р. Христова[1], В. Добринов[1], С. Събчева[2], Т. Кантарджиев[1]

1-Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ), София; 2-Университетска Специализирана Болница за Активно Лечение по Онкология ЕАД (УСБАЛО), София

**Въведение:** Екстензивно резистентните *Klebsiella pneumoniae* (XDR-KP) причиняват животозастрашаващи инфекции при имунокомпрометирани пациенти в интензивни отделения. Един от основните проблеми с XDR-KP инфекциите са ограничените опции за лечение, поради множеството механизми на антимикробна резистентност (АМР), което превръща комбинираната антибиотична терапия в окуражаваща възможност в преодоляването им. **Цел:** In vitro проучване на синергизма и антагонизма на различни двойни антибиотични комбинации с меропенем и/или колистин срещу XDR-KP от интензивни отделения. **Материали/методи**: В настоящето проучване са подбрани осем щама *K. pneumoniae*, изпратени в НРЛ-КМАР от интензивни отделения на шест болници в страната. Изолатите са получени от кръв (3/8); ранев ексудат (2/8); урина (1/8); трахеобронхеален ексудат (1/8) и цереброспинална течност (1/8). Идентификацията на *K. pneumoniae* е извършена с MALDI-TOF MS спектрофотометрия (Bruker Daltonics Inc., USA). Антимикробната чувствителност е определена чрез отчитане на минималната инхибираща концентрация (МИК, mg/L) в бульон (Micronaunt-S, MDR, MRGN Screening plate, Bruker) и ленти (E-test strips, Liofilchem), съобразно критериите на EUCAST. За проучване на комбинираното взаимодействие на антибиотиците, двата Е- теста се кръстосват перпендикулярно върху апликационна система (MTS-SAS, Liofilchem) в точка на пресичане, получена от МИК стойностите им Изчислява се индексът на фракционна инхибираща концентрация (ФИК) и се интерпретира in vitro ефекта от взаимодействието като: синергизъм (ФИК ≤ 0.5); с натрупване (ФИК > 0.5 и≤1.0), индиферентно (ФИК > 1.0 и ≤ 4.0) и антагонизъм (ФИК > 4.0). Приложен е multiplex EG real time PCR метод за доказване на гени, кодиращи синтеза на карбапенем хидролизиращи ензими.
**Резултати:** Съобразно резултатите за антимикробна чувствителност и международно приетите дефиниции, осемте изолата *K. pneumoniae* са определени като характеризиращи се с екстензивна лекарствена резистентност (XDR-KP). Получените стойности за МИК на меропенем (16- >128 mg/L), колистин (8- >16 mg/L), фосфомицин (≤16- > 64 mg/L) и рифампицин (12- >256 mg/L) се прилагат, за in vitro проучване на пет двойни антибиотични комбинации: меропенем-колистин; меропенем-фосфомицин; меропенем-рифампицин; колистин-фосфомицин и колистин-рифампицин. Комбинациите с най-висок синергичен ефект са: колистин-рифампицин срещу 75% (6/8) от изследваните изолати; меропенем-колистин срещу 62.5% (5/8); меропенем-фосфомицин срещу 62.5% (5/8); меропенем-рифампицин срещу 50% (4/8) и с най-нисък колистин-фосфомицин срещу 12.5% (1/8). Комбинацията колистин-фосфомицин е с най-висок ефект на натрупване срещу 62.5% (5/8) от проучените XDR-KP. Антагонизъм не е установен при нито една от приложените комбинации. Пет от изследваните изолати *K. pneumoniae* са продуценти на NDM-1 ензим (метало-β-лактамаза), а KPC-2 се доказва при три от проучените XDR-KP.**Заключение:** Най-висок синергичен ефект имат комбинациите меропенем-колистин и меропенем-фосфомицин срещу NDM-1-продуциращите *K. pneumoniae*, а срещу KPC-2 продуцентите колистин-рифампицин. Антимикробната комбинирана терапия с ефект

на синергизъм или с натрупване може да се окаже единствен изход за лечение на високо рискови пациенти от интезивни отделения със сериозни инфекции от XDR *K. pneumoniae.* Получените in vitro резултати от двойните антимикробни комбинации на меропенем и/или колистин с рифампицин и фосфомицин е необходимо да бъдат подкрепени с допълнителни in vivo анализи от клиничната практика.

Финансирането на проведените анализи е осъществено от Фонд научни изследвания по проект КП-06-М23/5 от 19.12.2018.

**Ключови думи:** in vitro антимикробни комбинации, синергизъм, антагонизъм

## 11. IN VITRO INVESTIGATION OF SYNERGY AND ANTAGONISM OF DIFFERENT ANTIBIOTIC COMBINATIONS AGAINST EXTENSIVE DRUG RESISTANT *K. PNEUMONIAE* FROM INTENSIVE CARE UNITS

E. Dobreva[1], I. N. Ivanov[1], K. Ivanova[1], R. Christova[1], V. Dobrinov[1], S. Sabtcheva[2], T. Kantardjiev[1]
National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia
Specialized Hospital of Active Treatment of Oncology (SHATO), Sofia

**Introduction**: Extensively resistant *Klebsiella pneumoniae* (XDR-KP) cause life-threatening infections in immunocompromised patients in intensive care units. One of the main problems with XDR-KP infections are limited treatment options due to the numerous mechanisms of antimicrobial resistance (AMR), which makes combined antibiotic therapy an encouraging opportunity in overcoming them.

**Purpose:** In vitro study of synergism and antagonism of various double antibiotic combinations with meropenem and/or colistin against XDR-KP from intensive care units.

**Materials/methods:** Eight *K. pneumoniae* from intensive care units at six hospitals in the country were sent to the NRL-CMAR. Isolates were derived from blood (3/8); wound exudate (2/8); urine (1/8); tracheobroncheal exudate (1/8) and cerebrospinal fluid (1/8). The identification of *K. pneumoniae* was performed with MALDI-TOF MS spectrophotometry (Bruker Daltonics Inc., USA). Antimicrobial susceptibility testing was made by determination of minimal inhibitory concentration (MIC, mg/L) with broth microdilution methods (Micronaunt-S, MDR, MRGN Screening plate, Bruker) and individual MIC-tests (E-strips, Liofilchem) according to EUCAST. Interaction effect of antimicrobials in combination was analyzing by placing E-tests at 90º on applicator system (MTS-SAS, Liofilchem) at the point of intersection of their individual MICs values. The effects of double antimicrobial combinations were defined as: synergy (FIC $\leq$ 0.5); additive (FIC > 0.5 to $\leq$ 1.0); indifference (FIC >1 to $\leq$ 4.0) and antagonism (FIC > 4).
Multiplex Eva green real time polymerase chain reaction was used to detect carbapenemases encoding genes.

**Results:** The eight isolates *K. pneumoniae* were characterized as extensive drug resistant (XDR-KP) according to antimicrobial sensitivity tests and internationally accepted definitions. Results for meropenem MIC (16- >128 mg/L), colistin (8- >16mg/L), fosfomycin ($\leq$ 16- >64 mg/L) and rifampicin (12- >256 mg/L) were used for in vitro investigation of five double antibiotic combinations: meropenem-colistin; meropenem-fosfomycin; meropenem-rifampicin; colistin-fosfomycin and colistin-rifampicin. The combinations with the highest synergistic effect are: colistin-rifampicin against 75% (6/8) of the investigated isolates; meropenem-colistin 62.5% (5/8); meropenem-fosfomycin 62.5% (5/8); meropenem-rifampicin 50% (4/8) and with the lowest effect is colistin-fosfomycin against 12.5% (1/8) XDR-KP. The colistin-fosfomycin has the most additive effect of antibiotic interaction against 62.5% (5/8) of the *K. pneumoniae*. Antagonism has not been established in any of the in vitro applied combinations. Five *K. pneumoniae* are producers of NDM-1 enzyme (metalo-β-lactamases) and KPC-2 is detected in three of the studied XDR-KP.

**Conclusion:** The highest synergistic effect has the combinations meropenem-colistin and meropenem-fosfomycin against NDM-1-producing *K. pneumoniae*, and colistin-rifampicin against KPC-2 producing isolates. Antimicrobial combination therapy with synergistic or additive effect may be the possible options for treatment of high-risk patients with serious XDR *K. pneumoniae* infections from intensive care units. The in vitro obtained results from double antimicrobial combinations of meropenem and/or colistin with rifampicin and fosfomycin need to be supported by additional in vivo clinical practice results.

These analyses were funded by Science National Fund, project КП-06-М23/5, 19.12.2018.

**Key words:** in vitro antimicrobial combinations, synergy, antagonism

## 12. МУТАЦИИ, ПРЕДИЗВИКВАЩИ ЛЕКАРСТВЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ ПАЦИЕНТИ ИНФЕКТИРАНИ С HIV-1 CRF01_AE В БЪЛГАРИЯ

Любомира Григорова[1], Александра Парцунева[1], Ренета Димитрова[1], Анна Ганчева[1], Ася Костадинова[1], Ивайло Еленков[2], Нина Янчева[2], Мариана Стойчева[3], Цеца Дойчинова[4], Лилия Пекова[5], Минас Козмидис[6], Мария Николова[7] , Радослава Емилова[7] и Ивайло Алексиев[1]
Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV, НЦЗПБ, София
Специализирана болница по инфекциозни и паразитни болести, София
Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Пловдив
Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Плевен
Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Стара Загора
Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Варна
7. Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София
**Ключови думи:** HIV-1, CRF01_AE, лекарствена резистентност
**Цел:** Целта на това проучване е да се определят характеристиките на субепидемията от субтип CRF01_AE в България и да се анализират мутации предизвикващи лекарствена резистентност.
**Материали и методи:** Изследвани са серумни/плазмени проби от пациенти с HIV, събрани между 1995 и 2019 г. в НРПЛ по HIV, НЦЗПБ. Вирусна РНК беше екстрахирана в съответствие с протокола на Abbott ViroSeq™ HIV-1 Genotyping Test. HIV-1 *pol* генът беше секвениран с генетичния анализатор Applied Biosystems 3130xl. Субтип CRF01_AE беше определен с инструментите REGA и COMET. MicrobeTrace определи клъстерите и трансмисионните връзки между изследваните проби. Анализ на мутациите беше извършен със Stanford HIV drug resistance database.
**Резултати:** Филогенетичен анализ установи, че през 2002 г. CRF01_AE е въведен в групата на употребяващите интравенозни наркотици (УИН). Седем години по-късно е открито епидемично огнище, включващо 26 новодиагностицирани лица в София със субтип CRF01_AE. От тях 69,2% се самоопределят, като УИН. До края на 2019 г. при 270 лица с HIV-1 инфекция беше установен субтип CRF01_AE. Анализът установи, че при CRF01_AE в сравнение с инфекции от друг субтип процентът на УИН е по-висок (52,2%). Хетеросексуалните са аналогичен с другите субтипове процент (37,4%). Най-малко засегнати от CRF01_AE са мъжете, които правят секс с мъже (МСМ) (4,8%). При пациентите със CRF01_AE е установено ниско разпространение на резистентни мутации (РМ) - 18,9%. Идентифицирани са 2 случаи на мултирезистентност, включващи, протеазни инхибитори (PI), нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NRTI) и ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTI). 8 пациенти са с двойна резистентност към NRTI и NNRTI. Най- разпространени са M184V (31,6%), при NRTI и E138A (17,1%), при NNRTI.
**Изводи:** Вторият най-често срещан субтип в България е CRF01_AE с най-голям дял в трансмисионната група на УИН. Необходимо е да се провежда непрекъснато молекулярно-вирусологично наблюдение и анализ на субепидемията от субтип CRF01_AE в България.

**Благодарности:** Проучването е финансирано по проект от Министерството на образованието и науката (договор: КП-06-Н43/1 27.11.2020) 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, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“.

## 12. DRUG RESISTANCE MUTATIONS IN HIV-1 CRF01_AE IN BULGARIA

Lyubomira Grigorova[1], Alexandra Partsuneva[1], Reneta Dimitrova[1], Anna Gancheva[1], Asya Kostadinova[1], Ivaylo Elenkov[2], Nina Yancheva[2], Mariana Stoycheva[3], Tsetsa Doichinova[4], Lilia Pekova[5], Minas Kozmidis[6], Maria Nikolova[7], Radoslava Emilova[7] and Ivaylo Alexiev[1]

National Reference Confirmatory Laboratory of HIV, NCIPD, Sofia
Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
Department of Infectious Diseases, Medical University, Plovdiv
Department of Infectious Diseases, Medical University, Pleven
Clinic of Infectious Diseases, Medical University, Stara Zagora
Clinic of Infectious Diseases, Medical University, Varna
National Reference Laboratory of Immunology, NCIPD, Sofia Key words: HIV-1, CRF01_AE, drug resistance

**Aim:** The aim of this study is to determine the characteristics of subtype CRF01_AE subepidemic in Bulgaria and to analyze mutations causing drug resistance.

**Materials and methods:** Serum / plasma samples from HIV patients collected between 1995 and 2019 in the NRCL of HIV, NCIPD were studied. Viral RNA was extracted according to Abbott ViroSeq ™ HIV-1 Genotyping Test protocol. The HIV-1 *pol* gene was sequenced with Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer. Subtype CRF01_AE was defined with REGA and COMET tools. MicrobeTrace determined clusters and transmission links between tested samples. Mutation analysis was performed with Stanford HIV Drug Resistance Database.

**Results:** Phylogenetic analysis revealed that in 2002 CRF01_AE was introduced into the group of persons who inject drugs (PWID). Seven years later, an outbreak was detected involving 26 newly diagnosed individuals in Sofia with subtype CRF01_AE. Of these, 69.2% identified as PWID. By the end of 2019, subtype CRF01_AE had been identified in 270 people with HIV-1 infection. Analysis found higher percentage of CRF01_AE PWID (52.2%) compared to non- CRF01_AE infections. Heterosexuals percentage is similar to other subtypes (37.4%). Men who have sex with men are the least affected by CRF01_AE (4.8%).

In patients with CRF01_AE, a low prevalence of drug resistance mutations was found - 18.9%. Two cases of multidrug resistance have been identified, including protease inhibitors (PI), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). 8 patients have dual resistance to NRTI and NNRTI. Most common are M184V (31.6%) in NRTI and E138A (17.1%) in NNRTI.

**Conclusions:** Second most common subtype in Bulgaria was CRF01_AE most affected group were PWIDs. It is necessary to conduct continuous molecular virological monitoring and analysis of subtype CRF01_AE subepidemic in Bulgaria.

**Acknowledgments:** The study was supported by the by a grant from the Ministry of Education and Science, Bulgaria (contract: КП-06-Н43/1 27.11.2020); 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”.

## 13. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА РЕЗИСТЕНТНИ ЩАМОВЕ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ESBL И NDM-1, ИЗОЛИРАНИ ОТ ХЕМОКУЛТУРИ НА ПАЦИЕНТИ, ЗА ПЕРИОД ОТ 5 ГОДИНИ В УМБАЛСМ „Н.И. ПИРОГОВ"

Мария Малчева[1], Цветелина Господинова[1], Магдалена Лесева[1], Цано Чалашканов[1], Стефана Събчева[2].
– Лаборатория по Микробиология, Университетската многопрофилна болница за активно лечение и спешна медицина (УМБАЛСМ) „Н.И. Пирогов ", гр. София
– Лаборатория по Микробиология, Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология (УСБАЛО), гр. София

**Въведение:** Първите случаи на New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM) *Klebsiella pneumoniae* (NDM) продуциращи щамове *Klebsiella pneumoniae* в България са описани през 2016 г. при пациенти на две болници, като една от тях е Университетската многопрофилна болница за активно лечение и спешна медицина (УМБАЛСМ) „Н.И. Пирогов ". Оттогава насам в Болницата активно се следи за появата и разпространението на резистентни щамове, като сред най-опасните от тях са изолатите от пациенти със сепсис.

**Целта на** проучването е да се проследи разпространението на резистентните
*K.pneumoniae* при септично болни за период от 5 години.

**Материали и методи:** Представеното проучване е ретроспективно за периода 2016 - 2020 г. и включва всички изследвани (28778) хемокултури от пациенти със съмнение за сепсис. Пробите кръв са инкубирани в BacT/Alert устройство за хемокултури. Идентифицирането на изолатите е извършено чрез биохимични тестове и автоматизирана система Vitek 2 Compact. Антимикробната чувствителност е тествана чрез диск-дифузионен метод и MIC за колистин съгласно EUCAST.

**Резултати:** Положителните хемокултури от всички анализирани проби са 4507 (15,7%), вариращи от 13% през 2018г. до 19% през 2020г. Относителният дял на изолатите на *K.pneumoniae* варира от 3,5% през 2016 г., 8,4% през 2017 г., 7,7% през 2018 г., 8,7% през 2019 г. и 6,9% през 2020 г. ESBL позитивните изолати са от 92,3% през 2016 г., 96,5% през 2017 г., 79,4% през 2018 г., 83, 9% през 2019 г. и 88,6% през 2020 г. Механизмите на резистентност обхващат от само ESBL положителни щамове до такива, позитивни и за карбапенемази, които нарастват през годините: 42,3% през 2016г., 35,1% през 2017г., 36,8% през 2018г., 83,9% през 2019г. Резистентността към карбапенеми се повиши до 50% през 2020г. Изолатите са разнообразни по отношение на механизмите на резистентност и притежанието на плазмидно и хромозомно кодирани гени на ко-резистентност, като продуцират New Delhi Metallo-β-лактамаза (NDM), потвърдена с дисковете MASTDISK Carba плюс, както е описано в предишни проучвания.

**Заключение:** Нашето проучване показва значително повишение на резистентността към карбапенеми сред изолатите на *K. pneumoniae* от хемокултури в УМБАЛСМ „Н.И. Пирогов" за анализирания период. Рискът от септични усложнения, включително вследствие на MDR *K. pneumoniae*, е най-висок за пациентите в интензивните отделения. За предотвратяване на такива животозастрашаващи усложнения е необходимо да се прилагат по-ефективни мерки за контрол на вътреболничните инфекции и стриктно спазване на антибиотичната политика.

Ключови думи: *Klebsiella pneumoniae,* ESBL, NDM

Адрес и автор за кореспонденция: гр. София, бул. Тотлебен № 21, Лаборатория по Микробиология Мария Малчева – тел. 0899163003

## 13. OCCURRENCE OF HIGHLY RESISTANT ESBL AND NDM-1 PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM BLOOD CULTURES OF PATIENTS, FOR A 5 YEAR PERIOD IN UMHATEM "N.I PIROGOV"

Mariya Malcheva[1], Tsvetelina Gospodinova[1], Magdalena Leseva[1] Tsano Chalashkanov[1], Stefana Sabcheva[2]
– Microbiology Laboratory, University Multiprofile Hospital for Active Treatment and Emergency Medicine (UMHATEM) „N.I. Pirogov ", Sofia
– Microbiology Laboratory, National Oncology Center - SHATO, Sofia

Background
The first cases of New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM) *Klebsiella pneumoniae* producers in Bulgaria were described in 2016 from patients of two hospitals, one of them being the University Multiprofile Hospital for Active Treatment and Emergency Medicine (UMHATEM) „N.I. Pirogov". Since then the Hospital has been actively monitoring the occurrence of resistant strains, among the most dangerous being isolates from patients with sepsis.
**The aim** of this study is to analyze the distribution of resistant *K. pneumoniae* in septic patients for a 5 year period.
Materials and Methods
The presented study is retrospective for the period 2016 – 2020 and includes all the analyzed (28778) blood cultures from patients with suspected sepsis. They were incubated in BacT/Alert device for blood cultures. Identification of the isolates was done with biochemical tests and an automated Vitek 2 Compact system. The antimicrobial susceptibility was tested with the disc dilution method and MIC for colistin was determined according to EUCAST.
Results
Positive blood cultures from the all analyzed specimens were 4507 (15,7%) ranging from 13% in 2018 to 19% in 2020. The relative share of *K. pneumoniae* isolates varied from 3,5% in 2016, 8,4% in 2017, 7,7 in 2018, 8,7% in 2019 and 6,9% in 2020. ESBL positive isolates were from 92,3% in 2016, 96,5% in 2017, 79,4% in 2018, 83,9% in 2019 and 88,6% in 2020. Resistance patterns evolved from just ESBL positive strains to high abundancy of positive for carbapenemases – 42,3% in 2016, 35,1% in 2017, 36,8% in 2018, 83,9% in 2019. Resistance to carbapenems rose up to 50% in 2020. The isolates were diverse in terms of plasmid and co-resistance gene content and possessed the New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM) confirmed with the MASTDISK Carba plus disks as described in previous studies.
Conclusions
The study reveals a significant rise in carbapenem resistance among the *K.pneumoniae* isolates in UMHATEM „N.I. Pirogov " for the analyzed period. The risk of septic complications including from MDR *K.pneumoniae* is highest for the ICU patients. More effective epidemic control measures and strict compliance of the antibiotic stewardship should be applied to prevent such life-threatening complications.
Key words: *Klebsiella pneumoniae,* ESBL, NDM

## 14. РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА МНОЖЕСТВЕНО-РЕЗИСТЕНТНИ ИЗОЛАТИ *ACINETOBACTER BAUMANNII* В УНИВЕРСИТЕТСКА БОЛНИЦА

Т. Българанова[1], Д. Георгиева[1], П. Христова[1], Н. Йорданова[1], Х. Хиткова[1], С. Събчева[2]
[1] Катедра по Микробиология и вирусология, Медицински Университет - Плевен
[2] Микробиологична лаборатория, УСБАЛ по Онкология - София

**Въведение:** Множествено-резистентните (MDR) *A. baumannii* продължават да са проблемни вътреболнични патогени поради високата честота при хоспитализирани пациенти и ограничените възможности за тяхното лечение.
**Целта** на проучването е да се определи разпространението на изолатите MDR *A. baumannii* и фенотиповете на тяхната антимикробна резистентност.
**Материали и методи:** Проучването обхваща всички MDR *A. baumannii*, изолирани от пациенти в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“-Плевен за периода 2018-2020 г. Видовата идентификация на изолатите е извършена с VITEK-2. Чувствителността към 12 антимикробни препарата е тествана по дисково-дифузионния метод и с VITEK-2.
**Резултати:** Открити са общо 143 неповтарящи се MDR *A. baumannii*, с честота съответно 9% през 2018 г. и 13% през 2020 г. Разпределението на изолатите по клинични материали е следното: 63 (44.06%) проби от дихателна система (БАЛ и трахеални аспирати), следвани от раневи секрети – 49 (34.26%) и хемокултури – 15 (10.49%). Около 90% от MDR *A. baumannii* са изолирани от пациенти в интензивни звена и хирургични отделения (съответно 65.73% и 25%). Всички изолати бяха чувствителни към колистин и резистентни към карбапенеми и хинолони. Получените резултати показаха и *in vitro* чувствителност към тигециклин. Въз основа на варирацитe данни за аминогликозидите и trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMZ), се оформиха пет фенотипа на антимикробна резистентност. Най-често срещаният от тях включва резистентност към имипенем, меропенем, хинолони, всички тествани аминогликозиди и TMP/SMZ. Около 73% от изолатите в интензивните звена експерсират този фенотип.
**Заключение**: Честотата на MDR *A. baumannii* в болницата се е увеличила значително през периода на проучването, като най-често се изолира от дихателната система или хирургичното място при критично болни пациенти.

**Key words:** MDR *A. baumannii*, честота, фенотипове на резистентност.

**Кореспондиращ автор:**
Доц. д-р Христина Йотова Хиткова
Ръководител Катедра “Микробиология и Вирусология” Факултет „Фармация”
Медицински университет - Плевен ул. „Климент Охридски“ 1
Плевен 5800
Телефон: +359 899 11 60 21

## 14. REVALENCE OF MULTIDRUG-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII IN A UNIVERSITY HOSPITAL

T. Bulgaranova[1], D. Georgieva[1], P. Hristova[1], N. Iordanova[1], H. Hitkova[1], S. Sabtcheva [2]
[1] Department of Microbiology and Virology, Medical University - Pleven
[2] Microbiology laboratory, USHAT on Oncology - Sofia

**Introduction:** Multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* continues to be problematic nosocomial pathogens due to the high frequency in hospitalized patients and the limited options for their treatment. **The aim** of the study is to determine the distribution of MDR *A. baumannii* isolates and their antimicrobial resistance patterns.
**Materials and Methods:** All MDR *A. baumannii* isolated from patients, admitted to UMHAT „Dr. G.
Stranski"-Pleven in the period 2018 – 2020, were studied. The species identification of isolates was performed with VITEK-2. The susceptibility to 12 antimicrobials was tested by the disk-diffusion method and VITEK-2.
**Results:** A total of 143 non-repeated MDR *A. baumannii* were detected with frequency 9% in 2018 and 13% in 2020, respectively. Distribution of the isolates according to clinical materials was as follows: 63 (44.06%) respiratory tract samples (BAL and tracheal aspirates), following by wound secretions – 49 (34.26%) and blood cultures – 15 (10.49%). About 90% of MDR *A. baumannii* were recovered from patients in ICUs and surgical wards (65.73 % and 25%, respectively).
All isolates were susceptible to colistin and resistant to carbapenems and quinolones. The results revealed *in vitro* susceptibility to tigecycline. On the basis of varied data for aminoglycosides and trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMZ), five antimicrobial resistance phenotypes were formed. The most common of them included resistance to imipenem, meropenem, quinolones, all tested aminoglycosides and TMP/SMZ. About 73% of the isolates from ICUs expressed this phenotype.
**Conclusion:** The frequency of MDR *A. baumannii* in the hospital has significantly increased during the studied period and it being most often isolated from the respiratory system or the surgical site in critically ill patients.

**Key words:** multidrug-resistant *A. baumannii*, frequency, phenotypes of resistance

Corresponding author
Assoc. prof. Hristina Yotova Hitkova, MD, PhD Head of Department of Microbiology and Virology Faculty of Pharmacy Medical University - Pleven 1 „St. Kliment Ohridski" Str. Pleven 5800
Telephone: +359 899 11 60 21

## 15. АНАЛИЗ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ТОКСОКАРОЗАТА СРЕД СУСПЕКТНИ ПАЦИЕНТИ, ИЗСЛЕДВАНИ В НЦЗПБ ЗА ТРИГОДИШЕН ПЕРИОД (2018-2020 Г.)

Е. Кънева, И. Кафтанджиев, М. Виденова, А. Иванова, Р. Борисова, Н. Цветкова, Р. Харизанов, И. Райнова
НЦЗПБ, гр. София

**Въведение.** Токсокарозата е хелминтозооноза с космополитно разпространение, като широкият спектър на клинични прояви затруднява диагностиката и често заболяването остава недиагностицирано.
**Пациенти и методи.** За период от три години за токсокароза са изследвани общо 386 лица: 128 за 2018 г., 162 за 2019 г. и 96 през 2020 г., на възраст от 1 до 87 години. От тях 177 мъже и 209 жени, 316 възрастни и 70 деца. Серумните проби от суспектните за заболяването лица са тестирани за наличие на антитоксокарни IgG антитела в ELISA (търговски кит), а граничните и позитивните резултати, и в потвърдителния метод Western blot.
**Резултати.** За периода с положителни в ELISA резултати са 86 от изследваните. Относителният дял на серопозитивните за токсокароза пациенти е най-висок за 2018 г. - 25%, за 2019 г. е 19.1% и 24% за 2020 г. Най-многобройна е групата на пробите с получен титър на специфичните IgG антитела от 1.1 до 3.0 – 60 (69,8%). Лицата от мъжки пол с положителни резултати са 54.7%, а тези от женски пол 45.3%, като не се установява статистически значима разлика между тях. Относителния дял на установените със специфични антитела във възрастовата група до 18 г. (34,3%), значително превишава получения при възрастните (19,6%), като разликата между тях е статистически значима (p=0,016, ANOVA). Според водещия клиничен симптом, насочващ за изследване, преобладават лица с различни прояви на алергия (17,6%), еозинофилия (10,3%) и с гастро- интестинални симптоми (53,8%). С очна токсокароза са установени 2 от 14 изследвани (14,3%).
Географското разпределение на случаите показва по-висок относителен дял на положителни резултати при изследваните лица от други области на страната (36,6%), спрямо тези от София – 14,7%, като тази разлика е статистически значима (p=0,000; Chi- Square Test). Най-много позитивни за токсокароза резултати се установяват в месеците януари (27,9% от изследваните през тази месец), май (27,5%) и август (28,2%).
Допълнителното тестиране на пробите в Western blot, е с данни за наличие на характерни бандове при 46 (52,3%) лица, т.е. заболяването е потвърдено в половината от пациентите. Три от седемте гранични резултата са положителни в WB.
**Заключение.** Данните за разпространението на токсокарозата сред хората в България са все още непълни. Това се дължи на факта, че изследванията за това паразитно заболяване се извършват основно в НЦЗПБ, както и на съществуващите затруднения за определяне на стадия на инфекцията с настоящите диагностични методи в глобален мащаб. Данните от нашето проучване потвърждават необходимостта от допълнително изследване на суспектните лица с потвърдителен метод, особено при нисък титър на специфични антитела в ELISA.

*Ключови думи*: токсокароза, диагностика, ELISA IgG, Western blot IgG.

## 15. ANALYSIS OF THE PREVALENCE OF TOXOCARIASIS AMONG SUSPECTED PATIENTS STUDIED AT NCIPD FOR A THREE-YEAR PERIOD (2018-2020)

E. Kaneva, I. Kaftandjiev, M. Videnova, A. Ivanova, R. Borisova, N. Tsvetkova, R. Harizanov, I. Rainova
NCIPD, Sofia

**Introduction.** Toxocariasis is a cosmopolitan helminthiasis with a wide range of clinical manifestations complicating diagnosis and often undiagnosed.

**Patients and methods**. For a three years period, a total of 386 people were tested for toxocariasis: 128 for 2018, 162 for 2019 and 96 in 2020, aged 1 to 87 years. Of these 177 men and 209 women, 316 adults and 70 children. Serum samples from disease-suspected individuals were tested for the presence of anti-*Toxocara* IgG antibodies in the ELISA (commercial kit), and borderline and positive results - in the Western blot confirmatory method.

**Results.** For the period with positive ELISA results were 86 of the studied. Seropositive rates for *Toxocara* - patients were the highest in 2018 - 25%, in 2019 it is 19.1% and 24% in 2020. The most numerous group of samples were with obtained of specific IgG levels from 1.1 to
3.0 - 60 (69.8%). Males with positive results were 54.7% and females - 45.3%, and no statistically significant difference was found between them. *Toxocara* positive patients in the age group up to 18 years (34.3%) significantly exceeds these obtained in adults (19.6%) and the difference between them is statistically significant ($p = 0.016$, ANOVA).
According to the main clinical symptom individuals with various manifestations of allergy (17.6%), eosinophilia (10.3%) and gastrointestinal symptoms (53.8%) predominate. OLM was found in 2 of 14 subjects (14.3%).
The geographical distribution of cases showed a higher relative percent of positive results in the surveyed persons from other districts of the country (36.6%), compared to those from Sofia
- 14.7%, and this difference was statistically significant ($p = 0.000$; Chi -Square Test). The most *Toxocara* - positive results were found in January (27.9% of those studied this month), May (27.5%) and August (28.2%).
The additional testing of the samples in Western blot established the presence of characteristic bands in 46 (52.3%) persons, ie. the disease was confirmed in half of the patients. Three of the seven borderline results are positive in WB.

**Conclusion.** Data on the *Toxocara*- prevalence among people in Bulgaria are still incomplete. This is due to the fact that this parasitic disease investigations are carried out mainly in NCIPD, as well as the existing difficulties in determining the stage of infection with current diagnostic methods on a global scale. The data from our study confirm the need for further examination of suspected patients with a confirmatory method, especially at low levels of specific antibodies in ELISA.

*Key words*: Toxocariasis, diagnosis, ELISA IgG, Western blot IgG.
ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:
Eleonora Kaneva, PhD
National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Department of Parasitology and Tropical Medicine
Bulgaria, 1504 Sofia, 26, Yanko Sakazov Blvd. email: kaneva@ncipd.org;
Phone: +35929446999; ext. 310.

# ПОСТЕРНА СЕСИЯ II

## 16.СЕРОЛОГИЧНО И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА *COXIELLA BURNETII* В ЛАБОРАТОРНИ ПРОБИ НА ВЕТЕРИНАРНИ ЛЕКАРИ, РАБОТЕЩИ НА СВОБОДНА ПРАКТИКА И В ДЪРЖАВНАТА ВЕТЕРИНАРНА СИСТЕМА

Драгана Ангелов[1], Снежана Дикова[1], Константин Симеонов[2], Мирослав Първанов[3], Симона Чакарова[2], Цвятко Александров[2], Стефка Крумова[1], Петя Генова-Калу[1]

[1]Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ), Отдел „Вирусология“; [2]Национален Диагностичен и Научноизследователски Ветеринарномедицински Институт, Българска Агенция по Храните (БАБХ); [3]Български Ветеринарен Съюз (БВС)

**Въведение:**. Ку-треската е водеща по значение и разпространение рикетсиоза в България под формата на многобройни спорадични случаи, селскостопански огнища, малки и големи епидемии. Епизоотиите от Ку треска се развиват на фона на инфекция сред селскостопанските животни (овце, кози, едър рогат добитък и др.), които излъчват големи количества коксиели в околната среда чрез своите секрети и екскрети. Една от най-уязвимите рискови групи е тази на ветеринарните лекари, които са изложени на инфекцията по аерогенен и алиментарен път на заразяване.
**Цел:** Да се обобщят сероепидемичните резултати от проведено научно проучване върху разпространението на *Coxiella burnetii* сред ветеринарни лекари, работещи на свободна практика и в държавната ветеринарна система (към Областни Дирекции (ОДБХ) на БАБХ) в НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“ на НЦЗПБ.
**Материали и методи:** В периода м. август, 2020 г. до м. юни, 2021 г. в лабораторията са изследвани общо 481 кръвни проби на ветеринарни лекари, от които 238 на свободна практика и 243 от държавната ветеринарна система. От общия брой изследвани лица, 363 са мъже и 118 жени от различни области на страната. Диагностика на *C. burnetii* е извършена чрез индиректен имуноензимен ELISA (*anti-Coxiella burnetii ph. II IgG/IgM)* анализ и с помощта на конвенционален PCR (за детекция на *sodB* гена на *C. burnetii*).
**Резултати:** Чрез индиректен ELISA анализ на тестираните 481 клинични проби са доказани anti-*C. burnetii* позитивни ph.II IgM антитела при 19% от изследваните проби. Относително висок процент засегнати са в актвна възраст 40 - 50 г., с преобладаване сред мъжете (около 90%). При изследваните серумни проби положителен anti-*C. burnetii* ph. II IgG резултат е доказан при 60%. Положителен PCR сигнал за *C. burnetii*- ДНК е получен при 48/481 (10%) и следва отчетената по-горе тенднция за остро инфектиране на лица в активна възраст. Процентът на активно заболелите ветеринарни лекари към ОДБХ на БАБХ варира в различните области (средно 18%). Най-голям брой заболели щатни и свободно практикуващи ветеринарни лекари са установени в областите Кърджали, Враца, Силистра, Пловдив, Шумен, Търговище, Стара Загора и Ловеч. След проведеното проучване са идентифицирани 6 нови рискови области за разпространение на заболяването в страната (Варна, Монтана, Плевен, Силистра, Стара Загора и Шумен), които следва да бъдат включени в новата 3-годишна Програма за Контрол и Надзор на Ку-треската за периода 2022-2024 год.
**Заключение:** В резултат на натрупания опит в лабораторията е разработена

диагностична схема, включваща комплекс от методи за подобряване на ранната лабораторна диагностика на *C. burnetii,* позволяваща предприемането на адекватно лечение и надзор на заболяването.

**Ключови думи:** *Coxiella burnetii*, конвенционалена PCR, серология, ветеринарни лекари

**Благодарност:** Лабораторните изследвания са финансирани по научно-изследователски проект Договор № КП-06-Н33/3/ към Фонд Научни Изследвания.

## 16.SEROLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGY STUDY OF *COXIELLA BURNETII* IN LABORATORY SAMPLES OF FREELANCE VETERINARIANS AND WORKING IN THE NATIONAL VETERINARY SYSTEM

Dragana Angelov[1], Snezhana Dikova[1], Konstantin Simeonov[2], Miroslav Parvanov[3], Simona Chakarova[2], Tsvyatko Aleksandrov[2], Stefka Krumova[1], Petya Genova-Kalou[1]

[1]Department of Virology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD); [2]National Diagnostic and Research Veterinary Institute, Bulgarian Food Safety Agency (BFSA); [3]Bulgarian Veterinary Society (BVS)

**Introduction**: Q fever is the leading importance and prevalence of rickettsiosis in Bulgaria in the form of numerous sporadic cases, agricultural outbreaks, small and large epidemics. Epizootics of Q fever develop against the background of infection among farm animals (sheep, goats, cattle, etc.), which emit large amounts of coxiellosis into the environment through their secretions and excreta. One of the most vulnerable risk groups is that of veterinarians, who are exposed to the infection by aerogenic and alimentary route of infection.
**Aim**: To summarize the seroepidemiology results of a scientific study on the prevalence of *Coxiella burnetii* among freelance veterinarians and in the national veterinary system (at the Regional Food Safety Departments (RFSD) at BFSA) in NRL "Cell cultures, rickettsia and oncogenic viruses" at NCIPD.
**Materials and methods**: In the period August, 2020 to June, 2021 a total of 481 blood samples of veterinarians were tested in the laboratory, of which 238 were freelance veterinarians and 243 working in the national veterinary system. Of the total number of tested patients, 363 are men and 118 women from different regions of the country. Diagnosis of *C. burnetii* was performed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay ELISA (anti-*Coxiella burnetii* ph. II IgG/IgM) and by conventional PCR technique (to detect the *sodB* gene region of *C. burnetii*).
**Results**: By indirect ELISA assay of the tested 481 clinical samples, anti-*C. burnetii* positive ph. II IgM antibodies were registered in 19% of samples. A rlatively high percentage are affected in the active age between 40-50 years old, with a predominance of men (about 90%). Anti-*C. burnetii* positive ph. II IgG antibodies were proven in 60% of tested samples. A positive PCR signal for *C. burnetii* DNA was obtained at 48/481 (10% of samples) and follows the above reported trend of acute infection of active age patients. The percentage of actively ill veterinarians working in the RFSD varies in different regions (average 18%). The largest number of infected veterinarians working in national veterinary system and freelance are found in Kardzhali, Vratsa, Silistra, Plovdiv, Shumen, Targovishte, Stara Zagora and Lovech. After study, 6 new risk areas for the spread of Q fever in the country were identified (Varna, Montana, Pleven, Silistra, Stara Zagora and Shumen), which should be included in the new 3-year Program for Control and Surveillance of Q fever in Bulgaria (2022 - 2024).
**Conclusions**: As a result of the experience in the laboratory was developed diagnostic scheme including complex methods to improve early laboratory diagnosis of *C. burnetii*, allowing taking proper treatment of suspected with Q fever patients.
**Key words**: *Coxiella burnetii*, conventional PCR, serology, veterinarians
**Funding**: This work was supported by the Bulgarian National Science Fund under Grant KP- 06-N33/3/2019.

## 17. ЗНАЧЕНИЕ НА АВИДИТЕТА НА IGG АНТИТЕЛАТА ПРИ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СТАДИЯ НА ТОКСОПЛАЗМЕНАТА ИНФЕКЦИЯ ПРИ БРЕМЕННИ ЗА ПЕРИОДА 2016 – 2020 ГОДИНА

М. Виденова[1], И. Райнова[1], Н. Цветкова[1], Р. Борисова[1], Р. Харизанов[1], И.Кафтанджиев[1], А. Иванова[1], Е. Кънева[1],
1 – Отдел Паразитология и тропическа медицина (ОПТМ), Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София

**Цел** на настоящото проучване е да се анализира ролята на IgG авидитета при определяне на стадия на токсоплазмената инфекция при бременни за периода 2016 – 2020 година.

**Материали и методи**. Анализът е изготвен на базата на лабораторни и клинични данни за диагностицирани и лекувани пациенти с токсоплазмоза в ОПТМ към НЦЗПБ.

**Резултати.** За проучвания от нас период общо за токсоплазмоза серологично са изследвани 304 бременни жени и 57 с предстояща бременност, като с данни за наличие на свежа инфекция са 27% от тях. Стойностите на авидитета на IgG антителата като потвърдителен показател за скорошно заразяване с *Toxoplasma gondii* (в рамките на 4-6 месеца) изследвахме при 85 жени – бременни или с предстояща бременност. Серологични данни за нисък авидитет (до 40%) установихме при 23 (27%), граничен (между 40 и 50%)
при 22 (26%) и висок (над 50%) при 40 (47%) от тестираните. По години най-голям брой изследвани за този показател са извършени през 2020 г. – 26 (31%) и през 2018 г. – 20 (24%). По отношение периода на бременността и авидитета - 26% от пациентките с ниски стойности са в първия триместър и 35% са във втория. Общо между 2016-2020 г. относителният дял на изследваните за токсоплазмоза бременни жени с нисък авидитет е доста висок и варира в различните години между 19 и 40%.
**Заключение**. Потвърждаването или изключването на свежа първична инфекция с *Toxoplasma gondii* е важно при изследване на бременни жени, тъй като рискът от патология на плода значително се увеличава при остра първична инфекция, особено в първия триместър на бременността. Определянето на авидетата на IgG антителата е важен маркер при взимането на решение за провеждане на терапия на бременните. Ниските стойности на този показател са белег за свежа инфекция и лечението на бременните жени има за цел да предпази фетуса от инфектиране чрез блокиране на трансмисията на паразита през плацентата, както и терапия на плода при установена вътреутробна инфекция.
**Ключови думи**. бременност, токсоплазмоза, инфекция

## 17. SIGNIFICANCE OF IGG AVIDITY ANTIBODIES IN DETERMINING THE STAGE OF TOXOPLASMOSIS INFECTION IN PREGNANT WOMEN FOR THE PERIOD 2016 – 2020

M.Videnova[1], I.Raynova[1], N.Tsvetkova[1], R.Borisova[1], R.Harizanov[1], I.Kaftandjiev[1], A. Ivanova[1], E.Kaneva[1]
1 - 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 importance of IgG avidity antibodies in determining the stage of Toxoplasma infection in pregnant women for the period 2016 - 2020.

**Materials and methods**. The analysis is based on laboratory and clinical data for diagnosed and treated patients with toxoplasmosis in OPTM at the NCIPD.

**Results**. For the studied period, a total of 304 pregnant women and 57 with forthcoming pregnancy were serologically tested for toxoplasmosis, and 27% of them had evidence of fresh infection. The avidity values of IgG antibodies as a confirmatory indicator of recent infection with *Toxoplasma gondii* (within 4-6 months) were studied in 85 women - pregnant or impending pregnancy. Serological data for low avidity (up to 40%) were found in 23 (27%), borderline (between 40 and 50%) in 22 (26%) and high (over 50%) in 40 (47%) of the tested. By years, the largest number of surveys for this indicator were conducted in 2020 - 26 (31%) and in 2018 - 20 (24%). Regarding the period of pregnancy and avidity - 26% of patients with low values are in the first trimester and 35% are in the second. In total, between 2016-2020, the relative share of pregnant women tested for toxoplasmosis with low avidity is quite high and varies between 19 and 40% in different years.
**Conclusion.** Confirmation or exclusion of fresh primary infection with *Toxoplasma gondii* is important in the examination of pregnant women, as the risk of fetal pathology is significantly increased in acute primary infection, especially in the first trimester of pregnancy. Determination of avidity of IgG antibodies is an important marker in deciding to conduct therapy in pregnant women. Low values of this indicator are a sign of fresh infection and the treatment of pregnant women aims to protect the fetus from infection by blocking the transmission of the parasite through the placenta, as well as therapy of the fetus in case of intrauterine infection.
**Keywords.** pregnancy, toxoplasmosis, infection

## 18. ПАРАЗИТНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ В ДИФЕРЕНЦИАЛНАТА ДИАГНОЗА НА ПЕРИОДИЧНА ТРЕСКА И НЕЯСНО ФЕБРИЛНО СЪСТОЯНИЕ

Искрен Кафтанджиев[1], Румен Харизанов[1]

[1] НЦЗПБ, София – Отдел „Паразитология и тропическа медицина“
Адрес за кореспонденция: 1504 София, бул. Янко Сакъзов 26, тел. 02/9446999, вътр. 360

**Въведение.** Термините, периодична треска (повтарящо се неясно фебрилно състояние - ПНФС) и неясно фебрилно състояние (НФС) често погрешно се използват като синоними може би поради това, че в диференциалната им диагноза са включени сходни нозологични единици. Понастоящем под НФС се разбира състояние с температура над 38.3ºC и продължителност поне от 1 седмица и неизяснена етиология въпреки провежданите интензивни изследвания на пациента. Повтарящото се НФС (периодична треска), се дефинира, като наличие на два и повече фебрилни епизода редуващи се с афебрилни интервали продължаващи най-малко две седмици. Спектъра на заболяванията включени в диференциалната диагноза на двете състояния е доста обширен.

**Цел** на настоящата разработка е да направи кратък преглед на заболяванията включени в диференциалната диагноза на двете фебрилни състояния с акцент върху заболяванията с паразитна етиология.

**Материали и методи.** Направихме проучване на литературата от база данни в PubMed, ScienceDirect, Medscape, New England Journal of Medicine.

**Резултати.** Според данните от литературата се смята, че около 30-40% от случаите на ПНФС и НФС се дължат на инфекциозни причинители, около 20-30% на неоплазми и злокачествени тумори, около 10-20% на автоимунни заболявания и колагенози, а на други болести, които за извън споменатите по-горе категории се дължат 15-20% от случаите, като в около 5-15 %, причината за фебрилитета остава неизяснена. Основни паразитни заболявания, които трябва да се имат в предвид при пациенти с ПНФС и НФС, са малария, екстраинтестинална амебиаза, фасциолози, трипанозомози, висцерална лайшманиоза, токсокароза, токсоплазмоза, трихинелоза.

**Заключение.** Диагностицирането на причината за ПНФС, или НФС обхваща широк спектър от заболявания и често пъти се поставя по метода на изключването. Щателно снетите лична и фамилна анамнеза са от голямо значение за избора на насочени лабораторни изследвания. След изключването на инфекциозна етиология и малигнен процес, като причина за фебрилитета, вниманието трябва да се насочи към автоимунните заболявания. В малък брой от случаите причината може да остане неизяснена и тогава пациентите трябва да бъдат поставени под внимателно диспансерно наблюдение, като се следи за развитието и появата на нови симптоми.

**Ключови думи:** фебрилитет, периодична треска, неясно фебрилно състояние.

## 18. PARASITIC DISEASES IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RECURRENT FEVER AND FEVER OF UNKNOWN ORIGIN

Iskren Kaftandjiev[1], Rumen Harizanov[1]
[1] NCIPD, Sofia - Department of Parasitology and Tropical Medicine
Address for correspondence: 1504 Sofia, 26 Yanko Sakazov Blvd., tel. 02/9446999, ext. 360

**Introduction.** The terms recurrent, or periodic fever (recurrent fever of unknown origin - RFUO) and fever of unknown origine (FUO) are often misused as synonyms, perhaps because similar nosological units are included in their differential diagnosis. FUO is currently understood to mean a condition with a temperature above 38.3 ° C and a duration of at least 1 week and an unclear etiology despite intensive patient examinations. Recurrent FUO (periodic fever) is defined as the presence of two or more febrile episodes alternating with afebrile intervals lasting at least two weeks. The range of diseases included in the differential diagnosis of the two conditions is quite wide.

**Aim** of the present study is to make a brief overview of the diseases included in the differential diagnosis of the two febrile conditions with an emphasis on the parasitic etiology.

**Materials and methods**. We surched for relevant articles the database of PubMed, ScienceDirect, Medscape, New England Journal of Medicine.

**Results.** According to the literature, it is estimated that about 30-40% of cases of RFUO and FUO are due to infectious agents, about 20-30% due to neoplasms and malignancies, about 10-20% due to autoimmune diseases and collagenosis, due to others diseases that are not included in the above-mentioned categories are about 15-20% of cases, and in 5-15%, the cause of fever remains unclear. The main parasitic diseases that should be considered in patients with RFUO and FUO are malaria, extraintestinal amoebiasis, fasciolosis, trypanosomiasis, visceral leishmaniasis, toxocariasis, toxoplasmosis, trichinosis.

**Conclusion**. Differential diagnosis of RFUO and FUO, includes wide range of diseases and is often made by the method of exclusion. Carefully taken personal and family history are of great importance for the choice of targeted laboratory tests. After the exclusion of infectious etiology and malignant process as a cause of fever, attention should be focused on autoimmune diseases. In a small number of cases, the cause may remain unclear and then the patients should be placed under close medical follow up monitoring for development and appearance of new symptoms.

**Key words:** fever, recurrent fever, periodic fever, fever of unknown origine

## 19. ГОНОКОКОВ КОНЮНКТИВИТ ПРИ ВЪЗРАСТНИ: ПРЕДСТАВЯНЕ НА КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

Любомира Боянова, Зоя Иванова, Савина Стоицова, Ива Филипова
Ключови думи: *Neisseria gonorrhoeae*, гонококов конюнктивит, екстрагенитални гонококови инфекции

Въведение

Въпреки че обикновено се смята за заболяване при новородени след предаване от майката по време на раждането (ophthalmia neonatorum), гонококовият конюнктивит (ГК) е инфекциозен процес, който може да засегне и възрастни и обикновено е свързан със сексуално предавана инфекция. Важно е ГК да бъде разпознат, тъй като нелекуваните случаи могат да доведат до значителни последици като кератит, разязвявания на роговицата, панофталмит и загуба на зрение. Тук докладваме случай на остър бактериален конюнктивит при възрастен, причинен от *Neisseria gonorrhoeae*.

Клиничен случай

26-годишен хетеросексуален мъж е насочен от офталмологична клиника за микробиологична диагностика на *N. gonorrhoeae*. Пациентът се представи със зачервяване и болка в лявото око, както и гъст жълтеникав секрет. В нашия център след подробно снета анамнеза се установи, че е имал лек и спонтанно преминал уретрален секрет няколко дни след случаен сексуален контакт в чужбина. При прегледа левият му клепач беше подут, конюнктивата на лявото око бе зачервена с обилен жълтеникав секрет. Имаше и хемоза. Не бяха установени системни или урогенитални симптоми. Бяха взети секрет от засегнатото око и първа сутрешна урина за култивиране и PCR за *N. gonorrhoeae* и *Chlamydia trachomatis*. Резултатът от PCR на очния секрет беше положителен за *N. gonorrhoeae* и на пациента беше приложена антибиотична терапия в продължение на седем дни с цефтриаксон 1 g интравенозно на всеки 24 часа през първите 3 дни, след което се премина към цефиксим 400 mg два пъти дневно. Проведеното контролно изследване след 3 седмици показа пълно клинично и микробиологично възстановяване.

Заключение

Нашият доклад за случая подчертава значението на ГК при възрастни и необходимостта от експедитивна диагностика и лечение за ограничаване въвличането на роговицата в инфекциозния процес и запазване на зрението. В случаите на унилатерален гноен конюнктивит при сексуално активни възрастни, трябва да има клинично съмнение за ГК, навременно взет секрет за PCR и култивиране, както и познания за съвременната антибиотична терапия, препоръчвана от европейските ръководства.

Благодарности:
Това проучване е финансирано от ФНИ по проект КП-06-М33/1 от 13.12.2019 „Проучване на ползите от екстрагенитално изследване на гонорея и хламидия за общественото здраве“

## 19. GONOCOCCAL CONJUNCTIVITIS IN ADULTS: A CASE REPORT

Lyubomira Boyanova, Zoya Ivanova, Savina Stoitsova, Ivva Philipova

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, gonococcal conjunctivitis, extragenital gonococcal infections Introduction:
While typically thought of as a disease in neonates due to maternal transmission during birth (ophthalmia neonatorum), gonococcal conjunctivitis (GC) is an infectious process that could also affect older age groups and it is more associated with sexually transmitted infections (STIs). The condition is important to recognize as untreated cases can lead to significant consequences such as keratitis, corneal ulceration, panophtalmitis, and vision loss. Here, we report a case of acute bacterial conjunctivitis in young adult caused by *Neisseria gonorrhoeae*.

Case report

A 26-years-old heterosexual male was referred from ophthalmology clinic for microbiological diagnostics of *N. gonorrhoeae*. He presented with left eye redness and pain, associated with thick, yellowish discharge. At our facility, further history revealed that he has had a mild and spontaneously resolved urethral discharge several days after a casual sexual contact abroad. On examination, his left eyelid was swollen, his left eye conjunctiva was red and copious yellowish discharge was present. There was chemosis, as well. No systemic or genitourinary symptoms were present. Left eye swab and first void urine were sent for culture and PCR for *N. gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. The eye specimen PCR result returned positive for *N. gonorrhoeae* and the patient was given antimicrobial therapy for seven days with ceftriaxone 1 g intravenous every 24 hours for the first 3 days then it was switched to cefixime 400mg twice daily for the remaining time. Follow-up examination 3 weeks later disclosed a complete clinical and microbiological resolution.

Conclusion

Our case report highlights the importance of GC in adults and the need for expeditious diagnosis and treatment for limiting corneal involvement and preservation of vision. In cases of unilateral purulent conjunctivitis in sexually active adults, there should be a high clinical suspicion of GC, early swab for PCR and culture, and knowledge of current antimicrobial therapy recommended by European guidelines.

Acknowledgment

Supported by Research grant KP-06-M33/1-13.12.2019 „Investigating benefits of extragenital gonorrhea and chlamydia testing for public health“, Bulgarian National Science Fund

## 20. РАННО И КЪСНО ДИАГНОСТИЦИРАНЕ НА ИНФЕКТИРАНИТЕ С HIV В БЪЛГАРИЯ (Предварителен анализ)

Ренета Димитрова, Ася Костадинова Александра Парцунева, Анна Ганчева, Любомира Григорова, Ивайло Алексиев

Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV Национален център по заразни и паразитни болести

**Ключови думи:** HIV; ранна HIV инфекция; късно диагностициране.

**Цел**
Целта на проучването е да бъде установен броят на ранно и късно диагностицираните лица с HIV за следните периоди от 2013 г. до 2015 г. и от 2017 г. до 2018 г.

**Материали и методи**
За целта на проучването са взети данни от НРПЛ по HIV на регистрираните HIV – серопозитивни лица за периода 2013 - 2018 г., като са изследвани 926 кръвни проби (серум и плазма). Пробите са изследвани с тест Sedia BED Incidence EIA, по лиценз и в съответствие със спецификациите на CDC, САЩ.

**Резултати**
От всички изследвани проби 59,5% са оценени, като дългосрочна HIV инфекция, а 40,5%, като ранна HIV инфекция. 85,21% от изследваните са мъже, от които 40,81% са с доказана ранна HIV инфекция. 14,79% са жени, от които 31,39% с ранна HIV инфекция. От хетеросексуалните (ХЕТ) 34,99% са с ранна HIV инфекция, а 65,01% с дългосрочна HIV инфекция. От мъжете, които правят секс с мъже (МСМ) 44,91% са с ранна HIV инфекция, а 55,09% с дългосрочна HIV инфекция. От инжектиращите се с венозни наркотици (ИВН) 39,77% са с ранна HIV инфекция, а 60.23% с дългосрочна HIV инфекция. От лицата, които са МСМ + ИВН 40,00% са регистрирани, скоро след инфектирането с HIV, а 60,00% са с дългосрочна HIV инфекция.

**Заключение**
В заключение следва да се отбележи, че изследванията за установяване на ранна инфекция сред новодиагностицирани лица с HIV са със значима прогностична стойност за оценка на хода на HIV разпространението, особено когато се отнася за определена популация от населението. В тази връзка се търсят точни методи за установяване на ранна HIV инфекция. Получената информация може да бъде използвана в областта на надзора на инфекцията и изготвяне на планове за оценка на ефективността на интервенционни програми.

**Благодарности:** Проучването е финансирано по проект от Министерството на образованието и науката (договор: КП-06-Н43/1 27.11.2020) 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, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“.

## 20.RECENT AND LONG-TERM HIV INFECTION BY THE TIME OF DIAGNOSIS IN BULGARIA (Preliminary analysis)

Reneta Dimitrova, Asya Kostadinova Alexandra Partsuneva, Anna Gancheva, Lyubomira Grigorova, Ivaylo Alexiev
National Reference Confirmatory Laboratory of HIV National Center for Infectious and Parasitic Diseases

**Keywords:** HIV; recent HIV infection; late diagnosis.

**Aim**
The aim of the study is to determine the number of recent and long-term HIV infections for the periods from 2013 to 2015 and from 2017 to 2018.
**Materials and methods**
For the purpose of the study, 926 blood samples (serum or plasma) were tested from the NRCL of HIV archive, containing samples from HIV-seropositive individuals registered in the laboratory in the period 2013 – 2018. The samples were tested with Sedia BED Incidence EIA test, under license and in accordance with the specifications of the CDC, USA.
**Results**
Of all samples tested, 59,5% were rated as long-term HIV infection and 40,5% as recent HIV infection. 85,21% of the individuals are men, of whom 40,81% have a recent HIV infection and the other 14,79% are women, of whom 31,39% have recent HIV infection. Of the heterosexuals (HET), 34,99% have recent HIV infection and 65,01% have long-term HIV infection. Of men who have sex with men (MSM) 44,91% have recent HIV infection and 55,09% have long-term HIV infection. Of the intravenous drug users (IDUs), 39,77% have recent HIV infection and 60,23% have long-term HIV infection. Of those who are MSM + IDUs, 40,00% were registered soon after contracting HIV, and 60,00% had already long-term HIV infection.
**Conclusion**
In conclusion, it should be noted that studies investigating recent infection among newly diagnosed people with HIV are of significant prognostic value for assessing the course of HIV spread, especially when it concerns a certain population. In this regard, accurate methods for detecting recent HIV infection are being sought. The information obtained can be used in the field of infection surveillance and preparation of plans for evaluating the effectiveness of intervention programs.

**Acknowledgments:** The study was supported by the by a grant from the Ministry of Education and Science, Bulgaria (contract: КП-06-Н43/1 27.11.2020); 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”.

## 21. ВЕРТИКАЛНА ТРАНСМИСИЯ НА HIV-1 ОТ МАЙКА НА НОВОРОДЕНО В БЪЛГАРИЯ (ПРЕДВАРИТЕЛЕН АНАЛИЗ)

Анна Ганчева[1], Ася Костадинова[1], Ренета Димитрова[1], Александра Парцунева[1], Любомира Григорова[1], Ивайло Еленков[2], Нина Янчева[2], Мариана Стойчева[3], Цеца Дойчинова[4], Лилия Пекова[5], Мария Николова[6] и Ивайло Алексиев[1]

Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV, НЦЗПБ, София
Специализирана болница по инфекциозни и паразитни болести, София
Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Пловдив
Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Плевен
Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Стара Загора
Национална референтна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София
**Ключови думи**: Вертикална трансмисия, субтип, HIV-1

**Цел**

В България до края на 2020 г., са регистрирани 674 жени с HIV инфекция, като 11.9% от тях са диагностицирани по време на бременност. Целта на нашето проучването е да се анализира трансмисията на HIV-1 вируса при бременните и техните новородени деца.

**Материали и Методи**

За епидемиологичния анализ са използвани данни от Националната референтна лаборатория по HIV. До 18-месечна възраст, новородените са изследвани средно по 4 пъти с ELISA, Western blot и Real-time PCR. HIV-1 *pol* секвенциите от бременните бяха генерирани с TruGene и/или ViroSeq Genotyping Systems по време на диагностичния процес и вирусологичния мониторинг. HIV-1 секвенциите бяха анализирани с помощта на Интернет базирани инструменти REGA и COMET.

**Резултати**

До края на 2020 г. от всички регистрирани майки с HIV, 87.9% са били на вирусологичен мониторинг за вирусен товар (ВТ), като 52.0% са с ВТ <40 копия/мл. Повечето от тях са от областите София – 35.9%, следвани от Пловдив – 11.8%, Варна – 7.1%, Бургас – 5.3% и от други региони на страната. От новородените 15.0% са инфектирани с HIV-1. Нашето проучване показа, че сред бременните има голямо генетично разнообразие от различни HIV-1 субтипове и рекомбинантни форми, като най-голямо разпространение в изследваната група имат не-B HIV-1 субтиповете, доминирани от CRF01_AE с 36.7%, следван от субтип B с 30.6%. Бяха установени още няколко други щама, включително: C , CRF02_ AG, CRF05_DF, CRF14_BG и URFs.

**Изводи**

Нашето проучване показа голямо генетично разнообразие на HIV-1 сред таргетната група. Сравнително висок процент новородени са били инфектирани с HIV-1 в България. Ранното диагностициране на всички бременни с HIV и навременно започване на АРТ терапия е от изключително значение за намаляване на риска от предаване на HIV инфекцията на техните новородени.

**Благодарности:** Проучването е финансирано по проект от Министерството на образованието и науката (договор: КП-06-Н43/1 27.11.2020) 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, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“.

## 21.VERTICAL TRANSMISSION OF HIV-1 FROM MOTHER TO CHILD IN BULGARIA (PRELIMINARY ANALYSIS)

Anna Gancheva[1], Asya Kostadinova[1], Reneta Dimitrova[1], Aleksandra Partsuneva[1], Lyubomira Grigorova[1], Ivaylo Elenkov[2], Nina Yancheva[2] Mariyana Stoycheva[3], Tsetsa Doychinova[4], Liliya Pekova[5], Maria Nikolova[6] and Ivailo Alexiev[1]

National Reference Confirmatory Laboratory of HIV, NCIPD, Sofia
Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
Department of Infectious Diseases, Medical University, Plovdiv
Department of Infectious Diseases, Medical University, Pleven
Clinic of Infectious Diseases, University Hospital, Stara Zagora
National Reference Laboratory of Immunology, NCIPD, Sofia

**Keywords:** Vertical transmission, subtype, HIV-1

**Aim**

Until 2020 in Bulgaria 674 women were diagnosed with HIV infection, 11.9% of them were diagnosed during pregnancy. The aim of our study was to analyze transmission of HIV-1 virus in pregnant women and their newborns.

**Materials and Methods**

Epidemiological analysis was performed using the databases of the National Reference Confirmatory Laboratory of HIV, NCIPD. Up to 18 months of age, newborns were monitored average 4 times with ELISA, Western Blot and Real-time PCR. HIV-1 *pol* sequences from pregnant women were generated with TruGene and/or ViroSeq Genotyping Systems during the diagnostic process and virological monitoring. HIV-1 sequences were analyzed using the Internet-based tools REGA and COMET.

**Results**

Of all HIV-positive mothers, registered by the end of 2020, 87.9% were on virological monitoring of viral load tests (VL), 52.0% were with VL<40c/ml. Most of them were from the regions of Sofia – 35.9%, followed by Plovdiv – 11.8%, Varna – 7.1%, Burgas – 5.3% and from the other regions of the country. 15.0% of newborns were infected with HIV-1. Our analysis revealed a high genetic diversity of different HIV-1 subtypes and recombinant forms in the studied group, as the most prevalent subtype was non-B subtypes dominated by CRF01_AE with 36.7%, followed by subtype B with 30.6%. Several other strains were found, including: C, CRF02_ AG, CRF05_DF, CRF14_BG and URFs.

**Conclusions**

Our analysis revealed high genetic diversity of HIV-1 among target group. A relatively high percentage of infants were infected with HIV-1 in Bulgaria. Early HIV testing of all pregnant women and timely initiation of antiretroviral therapy is of great importance to reducing the risk of HIV transmission to their newborns.

**Acknowledgments:** The study was supported by the by a grant from the Ministry of Education and Science, Bulgaria (contract: КП-06-Н43/1 27.11.2020); 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”.

## 22. VAGINELLA MASSILIENSIS ПОГРЕШНО ИДЕНТИФИЦИРАН КАТО WEEKSELLA VIROSA: БЕЗВРЕДЕН КОМПОНЕНТ НА ВАГИНАЛНАТА МИКРОБИОТА ИЛИ НЕПОЗНАТ ПАТОГЕН ?

Дончев Д.[1,2], Савов, Е.[1], Якуб ел-Хури, А.[1], Иванов И.Н[2]

МБАЛ "Лозенец" София, България

Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, София, България

**Въведение:** *Vaginella massiliensis* е наскоро открит и описан бактериален вид, изолиран от вагинален секрет изначално като щам Marseille P2517$^T$ във Франция, а по-късно класифициран като единствен представител на род *Vaginella*, семейство *Flavobacteriaceae.* Представлява облигатно аеробен, грам отрицателен, неспорообразуващ пръчковиден бактерий. Целта на настоящето проучване е да се опише вероятно първия случай на *Vaginella massiliensis* от пациентка с вагиноза в България.

**Клиничен случай:** Касае се за здрава 24 годишна жена, бременна в първия триместър, със съмнения за бактериална вагиноза, по-късно доказана чрез микроскопска находка на „clue cells" и липса на лактобацили. От първоначалната посявка бяха изолирани *C. albicans* и няколко гладки овални светло-жълти колонии погрешно идентифицирани като *Weeksella virosa* чрез автоматизирана система Phoenix™ M50, BD. MALDI-tof спектрометричният анализ (MALDI Biotyper, MBT v4.1.100, Bruker) показа незадоволителен идентификационен резултат (оценка 1.32-1.34). Впоследствие беше секвениран фрагмент с големина 1386bp от 16S рРНК ген. При 99.57% генетично сходство и отсъствие на други близко родствени видове, изолатът беше недвусмислено идентифициран като *Vaginella massiliensis*. Ин-витро изпитване на антимикробната чувствителност чрез определяне на МПК, показа високи стойности при аминогликозиди, колистин, фосфомицин, но чувствителност на бета- лактами и флуорохинолони. По това време антимикробна химиотерапия не беше предприета, поради ранната бременност. Заради нестихващите симптоми бяха предприети последващи микробиологични изследвания. Неколкократно бяха изолирани *P. aeruginosa* и *C. albicans* от урина (над $10^5$), както и *C. albicans* от влагалищен секрет. След четвъртия месец беше предриета терапия с Цефиксим и Полижинакс като симптомите отшумяха, но *P. aeruginosa* персистираше, докато пациентката не премина курс с фосфомицин. В следващите проби не бяха открити следи от *Vaginella massiliensis* и други микроорганизми.

**Заключение:** Наличието на ново идентифициран бактерий *Vaginella massiliensis* повдига въпроса дали той е патогенен причинител, играе роля в ко-инфекция заедно с *C. albicans*, както е доказано при други бактерии, или е рядко срещан обитател на нормалната вагиналната микрофлора. Необходими са допълнителни изследвания за придобиване на по-добра представа за връзката между състава на вагиналната микрофлора и асоциацията й с разнообразните патологични състояния.

## *22. VAGINELLA MASSILIENSIS* MISIDENTIFIED AS *WEEKSELLA VIROSA*: A HARMLESS MEMBER OF THE VAGINAL MICROBIOTA OR A NEGLECTED PATHOGEN?

D Donchev [1,2], Savov, E[1]., Yakub El Huri, A[1]., Ivanov I.N.[2]

1-Lozenetz Hospital, Sofia, Bulgaria
2-National Center for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

**Background:** *Vaginella massiliensis* is a novel species initially isolated as strain Marseille P2517$^T$ from human vaginal microbiota in 2016 in France and later classified as a sole member of the genus *Vaginella*, family *Flavobacteriaceae*. It is an obligate aerobic, Gram-negative, non-spore forming, rod shaped bacterium. Herein we report perhaps the first case of *Vaginella massiliensis* isolated from a patient with bacterial vaginosis in Bulgaria.

**Case:** The patient was a 25-years healthy woman pregnant in her third trimester presented with vaginal dysbiosis, validated by microscopy observations of "clue cell" and lack of native lactobacilli. The initial microbiological findings were *C. albicans* and a few smooth oval light-yellow colonies identified as *Weeksella virosa* by Phoenix™ M50, BD automated system. The Matrix-assisted Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI Biotyper, MBT v4.1.100, Bruker) assay did not provide any significant ID score (1.32-1.34). Subsequently a 1386bp fragment of the 16S rRNA gene was sequenced. With 99.57% similarity and lack of near-neighbors the isolate was unambiguously identified as *Vaginella massiliensis*. In-vitro susceptibility testing resulted in high MIC values for aminoglycosides, colistin, fosfomycin but appeared sensitive to beta-lactams and fluoroquinolones. The early pregnancy did not allow for antimicrobial treatment at the time. However, due to recurrent symptoms follow-up diagnosis was appointed. Significant *P. aeruginosa* and *C. albicans* were detected in urine samples repeatedly and *C. albicans* from vaginal swabs. The patient was prescribed cefixime and Polyginax and while the clinical symptoms lessened, *P. aeruginosa* was not eradicated until after treatment with Fosfomycin later. No trace of *Vaginella massiliensis* and signs of an ongoing infection were detected thereafter.

**Conclusion:** The presence of a recently identified new bacterium raised concern whether *V. massiliensis* is pathogenic, plays a role in co-infection with *C. albicans* as reported for other bacteria or is simply a rare member of the normal vaginal flora. Further studies are needed to gain more insight into the interplay between the composition of vaginal microbiome and the various pathological conditions.

## 23. БЪРЗ МОЛЕКУЛНО-БИОЛОГИЧЕН СКРИНИНГ ЗА ВАГИНАЛНА КАНДИДОЗА ПРИ СИМПТОМАТИЧНИ ЖЕНИ

Христозова Ели [1,2], Рачковска Зоя [1,2], Георгиева Вида [5], Дерменджиев Тихомир [1,2], Костадинов Костадин [3], Влахова Магдалина [4], Учикова Екатерина [4] ,Мурджева Мариана[1,2]

Катедра по Микробиология и имунология, Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив, бул. ,,Васил Априлов‘‘ 15А, 4002 гр. Пловдив, България

Научно-изследователски институт на МУ-Пловдив, бул. ,,Васил Априлов‘‘ 15А, 4002 гр. Пловдив, България

Катедра по Социална медицина и обществено здраве, Факултет по обшествено здраве, МУ-Пловдив, бул. ,,Васил Априлов‘‘ 15А, 4002 гр. Пловдив, България

Катедра по Акушерство и гинекология, МУ-Пловдив, бул.“Пещерско шосе“ 66, 4001, гр. Пловдив, България

Лаборатория по микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“-Пловдив, бул. ,,Васил Априлов‘‘ 15А, 4002, гр. Пловдив, България

**Въведение:** Точната и навременна диагноза на вагиналната кандидоза (ВК) е сериозен проблем в ежедневната акушеро-гинекологична практика. Прогнозите за нарастване честотата на тази влагалищна инфекция в бъдеще са обезпокояващи. Очаква се през 2030 г. броят на жените с ВК в света да нарастне до 160 милиона.

**Цел:** Да се проучат резултатите от бърз метод за диагностика на ВК при симптоматични жени с помощта на RT-PCR.

**Материали и методи:** За периода от м. януари до м. май 2021 г. са изследвани общо 65 влагалищни секрети от пациентки на специализирани акушеро-гинекологични клиники и амбулатории. За целта на проучването се използват клинични, молекулно-биологични (Femoflor® Screen), микробиологични и статистически методи.

**Резултати и обсъждане:** ВК е установена при 17 (26%) от изследваните жени, от които *Candida albicans* - 9 (64%) и *Candida glabrata* - 4 (36%). ВК превалира във възрастовата група от 30 до 35 г. (30%). Случаите на ВК като част от смесена влагалищна инфекция са 3 (13%), а като самостоятелна причина за влагалищни оплаквания - 14 (87%);($z=3.8$, $p<0,001$). При пациентките с ВК значимо по-често се наблюдават пруритус (OR= 3,47, p=0,02) и парене (OR= 3,56, p= 0,04).

**Заключение:** Относителният дял на ВК при симптоматични жени е сравнително висок, докато нивото на превалиране на смесените с *Candida spp.* инфекции е ниско. Молекулно-биологичният скрининг за ВК е бърз и полезен диагностичен метод, който дава възможност за своевременно и адекватно лечение.

**Ключови думи:** вагинална кандидоза, симптоматични жени, RT-PCR

## 23. RAPID MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL SCREENING OF VAGINAL CANDIDIASIS IN SYMPTOMATIC WOMEN

Hristozova Eli [1,2], Rachkovska Zoya [1,2], Georgieva Vida [5], Dermendzhiev Tihomir [1,2], Kostadinov Kostadin [3], Vlahova Magdalina [4], Uchikova Ekaterina [4], Murdjeva Marianna [1,2]
Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, MU- Plovdiv, 15A Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
Research Institute at MU-Plovdiv, 15A, Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
Department of Social Medicine and Public Health, Faculty of Public Health, MU- Plovdiv, 15A Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria
Department of Obstetrics and Gynecology, MU-Plovdiv, 66, Peshtersko shose, 4001, Plovdiv, Bulgaria
Laboratory of Microbiology, University hospital "St. George"-Plovdiv, 15A, Vasil Aprilov Blvd., 4002 Plovdiv, Bulgaria

**Introduction:** Rapid and accurate diagnosis of vaginal candidiasis (VC) is a serious problem in routine obstetric practice. Alarming evidence of incidence upward trend of this infection was reported. There is a prediction of increasing VC cases up to 160 million by 2030.
**Aim:** To evaluate the application of modern molecular-biological methods for microbiological diagnosis and analysis of the vaginal candidiasis in non-pregnant symptomatic women.
**Material and methods**: The study was conducted in the period of January to May 2021 and included 65 vaginal swabs from patients of specialized obstetric clinics and outpatient facilities. Clinical, RT-PCR, Femoflor®, microbiological and statistical methods were used for analysis.
**Results and discussion:** VC was found within 17 (26%) of the included patients. Of these positive cases *Candida albicans* were identified in 9 (64%) followed by *Candida glabrata* in 4 (36%) patients. VC was found as a prevalent within the age group of 30 to 35 (30%). VC as a mixed vaginal infection was found within 3 (13%) of the sample, compared to independent infection cause within 14 (87%) of the cases ($z=3.8$, $p<0.001$). In terms of clinical symptoms pruritus (OR=3.47, $p=0.02$) and vulvar burning (OR=3.56, $p=0.04$) were significantly more common in VC patients.
**Conclusion:** The prevalence of VC within symptomatic women was relatively high, while the frequency of mixed *Candida spp*. infections is low. Molecular biological screening of VC is a rapid and useful diagnostic method that allows appropriate and prompt treatment.
**Keywords**: vaginal candidiasis, symptomatic women, RT-PCR

## 24. ЕПИДЕМИЧЕН ПАРОТИТ - ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМА ИНФЕКЦИЯ С НЕЗАТИХВАЩО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ В БЪЛГАРИЯ

Р. Стефанова[1], И. Андонова[1], Н. Владимирова[1], С. Стоицова[1], Кр. Пармакова[2], Ст. Крумова[1]

[1]Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София, България

[2]Министерство на здравеопазването, МЗ, София, България

Паротитният вирус (MuV) все още циркулира в Европа и по света, въпреки провежданата активна ваксинопрофилактика. Повече от половината от MuV инфекции са асимптоматични или леко протичащи респираторни заболявания с характерно подуване на паротните жлези, понякога придружени от треска.

**Цел:** Да се анализира циркулацията на паротитен вирус в България за период от единадесет години (2010-2020).

**Материали/Методи:** Настоящото изследване обхваща единадесетгодишен период (2010– 2020), през който са изследвани 607 серумни проби и 93 проби урина от съмнителни за паротит случая в страната. Лабораторната диагностика е проведена в НРЛ „Морбили, паротит, рубеола", НЦЗПБ като са използвани серологични (indirect ELISA тест за доказване на специфични паротитни IgM/IgG антитела в серум) и молекулярни (end-point RT-PCR анализ за доказване на паротитен SH ген) лабораторни методи.

**Резултати:** Общият брой лабораторно MuV потвърдени случаи в НРЛ е 136/607 (22%). 2019 година се откроява с увлечена заболяемост и лабораторно доказани 43/136 (32%) случая, от които 29 регистрирани в област Стара Загора. Сред общият брой потвърдени случаи на еп. паротит, най-голям е делът на докладваните в област Стара Загора (46/136, 34%) и София град (31/136, 23%). Разпределението по възрастови групи, показва най- често инфектиране на деца на възраст 5-9 години (40/136, 29%). Апробирани и валидирани са методи за молекулярно доказване на MuV РНК чрез PCR анализ и откриване на вируса в 62/93 (67%) проби урина.

**Заключение:** Ежегодното разпространението на MuV в страната, както и докладваните единични случаи във почти всички области, насочва вниманието към подобряване на епидемиологичния и лабораторния надзор на епидемичен паротит в България.

**Ключови думи:** епидемичен паротит, ELISA IgM/IgG, PCR

## 24. MUMPS - A VACCINE-PREVENTIVE INFECTION WITH CONTINUING DISTRIBUTION IN BULGARIA

R. Stefanova[1], I. Andonova[1], N. Vladimirova[1], S. Stoitsova[1], Kr. Parmakova[2], St. Krumova[1]

[1]National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia, Bulgaria

[2]Ministry of Health, Sofia, Bulgaria

**Subject: 6.** VACCINE-PREVENTABLE INFECTIONS ABSTRACT

Mumps virus (MuV) is still circulating in Europe and around the world, despite active vaccine prophylaxis. More than half of MuV infections are asymptomatic or mild respiratory diseases with characteristic swelling of the parotid glands, sometimes accompanied by fever.

**Aim:** To analyze the circulation of MuV in Bulgaria for a period of eleven years (2010-2020).

**Materials and Methods:** The present study covers an eleven-year period (2010–2020), during which 607 serum and 93 urine samples from suspected mumps cases in the country were tested. Laboratory diagnostics was performed in NRL "Measles, mumps, rubella", NCIPD using serological (indirect ELISA test to detect specific mumps IgM/IgG antibodies in serum samples) and molecular (end-point RT-PCR analysis to detect mumps SH gene in urine) laboratory methods.

**Results:** The total number of laboratory MuV confirmed cases in NRL was 136/607 (22%). In 2019 there was an increased MuV incidence and laboratory-proven cases were 43/136 (32%) and 29 of them were registered in Stara Zagora district. Among the total number of confirmed MuV cases, the highest percentage were reported in Stara Zagora district (46/136, 34%) and Sofia city (31/136, 23%), respectively. The distribution by age groups shows the most common infection in children aged 5-9 years (40/136, 29%). Methods for molecular detection of MuV RNA by PCR analysis was validated and MuV was detection in 62/93 (67%) urine samples.

**Conclusion:** The annual spread of MuV in the country, as well as the reported sporadic cases in almost all districts, draws attention to improving the epidemiological and laboratory surveillance of mumps in Bulgaria.

**Key words:** mumps, ELISA IgM/IgG, PCR

## 25. ЛАБОРАТОРНО ПРОУЧВАНЕ НА ВЪЗМОЖНИ СЛУЧАИ НА ВРОДЕН РУБЕОЛЕН СИНДРОМ (ВРС) В БЪЛГАРИЯ (2013-2020)

И. Андонова[1], Р. Стефанова[1], С. Стоицова[1], Н. Владимирова[1], Кр. Пармакова[2], Ст. Крумова[1]

[1]Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София, България

[2]Министерство на здравеопазването (МЗ), София, България

Рубеола е остра вирусна инфекция, която засяга предимно неимунни деца и млади възрастни. Причинява се от вируса на рубеола, член на семейство Matonaviridae, род Rubivirus. Тя е сравнително леко протичащо клинично заболяване, като неговото значение за общественото здраве се определя от тератогенния потенциал на вируса, водещ до развитие на вроден рубеолен синдром (ВРС). Инфекция на майката с рубеола по време на бременност, особено в първия триместър, води до аномалии на фетуса (до 90% от случаите), спонтанен аборт или мъртво раждане.

**ЦЕЛ:** Да се проучат лабораторно възможните случаи на ВРС в България за период от осем години (2013-2020).

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ:** В настоящото изследване бяха тествани 15 серумни проби от новородени деца с вродена инфекция, за период 2013-2020 г. Бяха използвани имуноензимни (доказване на специфични IgM и IgG антитела чрез ELISA анализ) и молекулярно-биологични методи (real time PCR тест) за доказване на рубеолен вирус. Съгласно препоръките на Световната здравна организация (СЗО), беше проведено паралелно изследване на кръвни проби на майка и бебе, както и диференциално тестиране за парворирус В19 (В19V) и морбилен вирус.

**РЕЗУЛТАТИ**: В нито една от тестваните проби не е доказан ВРС и рубеолен вирус като етиологичен агент, предизвикващ вродена инфекция. Свидетелство за това са отрицателен резултат за наличие на острофазови специфични рубеолни IgM антитела и рубеолна РНК. Наличие на защитни рубеола IgG антитела са открити при 3/15 (20%) от тестваните проби. Те вероятно се дължат на пасивен трансфер на майчините IgG антитела при бебета под 6 месечна възраст. Положителен резултат за В19V бе доказан при едно дете на възраст 3 месеца, с вродена анемия.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** СЗО препоръчва наблюдението, включително ретроспективно, на рубеола да се съсредоточи върху разкриването на случаи на ВРС, както и извършването на диференциален лабораторен подход за тестиране.

**Ключови думи:** рубеола, ВРС, елиминация

## 25. LABORATORY STUDY OF POSSIBLE CASES OF CONGENITAL RUBELLA SYNDROME (CRS) IN BULGARIA (2013-2020)

I. Andonova[1], R. Stefanova[1], S. Stoitsova[1], N. Vladimirova[1], Kr. Parmakova[2], St. Krumova[1] [1]National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia, Bulgaria
[2]Ministry of Health, Sofia, Bulgaria

**Subject: 6.** VACCINE-PREVENTABLE INFECTIONS

**ABSTRACT**
Rubella is an acute viral infection that affects mainly non-immune children and young adults. It is caused by the rubella virus (RuV), a member of the Matonaviridae family, genus Rubivirus. It is a relatively mild clinical phenomenon, and its importance for public health is determined by the teratogenic potential of the virus, leading to the development of congenital rubella syndrome (BPC). Maternal infection with rubella during pregnancy, especially in the first trimester, leads to fetal abnormalities (up to 90% of cases), miscarriage or stillbirth.
**Aim:** The present study aims to laboratory analyzed the possible cases of CRS in Bulgaria for a period of eight years (2013-2020).
**MATERIALS AND METHODS:** In the present study, 15 serum samples from newborns with congenital infection were tested for the period 2013-2020. Enzyme-linked immunosorbent assays (detection of specific IgM and IgG antibodies by ELISA analysis) and molecular biological methods (real time PCR test) were used to detection of RuV. According to the recommendations of the World Health Organization (WHO), a parallel study of maternal and infant blood samples was performed, as well as differential testing for parvorirus B19 (B19V) and measles virus.
**RESULTS:** Among all tested samples no CRS and RuV was confirm as an etiological agent causing congenital infection. A negative result for the presence of specific rubella IgM antibodies and rubella RNA in all patients were detected. Presence of protective rubella IgG antibodies was found in 3/15 (20%) of the tested samples. They are probably due to passive transfer of maternal IgG antibodies in infants less than 6 months of age. A positive B19V result was demonstrated in a 3-month-old child with congenital anemia.
**CONCLUSION:** The WHO recommends monitoring, including retrospectively, of rubella to focus on detecting CRS cases as well as performing a differential laboratory approach to testing. **KEY WORDS:** rubella, CRS, elimination

# ПОСТЕРНА СЕСИЯ III

## 26. ХЕПАТИТ Е ВИРУСНА КО-ИНФЕКЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ ИНФЕКТИРАНИ С ДРУГИ ХЕПАТИТНИ ВИРУСИ

Ч. Исмаилова, В. Йончева, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова НРЛ „Хепатитни вируси“, НЦЗПБ, София

Вирусът на хепатит Е (HEV) е петият хепатитен вирус по реда на своето откриване и е най-честият причинител на вирусен хепатит в света. Той причинява остър, а при имуносупресирани индивиди и хроничен хепатит. Инфекцията с HEV може да протече с усложнения в редица случаи като например съществуваща вече инфекция с друг хепатотропен вирус. Един от начините на трансмисия на HEV е фекално-оралният, по същият начин се разпространява и друг хепатитен вирус – Хепатит А (HAV). Въпреки, че с другите хепатотропни вируси – Хепатит В (HBV), Хепатит С (HCV) и Хепатит D (HDV), HEV не споделя общи пътища на трансмисия, редица проучвания установяват едновременното персистиране на HEV с тези вируси.

**Цел:** Целта на настоящото изследване е да се проучи честотата на хепатит Е вирусната ко-инфекция при пациенти със съпътстващ вирусен хепатит.

**Материали и методи:** Ретроспективно са проучени 832 серумни проби постъпили в НРЛ „Хепатитни вируси“ за периода от 01. 01. 2019 до 30. 06. 2021г. за лабораторно доказване и отдиференциране на остра хепатитна Е вирусна инфекция. Серумите са изследвани чрез имуноензимен метод ELISA (Dia Pro и Euroimmun) за наличие на антитела от клас Ig M срещу хепатит Е (anti-HEV IgM), антитела от клас Ig M срещу HAV (anti-HAV IgM), антитела срещу хепатит С (anti-HCV), антитела от клас IgM срещу HDV (anti-HDV IgM), а по отношение на HBV инфекция за – HBsAg, HBcore IgM, HBcore IgG, и HBeAg.

**Резултати:** От постъпилите 832 проби, положителни за anti-HEV IgM са 109 (13%), които в последствие са изследвани и за другите хепатитни вируси. От пациентите, положителни за антитела срещу HEV, 24 (22%) са положителни по отношение на останалите хепатитни вируси – HAV, HCV и HBV и са подразделени според вида ко-инфекция в три групи. В група I са изследвани 37 пациента за наличие на маркери за хепатит В вирусна инфекция, като 10 (27%) от тях дадоха положителен резултат. От позитивните за хепатит Е вируса 109 проби, 34 са изследвани за антитела срещу HCV, като в 3 (9%) се доказаха anti-HCV. Най-голям брой положителни проби бяха установени по отношение на HEV-HAV ко-инфекцията. В тази категория са изследвани 38 HEV IgM позитивни проби, от които 11 (29%) са положителни и за HAV. Пациентите с доказана HEV ко-инфекция са с диагноза остър вирусен хепатит (ОВХ) или друга по-тежка симптоматика – чернодробна недостатъчност. Наличие на HEV- HDV ко-инфекция не се доказа.

**Изводи:** Хепатит Е вирусната ко-инфекция се доказва при 22% от изследваните проби. Като най-голям процент (29%) се установява за HEV-HAV. Обяснение за това е общия път на трансмисия - фекално-орален, който се споделя от двата вируса. Това налага провеждане на по-задълбочени проучвания с цел изработване алгоритъм за правилна диференциална диагностика. Въпреки, че HEV инфекция при имунокомпетентни индивиди обикновено протича безсимптомно и самоограничаващо се наличието на ко-инфекция е предпоставка за развитие на симптоматика.

**Ключови думи: Хепатит Е, ко-инфекции, хепатитнивируси**

**Автор за кореспонденцея: chiydem.ismailova@abv.bg**

## 26. HEPATITIS E VIRAL COINFECTION IN PATIENTS INFECTED WITH OTHER HEPATITIS VIRUSES

Ch. Ismailova, V. Yontcheva, T. Tenev, E. Golkocheva-Markova
NRL "Hepatitis virus", NCIPD

Hepatitis E virus (HEV) is the most common enteric-transmitted virus that causes acute viral hepatitis, which usually occurs as a self-limiting liver infection. Among immunosuppressed patients the presence of HEV infection can lead to chronic hepatitis. The infection with HEV infection can be severe for many reasons. Such as a pre-existing infection with another hepatotropic virus. One of the modes of transmission of HEV is fecal-oral, in the same way another hepatitis virus - Hepatitis A (HAV) is spead. Although the virus does not share common routes of transmission with other hepatitis viruses - Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV), and Hepatitis D (HDV), a number of studies have found that HEV co- infection exist with these viruses.

**Aim:** The aim of the present study was to investigate the incidence of hepatitis E virus co-infection in patients with concomitant viral infection with some of the other hepatitis viruses

**Materials and methods:** The study covers the period of time from 01.01.2019 to 30.06.2021. During this period, NRL "Hepatitis Viruses" received 832 samples for testing antibodies to hepatitis E virus. Only serum samples that are positive for HEV IgM were tested for other hepatitis markers, indicators of acute infection. Serums were tested by ELISA (Dia Pro and Euroimmun). Samples were tested for detection of: HEV Ig M antibodies, HAV Ig M antibodies, hepatitis C antibodies, HDV Ig M antibodies. The markers for current HBV hepatitis infection are: HBsAg / HBcore IgM / HBeAg.

**Results:** Of the 832 samples that were received, 109 (13%) were positive for anti- HEV IgM. The positive samples were subsequently tested for other hepatitis viruses and we established 24 (22%) positive for other hepatitis viruses - HAV, HCV and HBV. According to the type of co-infection three groups were subdivided. In group I, 37 patients were examined for the presence of markers of hepatitis B virus infection, and 10 (27%) of them were positive. In Group II, 34 sera were tested for anti-HCV antibodies and 3 (9%) were anti-HCV positive. The highest number of positive samples was found for HEV-HAV co-infection (Group III). In this category, 38 HEV IgM positive samples were tested, of which 11 (29%) were also positive for HAV. Patients with proven HEV co-infection are diagnosed with acute viral hepatitis (ACH) or other more severe symptoms - liver failure. The presence of HEV-HDV co-infection has not been established

**Conclusion**: Hepatitis E viral co-infection was detected in 22% of the tested samples. The highest percentage (29%) was found for HEV-HAV group. The common route of transmission - fecal-oral, which is shared by both virusesb, may be the reason for these results. This requires more in-depth research in order to develop an algorithm for correct differential diagnosis. Although HEV infection in immunocompetent individuals is usually asymptomatic and the self-limiting presence of co-infection is a prerequisite for the development of symptoms.

**Key words**: Hepatitis E virus, co-infection, hepatitis virus

## 27.МИКРОБИОЛОГИЧНИ И ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ YERSINIA ENTEROCOLITICA В БЪЛГАРИЯ

[1] Екатерина Александова, [1] М. Павлова, [2] В. Велев, [2] M. Popov [3] Y. Kalchev

[1] Национален център по заразни и паразитни болести – София

[2] СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“, Медицински университет – София

[3] УМБАЛ „Св. Георги “, Медицински университет - Пловдив

Ентеропатогенната *Yersinia enterocolitica* е широко разпространена в природата и засяга хора и животни. Инфекцията, причинена от *Y. enterocolitica* е все по -призната зооноза, причиняваща хранително отравяне, като тя е петата най -честата чревна бактериална причина за хранително заболяване в света. В България, *Y. enterocolitica* е рядко изолирана и това не се дължина липсата на йерсиниози, а от неглижиране на патогена.
ЦЕЛ. Да се проучат микробиологичните и генетични характеристики на запазени клинични изолати Y. enterocolitica от различни райони в България.
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ. Чрез микробиологични методи – култивиране; биохимични тестове; серотипиране; автоматизирани системи за идентификация- MALDI-TOF; VITEL2 и генетични методи – PCR анализ са изследвани 30 щама *Y. enterocolitica*, изолирани от пациенти с ентерит от различни райони на страната на възраст 1 – 80 години.
РЕЗУЛТАТИ. От изследваните 30 щама Y. enterocolitika само един приналежи на серо група O9, всички останали са O3, което е характерно за географското разпространение на серогрупите. Един от изолатите беше определен от MALDI-TOF като *enterocolitica*, за разлика от резулатите от VITEK2 системата и API20 E, които го определиха като Y. aldovae, често изолирана от риби и водоеми. Два от изолатите са хемокултура от имунокомпроментирани пациенти на 74 и 80 г, всички останали 28 са изолати от фецеси, като само един от тях е на възрастно лице (34г). Най- засегната е групата на малките деца 1 – 6 г, с остър ентерит. Резултатите от PCR анализът за доказване на ентеротоксини (ystA / ystB) в *Y. enterocolitica* показват, че генетично всички изследвани изолата притегават само един ген за термостабилен ентеротоксин yestA.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Високата честота на изолати патогенна *Y. enterocolitica* сред българските деца е сигнал за нуждата от насочена и акуратна диагностика на йерсиниозите, които не рядко водят до усложнения като реактивен артрит.
Ключови думи: Yersinia enterocolitica, ентерит, йерсиниоза.

## 27. MICROBIOLOGICAL AND GENETIC STUDIES OF YERSINIA ENTEROCOLITICA CLINICAL ISOLATES IN BULGARIA

Ek. Alexandrova[1], M. Pavlova[1], V. Velev[2], M. Popov[2], Yordan Kalchev[3]

[1] National Center of Infectious and Parasitic Diseases – Sofia

[2] University Hospital for Infectious and Parasitic Diseases "Prof. Ivan Kirov", Medical University – Sofia

[3] Department of Microbiology and Immunology Medical University - Plovdiv

The enteropathogenic Yersinia enterocolitica is widespread in nature and affects humans and animals. Y. enterocolitica infection is an increasingly recognized zoonosis causing food poisoning, being the fifth most common intestinal bacterial cause of foodborne illness in the world. In Bulgaria, Y. enterocolitica is rarely isolated and this is not due to the lack of yersiniosis, but from the neglect of the pathogen.

PURPOSE. To study the microbiological and genetic characteristics of preserved clinical isolates of Y. enterocolitica from different regions in Bulgaria.

MATERIALS AND METHODS. By microbiological methods - cultivation; biochemical tests; serotyping; automated identification systems - MALDI-TOF; VITEL2 and genetic methods - PCR analysis examined 30 strains of Y. enterocolitica, isolated from patients with enteritis from different regions of the country aged 1 - 80 years.

RESULTS. Of the 30 strains of Y. enterocolitika studied, only one belongs to the sero group O9, all the others are O3, which is characteristic of the geographical distribution of the serogroups. One of the isolates was identified by MALDI-TOF as enterocolitica, in contrast to the results of the VITEK2 system and API20 E, which identified it as Y. aldovae, often isolated from fish and ponds. Two of the isolates were a blood culture from immunocompromised patients aged 74 and 80 years, all the other 28 were faecal isolates, with only one of them being an adult (34 years). The most affected is the group of young children 1-6 years, with acute enteritis. The results of the PCR analysis for the detection of enterotoxins (ystA / ystB) in Y. enterocolitica show that genetically all tested isolates have only one gene for the thermostable enterotoxin yestA.

CONCLUSION. The high frequency of isolates pathogenic Y. enterocolitica among Bulgarian children is a signal of the need for targeted and accurate diagnosis of yersiniosis, which often leads to complications such as reactive arthritis.

Key words: Yersinia enterocolitis, enteritis, yersiniosis.

## 28. НАЛИЧИЕ НА ANTI – HBSAG СРЕД HIV ИНФЕКТИРАНИ ПАЦИЕНТИ В БЪЛГАРИЯ – НАЧАЛНО ПРОУЧВАНЕ ЗА ПЕРИОДА 2018 – 2021 ГОДИНА

В. Йончева[1], Ч. Исмаилова[1], Т.Тенев [1] Е. Голкочева – Маркова[1]

1- НРЛ "Хепатитни вируси"- НЦЗПБ , София

**Цел:** Да се провери наличието на защитни антитела срещу хепатит В вируса (HBV) сред HIV положителни пациенти, родени след 1992 година. Изследвани са проби, постъпили за диагностика на хепатитни маркери в НРЛ „Хепатитни вируси"
**Материали и методи:** За периода от 2018 до 2021 година в НРЛ „Хепатитни вируси" са изследвани 80 серумни проби на HIV положителни пациенти. Посредством ELISA метод е направено изследване за наличие на протективни антитела срещу HBV (anti – HBsAg- Ab). Наличие на защитни антитела се приема при условие, че те са над 10 mIU/ml.
**Резултати:** При 23 (28.75%) серумни проби на HIV положителни пациенти, се доказа наличие на anti – HBsAg, чиито титри варират в границите от 16 до над 250 mIU/ml. . От тях при 5 (6,25%) се доказват антитела с много висок титър - над 250 mIU/ml.
**Заключение:**

От 1992 година насам в имунизационния календар на Република България е въведено задължително ваксиниране на новородените срещу HBV. Проведеното от нас изследване на HIV положителни лица установи наличие на защитни анти - HBsAg антитела срещу HBV при 28.75% от пациентите.
Все още броят на изследваните лица е твърде малък, за да се направят по обобщени изводи.
**Ключови думи:** HIV; HBV; анти – HBs - Ab

## 28. PRESENCE OF ANTI-HBSAG AMONG HIV-INFECTED PATIENTS IN BULGARIA - INITIAL STUDY FOR THE PERIOD 2018 - 2021

V. Yoncheva[1], Ch. Ismailova[1], T.Tenev [1], E. Golkocheva - Markova[1]
1- NRL "Hepatitis viruses" - NCIPD, Sofia

**Aim**: To test for the presence of protective antibodies against hepatitis B virus (HBV) among HIV-positive people born after 1992. Samples received for the diagnosis of hepatitis markets in NRL "Hepatitis viruses" were tested.

**Materials and methods:** For the period from 2018 to 2021, 80 serum samples of HIV-positive patients were tested in the Hepatitis Virus NRL. The presence of protective antibodies against HBV (anti-HBsAg-Ab) was tested by ELISA. The presence of protective antibodies is considered provided that they are above 10 mIU / ml.

**Results:** In 23 (28.75%) serum samples of HIV-positive users, the presence of anti-HBsAg was demonstrated, the titers of which ranged from 16 to over 250 mIU / ml. . Of these, 5 (6.25%) showed antibodies with a very high titer - over 250 mIU / ml.

**Conclusion:**

Since 1992, compulsory vaccination of newborns against HBV has been introduced in the immunization calendar of the Republic of Bulgaria. Our study of HIV-positive individuals found the presence of protective anti-HBsAg antibodies against HVV in 28.75% of patients. Moreover, the number of respondents is too small to draw general conclusions. Key words: HIV; HBV; anti - HBs - Ab

## *29. BORRELIA BURGDORFERI* S.L. В ГЛАДНИ КЪРЛЕЖИ ОТ РАЗЛИЧНИ ОБЛАСТИ НА БЪЛГАРИЯ

Е.Панайотова, Е.Тасева, И.Панайотова, И.Христова
Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, София, България

**Въведение**: Лаймската борелиоза е най-честото заболяване, предавано от кърлежи в Северното полукълбо. Човек се заразява с бактериалния причинител на инфекцията (*Borrelia burgdorferi* s.l) при ухапване от заразен кърлеж. Ежегодно в България се регистрират висок брой заразени с Лаймска болест (2019 г. -393 , 2020 г. – 153 случая). Ето защо, ние потърсихме каква е заразеността на гладните кърлежи в природата в различни региони.

**Цел**: Събиране и изследване на гладни кърлежи – вектори на Лаймската борелиоза от различни области на страната за установяване на *B.burgdorferi* s.l.

**Материали и методи**: Кърлежите са събрани по флагов метод по тревни площи. Определени са видово по морфологични белези (методика на Померанцев, 1950). Кърлежите са хомогенизирани с циркониеви перли (0.5mm-1mm диаметър) в хомогенизатор Beadbug (Benchmark Scientific). Екстракция на ДНК е проведена с помощта на търговски кит за екстракция на QIAGEN. Детекцията на ДНК на *B.burgdorferi* s.l. беше осъществена чрез nested PCR за амплификация на интергенен спейсърен регион между 5S и 23S rRNA гени (Rijpkema, 1995). Реакциите бяха проведени на термосайклер (Gene explorer, Bioer). Ампликоните бяха визуализирани чрез агарозна гел-електрофореза и отчетени на UV-трансилюминатор (Compact Digimage System; Major Science).

**Резултати**: За периода август 2020 до юли 2021 са събрани общо 556 иксодови кърлежа от 16 области на страната. Болшинството от тях (93.3%) са от вида *Ixodes ricinus*, останалите кърлежи са от видовете *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis punctata* и *Hyalomma marginatum*. По пол и стадий на развитие разпределението на събраните кърлежи е – 36.7% нимфи, 29.1% женски, 27.3% мъжки и 6.8% ларви. С nested PCR за детекция на *B.burgoderfi* s.l. дотук бяха изследвани 154 кърлежа от вида *I. ricinus*. ДНК на причинителя на Лаймската борелиоза открихме в 9 от изследваните кърлежа – шест от област Силистра, два от област Стара Загора и един от област София-град. Така заразеността на кърлежите възлиза на 5.8%.

**Заключение**: Заразеността на кърлежите от вида *I.ricinus* с причинителя на Лаймската борелиоза не е висока. Това вероятно се дължи на високият дял на иксодови кърлежи в стадий нимфа.

**Благодарности**: Това проучване бе проведено благодарение на Фонд Научни Изследвания, България, договор №КР-М33/3/13.12.2019
**Ключови думи**: кърлежи, Лаймска борелиоза

## 29. BORRELIA BURGDORFERI S.L. IN QUESTING TICKS IN VARIOUS DISTRICTS OF BULGARIA

E.Panayotova, E. Taseva, I. Panayotova, I.Christova
National Center of Infectious and Parasitic Diseases

**Introduction**: Lyme borreliosis is the most common tick-borne infection in the Northern hemisphere. People get infected with the etiological agent (*Borrelia burgdorferi* s.l) when bitten by an infected tick. High numbers of cases are registered in Bulgaria each year (2019 – 393, 2020 – 153). This is why we wanted to assess the infection rate of questing ticks in different districts of the country.

**Aim**: Collection of questing ticks – vectors of Lyme borreliosis, from various districts of Bulgaria and detection of *B.burgdorferi* s.l.

**Materials and methods**: The ticks were collected through flagging method. They were morphologically identified to the species level using taxonomic keys (Pomerancev, 1950). The ticks were homogenized with zirconium beads (0.5-1mm diameter) in homogenizer Beadbug (Benchmark Scientific). DNA extraction was performed with QIAGEN commercial DNA Extraction kit. DNA of *B.burgdorferi* s.l was detected with nested PCR that amplifies an intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes (Rijpkema, 1995). PCR reactions were performed in a thermocycler (Gene explorer, Bioer). All amplicons were visualized through agarose gel-electrophoresis and an UV Transilluminator.

**Results**: Between August 2020 and July 2021 a total of 556 ixodid ticks were collected from 16 districts of the country. The majority (93.3%) belonged to the species *Ixodes ricinus*, the others belonged to the species *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis punctata* and *Hyalomma marginatum.* The collected ticks were mainly nymphs (36.7%), followed by adult females (29.1%), adult males (27.3%) and larvae (6.8%). A total of 154 *I.ricinus* ticks have been tested for *B.burgdorferi* s.l so far. DNA of the causative agent of Lyme borreliosis was detected in 9 of the tested ticks – six originating from Silistra district, two from Stara Zagora district and one from Sofia-city district. The infection rate of the tested ticks is 5.8%.

**Conclusions**: The infection rate of *I.ricinus* ticks with the causative agent of Lyme borreliosis is not high. This is probably due to the high percentage of nymphs among the collected ticks.

**Acknowledgments**: The study was supported by the National Science Fund, Bulgaria, project №КР- М33/3/13.12.2019

**Key terms**: ticks, Lyme borreliosis

## 30. СЕРОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ ПРИ ПТИЦИ ЗА НАЛИЧИЕ НА IGG (IGY) АНТИТЕЛА СРЕЩУ ПРИЧИНИТЕЛИТЕ НА ЛАЙМСКА БОЛЕСТ И ЗАПАДНО-НИЛСКА ТРЕСКА

И. Трифонова[1], Н. Иванова-Александрова[1], И. Христова[1], Т.Гладнишка[1], В. Иванова[1], Е. Панайотова[1], Е. Тасева[1],Д. Димитров[2], М. Маринов[2], М. Илиева[2], Г. Каменов[1], П. Зехтинджиев[2]

[1] *Национален център по заразни и паразитни болести, София*

[2] *Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН, София*

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

В нашата страна двете най-често регистрирани векторно-преносими заболявания са Лаймската борелиоза и Западно-Нилската треска. Двете инфекции се различават по вида на своя причинител – едната е бактериална (*B.burgdorferi*s.l), другата вирусна (WNV) и покомпетентния вектор – Лаймската болет се предава от кърлежи (род *Ixodes*), а ЗНТ – от комари (род *Culex*). Това, което е общо между тях и е предмет на настоящото проучване е един от резервоарите във природната им верига на трансмисия – птиците.

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

**Материали и методи:** С помощта на ELISA метод бяха изследвани 91 броя серуми от птици от 17 различни вида (*Acrocephalus arundinaceus, Certhia familiaris, Erithacus rubecula, Fringilla coelebs, Garrulus glandarius, Luscinia megarhynchos, Motacilla flava, Oriolus oriolus, Parus major, Passer domesticus, Passer hispaniolensis, Picus viridis, Sitta europaea, Sylvia atricapilla, Sylvia curruca, Turdus merula, Turdus philomelos*).Пробонабирането беше осъществено в периода юни-юли 2021 г., в районите на гр. София и БЕБ „Калимок".

**Резултати и обсъждане:** От всички изследвани птици в 42 броя (42/91 – 46,15%) се установиха антитела срещу причиннителя на Лаймската болест, а в 17 броя (17/91 – 18,68%) антитела срещу вируса на ЗНТ. Едновременно наличие на антитела срещу двата причинителя се установи в 12 изследвани проби (12/91 – 13,18%).Анализът на резултатите по видове сочи, че от 17 различни вида птици в 9 са установени антитела срещу поне един от двата причинители.

За района на гр. София бяхаизследвани 49 серумни проби. В 32/49 – 65,30% от пробите бяха открити антитела срещу причинителя на Лаймската болест и само в 8/49 – 16,32% срещу ЗНТ. Като потенциален резервоар на *B.burgdorferi*могат да бъдат проучвани и обсъждани: *E. rubecula* (Черевногръдка),*G.glandarius* (Сойка),*P. major* (Голям синигер),*T. merula* (Кос) и*T. philomelos* (Поен дрозд). Антитела срещу вируса на ЗНТ се установиха при 8 птици от вида*T. merula,* като при всички се касае за едновременно наличие на антитела и към*B. burgdorferi.*

В района на БЕБ Калимок бяха събрани 36 проби. При проведените изследвания в 10 проби се откриха антитела срещу причинителя на Лаймската болест (10/36 – 27,77%), в 9 срещу вируса на ЗНТ (9/36 -25,00%), и в 9има данни за наличие на коинфекция (9/36 – 25,00%). За потенциални резервоари на двете инфекции може да бъдатпосочени*L. megarhynchos* (Южен славей) и *Acrocephalus arundinaceus* (Тръстиково шаварче).

**Заключение:** Получените до момента резултати не са изненадващи, те съответстват данните за разпространението на Лаймската болест и ЗНТ в нашатастрана, свързани са с наличието на векторите на инфекциите и местообитанията на птиците. Те очертават предпоставка за бъдещо разширяване на проучванията върху птиците като резервоари на *B.burgdorferi*и WNV.

**Благодарност:** Това проучване е с финансовата подкрепа на ФНИ, проект КП-06-Н33/16 от 21.12.2019 г.

## 30. SEROPREVALENCE IN BIRDS OF SPECIFIC IGY (IGG) ANTIBODIES AGAINST CAUSATIVE AGENTS OF LYME DISEASE AND WEST NILE FEVER

I. Trifonova[1],N.Ivanova-Aleksandrova[1],I. Christova[1], T. Gladnishka[1],E. Panayotova[1], E. Taseva[1], D.Dimitrov[2],M. MarinovP [2],M.Ilieva[2],G. Kamenov[1], P. Zehtindjiev [2]

[1]*National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia*
[2]*Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Sofia*

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

In our country, the two most commonly registered vector-borne diseases are Lyme borreliosis and West Nile fever. The two infections differ in the type of their causative agent - one is bacterial (*B.burgdorferi*sl), the other viral (WNV) and the competent vector - Lyme disease is transmitted by ticks (genus *Ixodes*), and WNF - by mosquitoes (genus *Culex*). What they have in common and is subject of this study is one of the reservoirs in their natural transmission chain - birds.

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

**Materials and methods:** 91 serum samples from birds of 17 different species (*Acrocephalusarundinaceus, Certhiafamiliaris, Erithacusrubecula, Fringillacoelebs, Garrulusglandarius, Lusciniamegarhynchos, Motacillaflava, Oriolusoriolus, Parus major, Pasus domestic, Passer hispaniolensis, Picusviridis, Sittaeuropaea, Sylvia atricapilla, Sylvia curruca, Turdusmerula, Turdusphilomelos*)were tested by ELISA method.The samples were collected in the period June-July 2021, in the regions of Sofia city and Kalimok.

**Results and discussion:** Of all the birds studied, specific antibodies against the causative agent of Lyme disease were found in 42 (42/91 - 46.15%) and antibodies against the virus of WNF in 17 (17/91 - 18.68%). Simultaneous presence of antibodies against both causative agents was found in 12 tested samples (12/91 - 13.18%). The analysis of the results by species shows that out of 17 different bird species, antibodies against at least one of the two causative agents were found in 9.

From Sofia cityregion 49 serum samples were tested. In 32/49 - 65.30% of them antibodies were found against the causative agent of Lyme disease and only in 8/49 - 16.32% against WNF. As a potential reservoir of *B. burgdorferi* can be discussed: *E. rubecula, G. glandarius, P. major, T. merulaand T. philomelos*. Antibodies against the WNV were detected in 8 birds of the species *T. merula*, all of which involved the simultaneous presence of antibodies against*B. burgdorferi*.

In the Kalimok area were collected 36 samples. In 10 of them, antibodies were detected against the causative agent of Lyme disease (10/36 - 27.77%), in 9 against the FTA virus (9/36 -25.00%), and in 9 there were data on the presence of coinfection (9/36 - 25.00%). *L. megarhynchos* and *A.arundinaceus*can be mentioned as potential reservoirs for both infections.

**Conclusion:** The results obtained so far are not surprising, they correspond to the data on the spread of Lyme disease and WNF in our country, vectors presentation and bird habitats. They give a premisefor future expansion of studies on birds as reservoirs of *B.burgdorferi*and WNV.

**Acknowledgement:** This study is with the financial support of National Science Fund, project KP-06-H33 / 16 from 21.12.2019.

## 31. ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ КРЪВ И КЪРЛЕЖИ СЪБРАНИ ОТ ПТИЦИ

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

*Национален център по заразни и паразитни болести*
*2 Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН*

**Въведение**: Проучванията върху гръбначните животни поддържащи векторно-предавани инфекции са продължителен процес. В природните екосистеми, взаимоотношенията в биологичната система резервоар-преносител-причинител са динамични и променливи, и това влияе върху превалирането на инфекциите във времето и пространството.
**Цел** на настоящата работа е да представи текущите резултати от проучване върху ролята на птиците като резервоари на Лаймска болест и Западнонилска треска, на базата на изследвания на кръвни проби от птици и кърлежи свалени от птици.
**Материали и методи:** Уловът на птици беше проведен в град София и Биологична експериментална база „Калимок (обл. Силистра) през април 2020 – юли 2021 г. Откритите по птиците кърлежи бяха извадени с пинсета. От подкрилната вена на птиците беше взета между 30 μL и 70 μL кръв, събирана в хепаринизирана капилярка и замразявана на –80°C. Кърлежите бяха хомогенизирани за една минута с циркониеви перли в хомогенизатор BeadBug. ДНК от кърлежите и от кръвните проби беше екстрахирана с готов кит за екстракция DNeasy blood & tissue, а РНК с търговски кит QIAamp Viral RNA mini kit. За детекция на ДНК на *B.burgdorferi* sensu lato беше проведен nested PCR за амплификация. Ампликоните бяха визуализирани чрез агарозна гел-електрофореза. РНК на вируса на ЗНТ потърсихме с помощта на real time qRT-PCR за амплификация.
**Резултати и обсъждане:** Общо 1311 птици бяха уловени от двете места. От всички птици бяха събрани 226 кърлежа (198 *Ixodes ricinus*; 28 *Hyalomma marginatum*) и 146 кръвни проби. Изследвани за *B. burgdorferi* s.l са всички кърлежи, като предварително бяха разпределени в отделни пулове. Заразеност се установи при 6.2% (14/226) кърлежи от вида *Ix.ricinus*, включително и при ларви. Изследваните досега 36 кръвни проби за *B. burgdorferi* s.l са отрицателни. Изследваните за Западнонилска треска 52 кръвни проби, също са отрицателни.

**Ключови думи:** птици, вирус ЗНТ, борелии

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

## 31. LABORATORY STUDIES ON BLOOD AND TICKS FROM BIRDS

Mitkova N[1], Trifonova I[1], Christova I[1], Panayotova E[1], Taseva E[1], Gladnishka T[1], Ivanova V[1], Kamenov G[1], Dimitrov D[2], Marinov M P[2], Zehtindjiev P[2]

[1] *National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia*
[2] *Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Sofia*

**Introduction:** Investigations of the vertebrates maintaining vector-borne infections are prolonged process. In natural ecosystems, the reservoir host-vector-pathogen relationships are dynamic, variable and affect the spatiotemporal prevalence of the infections.
The **aim** of this work is to present current results from investigation of birds as reservoirs of Lyme disease and West Nile virus by laboratory testing on blood samples and ixodid ticks removed from birds.
**Materials and methods:** Birds were caught in Sofia parks and Biological Experimental Station Kalimok, Silistra region between April 2020 and July 2021. All ticks found on birds were collected by tweezer. Blood samples of 30-70 μL were taken from *v. subcutanea ulnaris* by heparinized capillary tubes and stored at –80°C. The ticks were homogenized for one min by zirconium pearls in homogenizer BeadBug. DNA from the ticks and from the blood samples was extracted by commercially available kit DNeasy blood & tissue. RNA was extracted by QIAamp Viral RNA mini kit. To detect DNA of *B. burgdorferi* sensu lato a nested PCR was conducted. Amplicons were visualized by agarose-electrophoresis. RNA of West Nile virus was detected by real time qRT-PCR.
**Results and discussion:** A total of 1311 bird individuals were caught at two sites. We found 226 ticks belonging to *Ixodes ricinus* (n=198) and *Hyalomma marginatum* (n=28) and took 146 blood samples. All ticks were separated in pools and were tested for *B. burgdorferi* s.l. Overall, 6.2% (14/226) tick of *Ix. ricinus* were found infected, including larvae. Until now, 36 blood samples for *B. burgdorferi* s.l and 52 blood samples for West Nile virus were investigated. All results were negatives.

**Keywords:** birds, WNV, borreliae

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

## 32. ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ЗАРАЗЕНОСТТА НА КЪРЛЕЖИТЕ, СВАЛЕНИ ОТ ПАЦИЕНТИ С *BORRELIA BURGDORFERI* И БРОЯ ИМ В ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРАТА И ВАЛЕЖИТЕ ПРЕЗ 2016-2021 ГОДИНИ

Т. Гладнишка, В. Иванова, И. Христова, И. Трифонова, Е. Панайотова, Е. Тасева
НЦЗПБ

**Ключови думи**: *B. burgdorferi,* ticks, meteorological factors

**Цел**: Да се проучи заразеността на изследваните в лабораторията кърлежи с *B. burgdorferi* и броя им спрямо температурата и валежите през 2016-2021г.

**Материали/методи**: Изследвани бяха общо 10907 броя кърлежи, свалени от пациенти от цялата страна: през 2016г.- 1158 бр., през 2017г.- 1895 бр., през 2018г.- 2347 бр., през 2019г. - 1985 бр., през 2020г.- 2052 бр., до края на юли 2021г.- 1470 бр. Кърлежите бяха изследвани морфологично с микроскоп „Leika" и определени до вид и стадий на развитие. Проведохме nested PCR за доказване на два участъка от спейсърния регион между 5S и 23S на рРНК на *B. burgdorferi* sl. Необходимите метеорологични данни получихме от freemeteo.bg и meteoblue.com.

**Резултати**: Чрез микроскопското изследване установихме, че 93-96% от кърлежите спадаха към вида *Ixodes ricinus.* С PCR получихме следните данни за заразеност на кърлежите от град София и областта: 21,03% през 2016г., 20,70% - през 2017г., 9,47% - през 2018г., 22,47% - през 2019г., 15,02% - през 2020г., през 2021г. - 20,41%. През 6-годишния период най-голям брой кърлежи през месец май наблюдавахме през 2018г., а през юни беше установен пик през 2016, 2017, 2019, 2020 и 2021г., което беше анализирано спрямо средната температура и валежи.

**Заключение**: Увеличаване броя кърлежи беше наблюдавано при средни температури около 20°C, при валежи 5-10 mm в дните през май и юни- 2016г. и 2017г. Само през 2018г. броя кърлежи беше най-висок през май, при наличието на високи температури, без резки колебания, с 30-40 дни валежи още от края на април. През 2019г. повишаването броя на кърлежите през юни вървеше паралелно с увеличаване на температурите и валежите от средата на май до средата на юни. През 2020г. най-много валежи бяха наблюдавани през май и с плавното повишение на температурите това доведе до най-голям брой кърлежи през юни. През 2021г. пролетта беше със средни температури около 20°C, с много дъждове през април, май и юни, което доведе до най- високия брой кърлежи през юни през 6-годишния период.

## 32. STUDY ON TICKS REMOVED FROM PATIENTS FOR INFECTIONS WITH BORRELIA BURGDORFERI AND THEIR NUMBER DEPENDING ON TEMPERATURE AND PRECIPITATION IN 2016-2021

T. Gladnishka, V. Ivanova, I. Christova, I. Trifonova, E. Panayotova, E. Taseva NCIPD

**Key words:** *B. burgdorferi,* ticks, meteorological factors

**Aim:** To investigate the infections with *B. burgdorferi* in ticks removed from patients and their number relative to temperature and precipitation in 2016-2021.

**Materials/methods:** Total 10907 ticks were collected from patients all over the country: 1158 ticks in 2016, 1895 ticks in 2017, 2347 ticks in 2018, 1985 ticks in 2019, 2052 ticks in 2020 and 1470 ticks until the end of July 2021. They were identified morphologically with a microscope "Leika" and determined to the species and stage of development. Nested PCR were performed to prove two regions of the spacer region between 5S and 23S of *B. burgdorferi* sl rRNA. The weather data were received from freemeteo.bg and meteoblue.com.

**Results:** It was found that between 92-96% of ticks belonged to the species *Ixodes ricinus.* PCR data for infestation of ticks from Sofia city were found in 21,03% of the samples in 2016, 20,70% of the samples in 2017, 9,47% of the samples in 2018, 22,47% of the samples in 2019, 15,02% of the samples in 2020 and 20,41% of the samples in 2021. The highest number of ticks in May was observed in 2018, and in June a peak was found in 2016, 2017, 2019, 2020 and 2021, which was analyzed against average temperature and precipitation during the 6-year period.

**Conclusion:** An increase in the number of ticks was observed at average temperatures around 20°C, with rainfall of 5-10 mm on the days in May and June - 2016 and 2017. The number of ticks was highest in May only in 2018, in the presence of high temperatures, without sharp fluctuations, with 30-40 days of precipitation since the end of April. The increase in the number of ticks in June went in parallel with an increase in temperatures and precipitation from mid-May to mid-June in 2019. The most precipitation was observed in May and with the smooth rise in temperatures this led to the largest number of ticks in June 2020. The spring had average temperatures around 20°C, with a lot of rain in April, May and June, which led to the highest number of ticks in June 2021during the 6-year period.

## 33.ХАНТАВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ – АНАЛИЗ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО ИМ ЗА ПЕРИОД ОТ 10 ГОДИНИ, 2011-2020 Г.

Е.Тасева, И.Христова, Е. Панайотова Национален Център по Заразни и Паразитни болести, София

Национална референтна лаборатория по кърлежово/векторно преносими инфекции, листерии и лептоспири
Ключови думи: *хантавируси, хеморагична треска с бъбречен синдром, разпространение*

**ВЪВЕДЕНИЕ:** Хеморагичната треска с бъбречен синдром (ХТБС) е остра вирусна хеморагична треска, характеризираща със сериозно увреждане на бъбреците, тежко протичане и висок леталитет. През последните няколко десетилетия познанията за хантавирусната инфекция се подобряват значително в световен мащаб, но броя и разпространението на огнищата на хантавируси се увеличават. ХТБС се причинява от няколко вида хантавируси, принадлежащи към сем. *Hantaviridae,* разред *Bunyavirales*. За Европа основните видове хантавируси, причиняващи заболяването, са: Пуумала (PUUV), Добрава (DOBV), Саарема (SAAV) и Tula. ХТБС е ендемично заболяване за България като през последните години се регистрират между 5 и 10 случая годишно, предимно от Рило-Родопската област на страната.
**ЦЕЛ:** Да се проучи разпространението на хантавирусите, причиняващи ХТБС в България за периода 2011-2020 г. и да се анализира заболяемостта от тази инфекция.
**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:** За проучвания период в НРЛ „Кърлежово/векторно преносими инфекции, листерии и лептоспири" бяха изследвани 396 проби от пациенти за доказване на антитела срещу причинителите на ХТБС чрез ELISA метод. За потвърждаване на вида хантавирус беше приложен имуноблот и Real time PCR.
**РЕЗУЛТАТИ:** Заболяемостта от ХТБС за проучвания период варираше, като най-висока беше през 2013 г. (0.21%) и през 2016 г. (0.19% ). Леталитетът беше най-висок през 2018 г. (42.86%). От изследваните 396 проби, 67 бяха потвърдени с наличие на ИгГ и ИгМ антитела срещу хантавируси (16.9%). Най-висок процент положителни проби бяха доказани през 2013 и 2016 г. С имуноблот тест в 59 от пробите беше доказан хантавирус *Dobrava-Belgrade (DOBV)* и в 8 – *Puumala (PUUV).* Наличие на РНК на вируса беше доказан в 10 от тях с Real time PCR. От заболелите 61 бяха мъже и 6 жени. Най-засегната възрастова група бяха пациенти на възраст 40-44 г. (13/67). Най-висок брой заболели бяха регистрирани в областите: Пазарджик (19/67) и Пловдив (10/67). Единични случаи бяха открити в областите: Благоевград, Габрово и Добрич. Само в областите Пловдив, Пазарджик и София бяха доказани случаи с наличие на хантавирус *Puumala*, докато в останалите области –хантавирус *Dobrava-Belgrade.*
**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Хантавирусните инфекции се възприемат като глобален проблем на здравеопазването, тъй като се наблюдават повсеместно и значението им непрекъснато расте. Необходима е здравно-просветна дейност сред населението на природно-огнищните зони за начините на заразяване и предпазването от болестта.

## 33. HANTAVIRUS INFECTIONS IN BULGARIA - ANALYSIS OF THEIR SPREAD FOR A PERIOD OF 10 YEARS, 2011-2020

E. Taseva, I. Christova, E. Panayotova
National Center for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
National Reference Laboratory of vector borne infections, listeria and leptospires
Keywords: *hantaviruses, hemorrhagic fever with renal syndrome, spread*

**INTRODUCTION:** Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is an acute viral hemorrhagic fever with severe renal demage, severe course and high mortality. Over the last few decades, knowledge of the infection with hantaviruses has improved worldwide, but number and spread to hantavirus outbreaks have been increased. HFRS is caused by several species of hantaviruses belonging to the family *Hantaviridae*, order *Bunyavirales*. For Europe, the different types of hantaviruses that cause the disease are: *Puumala (PUUV), Dobrava (DOBV), Saarema (SAAV)* and *Tula*. HFRS is an endemic disease for Bulgaria and in recent years between 5 and 10 cases per year have been registered, mainly from the Rila-Rhodope region of the country.
**AIM:** study the prevalence of hantaviruses causing HFRS in Bulgaria for the period 2011-2020 and to analyze the incidence of this infection.
**MATERIALS AND METHODS:** For the study period in the NRL "Tick/ vector-borne infections, listeria and leptospira" were studied 396 samples from patients to detect antibodies against the causative agents of HFRS by ELISA method. Immunoblot test and Real time PCR were used to confirm the hantavirus type.
**RESULTS:** The frequency of HFRS for the study period varied, with the highest in 2013 (0.21%) and in 2016 (0.19%). Mortality was highest in 2018 (42.86%). Of the 396 samples tested, 67 were confirmed with IgG and IgM antibodies against hantaviruses (16.9%). The highest percentage of positive samples was found in 2013 and 2016. With an immunoblot test in 59 of the samples was detected hantavirus *Dobrava-Belgrade (DOBV)* and in 8 - *Puumala (PUUV)*. The presence of virus RNA was detected in 10 of them by real-time PCR. Of the patients, 61 were men and 6 were women. The most affected age group were people aged 40-44 (13/67). The highest number of patients was registered in the districts of Pazardzhik (19/67) and Plovdiv (10/67). Isolated cases were found in the districts of Blagoevgrad, Gabrovo and Dobrich. Only in the districts of Plovdiv, Pazardzhik and Sofia cases of the presence of the hantavirus *Puumala* were detected, while in the other districts - the hantavirus *Dobrava-Belgrade*.
**CONCLUSION:** Hantavirus infections are perceived as a global health problem, ubiquitous and their importance is constantly growing. Health and educational activities are needed among the population of the natural outbreak areas for the ways of infections and disease prevention.

## 34. ДОКАЗВАНЕ НА СЛАЙМ ПРОДУКЦИЯ ЧРЕЗ ФЕНОТИПНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ В КРЪВНИ ИЗОЛАТИ *STAPHYLOCOCCUS* SPP., ПОЛУЧЕНИ ОТ ПАЦИЕНТИ СЛЕД ХЕМАТОПОЕТИЧНА СТВОЛОВО-КЛЕТЪЧНА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ

Денис Ниязи[1, 2], Добромира Савова[1, 2], Милена Божкова[1, 2], Валя Каменова[2], Светомира Бижева[2], Теменуга Стоева[1, 2]

[1] *Катедра по Микробиология и вирусология, Медицински университет – Варна*

[2] *Лаборатория по Микробиология, УМБАЛ"Света Марина" - Варна*

**Цел**: Да се докаже продукцията на слайм в изолати *Staphylococcus* spp., получени от кръв на пациенти след хематопоетична стволово-клетъчна трансплантанция (ХСКТ), да се определи връзката между слайм продукция и носителство на *ica* оперон и да се проучи корелация между *ica* и *mec*A/*mec*C гените. **Материали и методи:** В периода 2019 - 2020г. двадесет и един неповтарящи се изолата *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis*, n=12; *S. haemolyticus*, n=4; *S. aureus*, n=3; *S. hominis*, n=2) бяха изолирани от хемокултури на пациенти след ХСКТ. Видовата идентификация и чувствителността към oxacillin бяха определени чрез автоматизираната система Phoenix (BD, USA). Фенотипно продукцията на слайм бе проучена чрез посявка на Congo red agar (CRA) и методът на Christensen (TT). За доказване на гените, кодиращи слайм продукция (*ica*A и *ica*D) и метицилинова резистентност (*mec*A и *mec*C) бе използван PCR метод. **Резултати**: Общо десет изолата (47.6%) бяха идентифицирани като носители на *ica* гени, от които 90% - *S. epidermidis*. Пет изолата (23.8%) позитивираха и в трите теста (PCR+, CRA+ и TT+). В пет от ica положителните изолати бяха доказани различни комбинации от резултати от двата фенотипни метода: n=2 – CRA (+), TT (-); n=1, CRA (-), TT (+); n=2 – CRA (-), TT (-). В допълнение, 3 ica (-) изолата демонстрираха положителна реакция само в TT теста, а други два ica (-) – в CRA теста. Общо 6 изолата (28.6%) бяха едновременно PCR, CRA и TT отрицателни. *Mec*A генът бе идентифицирани при 18 изолата (85.7%). Всички *ica* положителни *Staphylococcus* spp. бяха носители и на *mec*A гена. **Заключение**: Относително висок дял от кръвните изолати *Staphylococcus* spp. са слайм продуценти, като се асоциират с *ica* гените. С цел детекция на алтернативни пътища за слайм продукция е уместно комбинираното използване на фенотипните и генетични методи. Ко-експресията на *ica* и *mec*A се асоциира с появата на трудни за ерадикация изолати.

**Ключови думи:** слайм, хемокултура, стволово-клетъчна трансплантация

## 34.PHENOTYPIC AND MOLECULAR DETECTION OF BIOFILM PRODUCTION BY *STAPHYLOCOCCUS* SPP. OBTAINED FROM BLOOD SAMPLES OF PATIENTS UNDERGOING HEMATOPOIETIC STEM-CELL TRANSPLANTATION

Denis Niyazi[1, 2], Dobromira Savova[1, 2], Milena Bozhkova[1, 2], Valya Kamenova[2], Svetomira Bizheva[2], Temenuga Stoeva[1, 2]

[1]*Department of Microbiology and Virology, Medical University of Varna*

[2] *Microbiology laboratory, UMHAT "St. Marina"- Varna*

**Aim:** To detect the slime production in *Staphylococcus* spp., obtained from the blood samples of patients after hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT), to determine the relationship between slime production and *ica* operon carriage and to study the correlation between *ica* and *mec*A/*mec*C genes. **Materials and methods**: Between 2019 - 2020 twenty-one non-duplicate *Staphylococcus* spp. isolates (*S. epidermidis*, n=12; *S. haemolyticus*, n=4; *S. aureus*, n=3; *S. hominis*, n=2) were obtained from blood cultures of patients after HSCT. The species identification and the susceptibility to oxacillin were determined by the Phoenix Automated System (BD, USA). Phenotypically, slime production was studied by Congo red agar (CRA) inoculation and by Christensen's method (TT). A PCR method was used to detect the genes encoding slime production (*ica*A and *ica*D) and methicillin resistance (*mec*A and *mec*C). **Results:** Ten (47.6%) isolates were identified as carriers of *ica* genes, of which 90% - *S. epidermidis*. Five (23.8%) isolates were slime producers by all three methods (PCR+, CRA+ and TT+). In five of the *ica* positive isolates, different combinations of results from the two phenotypic methods were observed: n=2 – CRA (+), TT (-); n=1, CRA (-), TT (+); n=2 – CRA (-), TT (-). In addition, 3 *ica* (-) isolates demonstrated a positive result only by the TT and another two *ica* (-) were producers only by the CRA test. A total of 6 isolates (28.6%) were PCR, CRA and TT negative. The *mec*A gene was identified in 18 isolates (85.7%). All *ica* positive *Staphylococcus* spp. were also carriers of the *mec*A gene.
**Conclusion**: A relatively high proportion of the blood isolates *Staphylococcus* spp. were slime producers, associated with *ica* genes. The combined usage of phenotypic and genetic methods is recommended to detect alternative routes of slime production. The co-expression of *ica* and *mec*A is associated with the occurrence of difficult-to-eradicate isolates.
**Keywords**: slime, blood culture, stem-cell transplantation

**Адрес за кореспонденция:**
Проф. д-р Теменуга Стоева, дм
гр. Варна, бул. „Христо Смирненски" 1, УМБАЛ „Света Марина", лаборатория по Клинична микробиология
+359 887 614008
temenuga.stoeva@abv.bg

## 35. СЛУЧАЙ НА ДЕМОДЕКОЗА ПРИ ПАЦИЕНТКА С ХРОНИЧЕН БЛЕФАРИТ

Д. Йорданова, И. Биков, Р. Михайлов

СМДЛ „Рамус" ООД, София п.к.1592 бул."Капитан Списаревски"ж.к."Дружба"
Jordanova.1947@abv.bg 0886898200

Ключови думи: демодекоза, блефарит

Demodex foliculorum (Simon,1842) и Demodex brevis (Akbulatova,1963) са два вида на малък паразитен кърлеж, който обитава космените фоликули, пилосебацейните и мейбомиевите жлези. От 140 вида Demodex само тези два вида се откриват върху човешкото тяло. В офталмологията демодекозата се изразява като хроничен блефарит - намаляване броя на миглите, неправилното им подреждане хронично възпаление на мастните жлези, конюнктивит и кератит. Демодекозата се свързва с отделни случаи на розацея, акне вулгарис, себороичен дерматит. Патогенезата е свързана с блокаж на туболите на мастните жлези от паразитите, реактивна хиперкератоза и епителна хиперплазия.

**Цел:** Представения случай има за цел да покаже, че макар да липсват данни за заболяването у нас, то се среща и създава диагностични трудности.

**Материал и методи:** Материала за изследване е взет посредством „епилационен метод". Миглите се изследваха на увеличение 10х10 и 10х40 със светлинен микроскоп. При микроскопиране се откриха 2 паразита в близост до булбуса на миглите. Идентификацията на паразита е извършена съгласно литература за Demodex (Desch and Nutting 1972,1977). Измерването на паразита се извърши с оптичен микрометър. Паразитите се определиха като Demodex brevis.

**Резултати:** Случая се отнася до 43 годишна жена с хроничен блефарит изразяващ се в сърбеж и зачервяване по ръба на клепача, отделяне на мазни люспи, фотофобия и конюнктивит. Въпреки приложеното лечение състоянието на пациентката не се е подобрило. В много от случаите, когато конвенционалната терапия е неуспешна се прилагат акарицидни средства, които елиминират клиничната симптоматика.

**Заключение:** По литературни данни заболяването е космополитно, увеличават се случаите с нарастването на възрастта. По-чести са случаите с Demodex brevis при хроничните блефарити.

## 35. CASE OF DEMODECOSIS IN A PATIENT WITH CHRONIC BLEPHARITIS

D. Yordanova, I. Bikov, R. Mihaylov

SMDL "Ramus" Ltd., Sofia-1592

Key words: demodicosis, blepharitis

Demodex follicullorum (Simon, 1842) and Demodex brevis (Akbulatova, 1963) are two types of small parasitic mite that inhabit the hair follicles, pilosebaceous and meibomian glands. From 140 species types of Demodex, only these two are found on the human body. In ophthalmology, demodicosis leads to chronic blepharitis - a decrease in the number of eyelashes, their misalignment, chronic inflammation of the sebaceous glands, conjunctivitis, and keratitis. Demodecosis is associated also with isolated cases of rosacea, acne vulgaris, seborrheic dermatitis. The pathogenesis is related with blockage of the tubules of the sebaceous glands with the parasites, reactive hyperkeratosis, and epithelial hyperplasia.

**Aim**: The presented case aims to show that although there is no recordings on the disease in our country, it occurs and creates diagnostic difficulties.

**Material and methods**: The test material was taken using the "epilation method". The lashes were examined at 10x10 and 10x40 magnification with a light microscope. Microscopy revealed 2 parasites near the eyelash bulb. The identification of the parasite was performed according to the Demodex survey (Desch and Nutting 1972, 1977). The parasite was measured with an optical micrometer and identified as Demodex brevis.

The case is about a 43-year-old woman with chronic blepharitis manifested by itching and redness on the edge of the eyelid, oily scales, photophobia and conjunctivitis. Despite the treatment, the patient's condition did not improve. In many cases, when conventional therapy is not a success, acaricides are used and they are eliminating the clinical symptoms.

**Conclusion:** According to scientific data, the disease is cosmopolitan, the cases increase with age.

Demodex brevis is more common in chronic blepharitis.

## 36. НАНОСРЕБРО ЗА ДЕЗИНФЕКЦИЯ НА ПОВЪРХНОСТИ – НЕПОСРЕДСТВЕН ЕФЕКТ И ОСТАТЪЧНА ЕФЕКТИВНОСТ

М. Николова[1], С. Йорданова[1], Е. Алексов[1]

1 - Национален център по заразни и паразитни болести, София
disinfection@ncipd.org ; disinfection@abv.bg

**Увод:** Нанотехнологиите все по-често се използват в различни сфери от живота, включително и в медицината. Чест обект на изследвания като антисептично средство се явява наносребротo, което се влага в продукти като бои, покрития, облекла, обувки и домакински продукти. **Цел:** Целта на настоящото проучване бе да се установи бактерицидното и фунгицидно действие на продукт, съдържащ наносребро както и неговото остатъчно действие върху третираната повърхност. **Материали и методи:** В периода 2020-2021 г. в лаб. "Дезинфекция и стерилизация" към НЦЗПБ се установи незабавния и остатъчен ефект на продукт с наносребро, предназначен за дезинфекция на повърхности. Тестването е проведено, съгласно изискванията на БДС EN 13697:2019 г. по отношение на всички задължителни тест-щамове за бактерицидно и фунгицидно действие и при контактно време 60 минути. Остатъчната ефективност е установена на 10-ти, 20-ти, 30-ти и 40-ти ден след обработка на тест-повърхностите. **Резултати:** Резултатите от изпитването показват, че тествания продукт притежава бактерицидна ($lgR \geq 4$) и дрождецидна ($lgR \geq 3$) активност при време на въздействие 60 минути в условия на ниско органично натоварване. Ефективността се запазва в продължение на 30 дни след първоначалната обработка на повърхностите, но без механично и химично въздействие върху тях или измиване на повърхностите през този период. **Заключение:** Наносребротo в определена концентрация, разходна норма и време на въздействие може да се използва ефективно в дезинфекционната практика. Въпреки това са необходими допълнителни проучвания върху устойчивостта на създаденото покритие, с цел установяване на условията, при които остатъчната ефективност на продукта се запазва във времето.

**Ключови думи:** наносребро, дезинфекция, остатъчна ефективност

## 36. NANOSILVER FOR SURFACE DISINFECTION - IMMEDIATE AND RESIDUAL ACTIVITY

Nikolova M.[1], S. Yordanova[1], E. Alexov[1]

1 – National Centre of Infectious and Parasitic Diseases disinfection@ncipd.org ; disinfection@abv.bg

**Introduction:** Nanotechnologies are increasingly used in various spheres of life, including medicine. The nanosilver - a common object of research as an antiseptic, is used in products such as paints, coatings, clothing, footwear and household products. **Objective:** The aim of the present study was to establish the bactericidal and fungicidal action and the residual action of a product containing nanosilver. **Materials and methods:** In the period 2020-2021 in the lab. "Disinfection and sterilization" at NCIPD was established the immediate and residual activity of a product with nanosilver, intended for disinfection of surfaces. The testing was performed in accordance with the requirements of EN 13697:2015+A1:2019 with all mandatory test strains for bactericidal and fungicidal action and a contact time of 60 minutes. Residual efficacy was established on days 10, 20, 30 and 40 after treatment of test surfaces. **Results:** The test results show that the test product has bactericidal (lgR ≥ 4) and yeasticidal activity (lgR ≥ 3) under low organic load and a contact time of 60 minutes. This efficacy is maintained for 30 days after the initial treatment of the surfaces, but without mechanical, chemical impact or washing the surfaces during the test period. **Conclusion:** Nanosilver in a certain concentration, application rate and contact time can be used effectively in disinfection practice. However, further studies are needed on the durability of the coating created in order to determine the conditions under which the residual effectiveness of the product is maintained over time.

**Key words: nanosilver, disinfection, residual effectiveness**

## 37. РАЗРАБОТВАНЕ И *IN-SILICO* ВАЛИДИРАНЕ НА PCR-БАЗИРАНА СХЕМА ЗА ПЛАЗМИДНО РЕПЛИКОНОВО ТИПИЗИРАНЕ ПРИ *PSEUDOMONAS SPP*.

I. Stoikov[1,2], I. N. Ivanov[1], E. Dobreva[1], S. Sabtcheva[2], K. R. Ivanova[1], R. Hristova[1]

[1] Национална референтна лаборатория за контрол и мониторинг на антимикробната резистентност, НЦЗПБ, София, България [2] Лаборатория по клинична микробиология, Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология (Национален онкологичен център), София, България

**Въведение**. *Pseudomonas aeruginosa* е Грам-отрицателен, опортюнистичен патоген, често асоцииращ се с труднолечими вътреболнични инфекции. Освен вродените детерминанти на резистентност, значение за повишаването на заболеваемостта и смъртността има и способността му за придобиване на допълнителни механизми на резистентност чрез хоризонтален генен трансфер. Контролът върху разпространението на резистентни плазмиди е от първостепенно значение за предотвратяване появата на силно устойчиви фенотипове. Към момента липсват надеждни, високопродуктивни и лесни за изпълнение методи за проследяване на плазмиди при *Pseudomonas*. Целта на настоящото проучване е да бъде разработен PCR-базиран метод за репликоново типизиране, в чийто обхват влизат плазмиди при *Pseudomonas* spp., свързани с разпространението на антибиотична резистентност. **Материали и методи.** Референтни репликонови секвенции от плазмиди при *Pseudomonas* (IncP-1 до IncP-14) бяха изтеглени от NCBI. Беше извършен преглед на литературата с цел подбор и оценка на вече публикувани праймерни двойки за съответните репликони при *Pseudomonas.* Налагането и сравняването на секвенциите, както и дизайна на праймерите беше извършен с помощта на софтуерните продукти Geneious Prime и NCBI Primer-Blast. Геномна ДНК от *Pseudomonas* беше изолирана от 126 клинични изолата чрез модифициран Chelex 100 метод. Извършено беше молекулярно типизиране чрез MLVA9 и MLST. Провеждане на мултиплексните PCR реакции, получените PCR продукти бяха анализирани на капилярна електрофореза с висока разделителна способност QiAxcel (Qiagen). **Резултати.** След прецизна оценка в Мултиплекс PCR1 бяха комбинирани публикувани праймерни двойки за IncP-1 (*trfA*), IncP-7 (*rep*), IncP-9 (*oriV-rep*), IncQ (*oriV*), IncA/C (*repA*), IncN (*repA*), IncW (repA) и IncU. В резултат от задълбочен *in-silico* биоинформатичен анализ върху 50 референтни плазмидни секвенции, включващи IncP- 2 (*repA*), IncP-6 (*repA*), IncP-10 (*repA*), pKLC102-like (*repA*) и pMOS94-like (*repA*) репликони, бяха проектирани праймерни двойки за Мултиплекс PCR2. Анализът на двете реакции би могъл да се извърши на капилярна електрофореза или при симплекс/дуплекс PCR реакции на агарозни гелове. Схемата беше изпитана *in-vitro* върху разнообразна извадка от 90 генотипизирани (по методите MLST и MLVA) изолата, от които 24 потвърдени карбапенемазни продуценти. Детектирани бяха репликони при 3/90 изолата (3%). Идентифицираните репликони принадлежаха към типовете IncP-7 (n=1), IncP-10 (n=1) и pMOS94-like (n=1). **Заключение.** Представеният метод е разработен с цел детекция на по-често докладваните, както и някои новоописани и редки плазмидни семейства при *Pseudomonas* spp.. Наблюдаваната ниска честота на детекция на репликони, предвид разнообразието на извадката, предполага хромозомна локализация на детерминантите на резистентност. За разлика от литераурните данни, в нашата извадка не бяха открити IncP-2 плазмиди, които най-често се асоциират с резистентност. Резултатите от проучването показват, че в сравнение с по-взискателните методи като конюгация, трансформация и новогенерационно секвениране (NGS), методът е добра алтернатива за надежден, високопродуктивен и евтин скрининг на плазмиди при *Pseudomonas* spp..

**Финансиране:** Проучването е извършено с подкрепата на проект (КП-06-Н23/5) финансиран от Фонд научни изследвания

## 37. DEVELOPMENT AND IN-SILICO VALIDATION OF PCR-BASED PLASMID REPLICON TYPING SCHEME FOR PSEUDOMONAS SPP.

I. Stoikov[1,2], I. N. Ivanov[1], E. Dobreva[1], S. Sabtcheva[2], K. R. Ivanova[1], R. Hristova[1]

[1] National Reference Laboratory for Control and Monitoring of Antimicrobial Resistance, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

[2] Laboratory for Clinical Microbiology, University specialized hospital for active treatment in oncology (National oncology centre), Sofia, Bulgaria

**Introduction**. *Pseudomonas aeruginosa* is Gram-negative bacterium usually associated with nosocomial infections which are often difficult to treat. Along with its intrinsic resistance, the ability to acquire additional resistance mechanisms through horizontal gene transfer contributes to increased morbidity and mortality. The dissemination control of resistance plasmids is of utmost importance as it leads to emergence of highly resistant phenotypes. Currently there are no robust and high-throughput methods for tracking *Pseudomonas* plasmids in the environment or hospital settings. The aim of this study was to develop a PCR-based replicon typing (PBRT) scheme targeting plasmids of incompatibility groups known to harbor genes associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp.. **Materials and Methods**. Various plasmid reference datasets of *Pseudomonas* replicons (IncP-1 to IncP-14) were obtained from the NCBI. Review of the literature was performed in order to extract and evaluate previously published primer pairs for relevant *Pseudomonas* plasmid replicons. Geneious Prime and NCBI Primer-Blast software were used for multiple alignments, primer design and evaluation. Genomic DNA from *Pseudomonas* was extracted by modified Chelex 100 method from 126 clinical isolates. Molecular typing was performed by MLVA9 and MLST in order to select diverse test strains. The novel PBRT multiplex PCRs were performed with and products were further analyzed on High resolution capillary electrophoresis QiAxcel (Qiagen). **Results.** After precise primer evaluation the Multiplex PCR1 was established by combining previously published primer sets for IncP-1 (*trfA*), IncP-7 (*rep*), IncP-9 (*oriV-rep*), IncQ (*oriV*), IncA/C (*repA*), IncN (*repA*), IncW (repA) and IncU. Following an in-depth *in-silico* bioinformatics analysis on a total of 50 reference plasmid sequences, original primer pairs for the Multiplex PCR 2 were designed for IncP-2 (*repA*), IncP-6 (*repA*), IncP-10 (*repA*), pKLC102-like (*repA*) and pMOS94-like (*repA*) replicons. Both mPCR assays could be analyzed by capillary electrophoresis or as single- or duplex PCRs in agarose gels. The scheme was tested in-vitro on 90 previously genotyped (MLST and MLVA) diverse MDR *P. aeruginosa* isolates 24 of which were confirmed carbapenemase producers. Replicons were detected in only 3/90 isolates (3 %). Identified replicon types were IncP-7 (n=1), IncP-10 (n=1) and pMOS94-like (n=1).
**Conclusions.** The reported PBRT assay was designed to detect some recently described or rare plasmid families in *Pseudomonas* spp. along with most of the reported replicons. The observed low rate of detected replicons in a diverse isolate set suggests that most resistance determinants seem to be chromosomally located. Noteworthy, IncP-2 plasmids which reportedly are most often associated with resistance were absent from our strain collection. The results of this study will allow robust, high-throughput and cost-effective screening for resistance plasmids in *Pseudomonas* spp. prior to more demanding assays as conjugation, transformation and next-generation sequencing (NGS).
**Financial support:** The study is performed with Grant (KP-06-H23/5) support from the National Science Fund

## 38. ИЗСЛЕДВАНЕ НА НИВАТА НА ДЕКОНТАМИНАЦИЯ ПРИ ЗЪБОТЕХНИЧЕСКИ ОТПЕЧАТЪЦИ – ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ

Й. Калчев[1,2,5], В. Стоева[3], Й. Стоилова[3], В. Кондева[4], М. Мурджева[1,2,5]

[1]Катедра „Микробиология и имунология", Фармацевтичен факултет, Медицински университет – Пловдив, България
[2]Лаборатория по микробиология, УМБАЛ „Св. Георги", Пловдив, България
[3]Катедра „Епидемиология и медицина на бедствените ситуации", Медицински факултет, Медицински университет – Пловдив, България
[4]Катедра „Детска дентална медицина", Факултет по дентална медицина, Медицински университет – Пловдив, България
[5]Научноизследователски институт на МУ-Пловдив

**Цел:** Да се изследват нивата на деконтаминация на снемаеми и неснемаеми зъботехнически отпечатъци в денталните медицински практики, съгласно препоръките в Медицински стандарт за превенция и контрол на инфекциите, свързани с денталното обслужване.
**Материал и методи:** Проведено е проспективно проучване върху 49 зъботехнически отпечатъци. Пробите за микробиологично изследване се вземаха със сух стерилен тампон в транспортна среда при тяхното пристигане в зъботехническата лаборатория и се транспортираха в рамките на деня до лабораторията по микробиология. За микробиологичната диагностика се използваха следните хранителни среди – кръвен агар, еозин-метиленово синьо и *Candida* хром агар. Изследването включваше работа с произволно избрани зъботехнически лаборатории, като се запази анонимността на денталните лекари.
**Резултати:** От изследваните зъбни отпечатъци, 38 бяха неснемаеми (мост/корона) и 11 снемаеми. Положителен резултат от микробиологичното култивиране сред неснемаемите отпечатъци се установи в 47.4% (n=18), а 52.6% (n=20) от тях бяха стерилни. Откриха се Gram отрицателни чревни бактерии в 27.8% (n=5). От изследваните снемаеми отпечатъци, 36.4% (n=4) показаха растеж, докато в останалите 63.6% (n=7) не се установиха бактерии и гъбички. Доказа се *Candida albicans* в 25% (n=1) от всички снемаеми отпечатъци.
**Заключение:** Получените резултати за наличие на бактерии и/или гъбички върху зъбозехническите отпечатъци са индикатор за пълното непознаване и/или неглежиране на правилата за добра дентална медицински практика, което от своя страна създава предпоставка за възникване и разпространение на инфекции, свързани с денталното обслужване. Това явление е по-силно застъпено при неснемаемите отпечатъци.

**Ключови думи: мост, корона, протеза**

Адрес за кореспонденция: д-р Йордан Калчев, дм, Катедра „Микробиология и Имунология", Медицински Университет - Пловдив, бул. "Васил Априлов" 15-А, 4002, Пловдив, България, email: e-mail: yordan.kalchev@mu-plovdiv.bg, тел.: +359 898 43 19 19

## 38. STUDY OF THE LEVELS OF DECONTAMINATION IN DENTAL IMPRESSIONS - A PILOT STUDY

Y. Kalchev[1,2], V. Stoeva[3], Y. Stoilova[3], V. Kondeva[4], M. Murdjeva[1,2,6]

[1]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Plovdiv, Bulgaria
[2]Laboratory of Microbiology, St. George University Hospital, Plovdiv, Bulgaria
[3]Department of Epidemiology and Disaster Medicine, Faculty of Medicine, Medical University – Plovdiv, Bulgaria
[4]Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Medical University – Plovdiv, Bulgaria
[6]Research Institute at Medical University – Plovdiv, Bulgaria

**Aim:** To study the levels of decontamination of removable and fixed dental impressions in dental medical practices, according to the recommendations in the Medical Standard for Prevention and Control of Infections Related to Dental Care.
**Material and methods:** A prospective study was performed on 49 dental impressions. Samples for microbiological examination were taken with a sterile cotton swab in a transport medium immediately upon arrival at the dental laboratory and transported within the day to the laboratory of microbiology. The following nutrient media were used for microbiological diagnosis – blood agar, eosin-methylene blue, and *Candida* chromogenic medium. The study involved working with randomly selected dental laboratories while maintaining the anonymity of dentists.
**Results:** Of the examined dental impressions, 38 were fixed (bridge/crown) and 11 were removable. A positive result from the microbiological culture among fixed impressions was found in 47.4% (n = 18), and 52.6% (n = 20) of them were sterile. Gram-negative enteric bacteria were detected in 27.8% (n = 5). Of the examined removable dental impressions, 36.4% (n = 4) showed growth, while in the remaining 63.6% (n = 7) no bacteria or fungi were found. *Candida albicans* was detected in 25% (n = 1) of all removable impressions.
**Conclusion:** The results demonstrating the presence of bacteria and/or fungi on dental impressions are indicative for a complete ignorance and/or neglect of the rules of the good dental practice, which in turn creates a prerequisite for the emergence and spread of infections associated with dental care. This phenomenon is more common in fixed impressions.

**Keywords:** bridge, crown, dental prosthesis

**Correspondence address:**
Yordan Kalchev, M.D., Ph.D., Dept. of Microbiology and Immunology
Medical University - Plovdiv, 15-A Vasil Aprilov Blvd., 4002, Plovdiv, Bulgaria
e-mail: yordan.kalchev@mu-plovdiv.bg, phone: +359 898 43 19 19

## 39. ПРИЛОЖЕНИЕ НА NESTED-PCR ЗА ДОКАЗВАНЕТО НА ДЕРМАТОФИТИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОНИХОМИКОЗА

Райкова В[1], Байкушев Р[1]
[1]Медицински Университет-София, Катедра по Медицинска микробиология

Дължина (с интервалите): 1962

Онихомикозата често се причинява от дерматофити, въпреки че *Candida spp*. и недермофитни плесени също са въвлечени в етиопатогенезата. Рутинно тя се диагностицира чрез микроскопиране с KOH и изолиране на култури в селективни хранителни среди. Цел на настоящето проучване е оценката на nested-PCR, насочен към доказване CHS1 гена в родовете Trichophyton, Epidermophyton и Microsporum, спрямо споменатите методи при пациенти с клинично подозирана онихомикоза. Материали и методи: Бяха изследвани 23 пациенти. Материалът от нокти бе разделен на три порции. Първата беше изследвана микроскопски. Втората бе култивирана върху Sabouraud агар при 25°C в продължение на 6 седмици, а клиничните изолати бяха идентифицирани въз основа на фенотипни характеристики на колониите, микроскопско изследване и тестове за ферментация и асимилация на въглехидрати. От третата порция бе извлечено ДНК чрез QIAamp DNA Mini кит и провеждане на nested-PCR с краен продукт от 288 bp. Резултати: От 23 пациенти с клинично подозирана онихомикоза 60,9% са положителни за гъбични елементи, доказани чрез микроскопиране. Дерматофити бяха открити в 73,9% от случаите при използван nested-PCR и в 43,5% при култивиране. Сред изолираните дерматофити най-често срещаният изолат бе *Trichophyton rubrum*, следван от *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* и *T. violaceum*. Статистически анализ установи, че специфичността и чувствителността на nested-PCR е значително по-висока от тази на микроскопирането (P <0,01) и изолирането на култура (P <0,001). Заключения: Nested-PCR е удобен и специфичен диагностичен инструмент за откриване на гъбни агенти при пациенти с подозирана онихомикоза. Високото ниво на доказуемост на дерматофитите спрямо микроскопирането и култивирането му дават предимство и го поставят като метод на първи избор за диагностика на онихомикоза. Неговото приложение би осигурило бърза идентификация на причинителите на онихомикоза и вземането на решение за подходяща етиологична терапия.

Ключови думи: PCR, онихомикоза, дерматофити

## 39. THE USE OF NESTED-PCR FOR THE DETECTION OF DERMATOPHYTES IN PATIENTS WITH ONYCHOMYCOSIS

Raykova V[1], Baykushev R[1]
[1]Medical University of Sofia, Department of Medical microbiology

Characters (with spaces): 1955

Abstract

Aim: Onychomycosis is most commonly caused by dermatophytes, although Candida spp. and nondermophytic molds have also been implicated. Onychomycosis is routinely diagnosed by KOH microscopy and culture isolation. The aim of this study was to evaluate nested PCR targeting the CHS1 gene shared by Trichophyton, Epidermophyton and Microsporum genera, in patients with clinically suspected onychomycosis.
Materials and methods: A total of 23 patients were tested. The specimens were divided into three portions. The first was examined microscopically (20% KOH with 40% dimethyl sulfoxide). The second was cultured on Sabouraud's dextrose agar incubated at 25°C for 6 weeks. Clinical isolates were identified on the basis of phenotypic characteristics of the colonies, microscopic examination, and carbohydrate fermentation and assimilation tests. DNA extraction was performed on the third portion of nail scrapings with QIAamp DNA Mini kit. Two-round nested PCR was conducted with a final amplified DNA product of 288 bp.
Results: Of the 23 patients with clinically suspected cases of onychomycosis, 60.9% were positive for fungal elements by KOH microscopy. Dermatophytes were detected in 73.9% of the cases by nested PCR and isolated in 43.5% of the cases by culture. Among the dermatophytes isolated, Trichophyton rubrum was the most common isolate, followed by T. mentagrophytes, Trichophyton tonsurans, and Trichophyton violaceum. By statistical analysis, nested-PCR positivity was found to be significantly higher than that of KOH microscopy ($P < 0.01$) and culture isolation ($P < 0.001$).
Conlusions: The results show that PCR is highly advantageous as a diagnostic tool for detection of fungi on direct application to nail scrapings. It is reasonable to use it as a first line method for the diagnosis of onychomycosis. This will provide a rapid identification of the implicated fungi and will help clinicians in making appropriate therapeutic decisions.

Key words: PCR, onychomycosis, dermatophytes

## 40. ОТРИЦАТЕЛНИ РЕЗУЛТАТИ ПРИ АНАЛИЗ НА ТЪКАННИ ПРОБИ ВКЛЮЧЕНИ В ПАРАФИН ЗА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* И *CUTIBACTERIUM ACNES*

Борислава Цафарова[1], Силвия Иванова[2], Николай Янев[2], Димитър Костадинов[2], Йордан Ходжев[1], Владимир Толчков[1], Ваня Юруков[2], Стефан Панайотов[1]

1. Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. Университетска многопрофилна болница за активно лечение по белодробни болести „Света София“ ЕАД, София

**Въведение:** Изолирането на ДНК от тъканни проби фиксирани във формалин и включени в парафинови блокчета е прилаган подход за доказване на инфекциозна етиология чрез молекулярни методи. Често резултатите могат да бъдат фалшиво отрицателни. Известно е, че при продължително третиране на тъканните проби с формалин, човешката и микробна ДНК хидролизират и това компрометира крайния резултат. Продължителното съхраняване на стайна температура на хистологичните препарати също може да окаже влияние върху диагностичните резултати.
**Цел:** Цел на нашето проучване бе да изследваме тъканни проби фиксирани във формалин и включени в парафинови блокчета за *Mycobacterium tuberculosis* и *Cutibacterium acnes.*
**Материали:** Бяха изследвани 20 биопсични материала от фибробронхоскопия с трансбронхиална белодробна биопсия на пациенти със саркоидоза и 20 тъканни проби на оперирани пациенти с белодробна туберкулоза. Всички материали бяха няколко годишни и съхранявани на стайна температура. Депарафинирането и изолирането на ДНК бе извършено с помощта на два метода: **i.** адаптирана от нас метод за депарафиниране и изолиране на ДНК и **ii.** фирмен кит QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kit (Qiagen, Germany). Изолираната ДНК бе изследвана чрез конвенционален PCR за *Mycobacterium tuberculosis* и *Cutibacterium acnes.*
**Резултати:** Изолираната ДНК бе с много добра чистота и количество. Двата метода дадоха съпоставими резултати за чистота и количество на изолирана ДНК. Всички проведени PCR анализи бяха отрицателни с изключение на резултатите от положителните контроли.
**Заключение:** Получените отрицателни резултати вероятно се дължат на два фактора: продължително фиксиране на тъканните проби във формалин и съхранение за дълъг период от време (няколко години) на стайна температура на хистологичните препарати.
**Благодарности:** Изследването е финансирано от Национална научна програма „ВИХРЕН” и договор с Фонд „Научни изследвания” КП-06-ДВ/10 от 21.12.2019, ‘SARCOIDOSIS’

## 40. NEGATIVE RESULTS FROM ANALYSIS OF TISSUE SAMPLES INCLUDED IN PARAFFIN FOR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND *CUTIBACTERIUM ACNES*

Borislava Tsafarova[1], Silvia Ivanova[2], Nikolay Yanew[2], Dimitar Kostadinov[2], Yordan Hodzhev[1], Vladimir Tolchkov[1], Vania Youroukova[2], Stefan Panaiotov[1]

1. National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria
2. University General Hospital for Active Treatment of Lung Diseases "St. Sofia", Sofia

**Introduction:** Isolation of DNA from tissue samples fixed in formalin and embedded in paraffin blocks is an approach used to prove infectious etiology by molecular methods. Often the results can be false negative. It is known that tissue samples when treated with formalin, the human and microbial DNA hydrolyze and this may compromise the final result. Prolonged storage of histological specimens at room temperature may also affect diagnostic results.
**The aim** of our study was to test tissue samples fixed in formalin and included in paraffin blocks for *Mycobacterium tuberculosis* and *Cutibacterium acnes* by PCR.
**Materials:** 20 biopsy materials from fibrobronchoscopy with transbronchial lung biopsy of patients with sarcoidosis and 20 tissue samples of operated patients with pulmonary tuberculosis were examined. All materials were several years old and stored at room temperature. Deparaffination and isolation of DNA was performed using two methods: i. adapted in-house method for deparaffination and isolation of DNA and ii. QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kit (Qiagen, Germany). Isolated DNA was examined by conventional PCR for *Mycobacterium tuberculosis* and *Cutibacterium acnes.*
**Results:** The isolated DNA was of very good purity and quantity. The two methods gave comparable results for the purity and amount of DNA isolated. All PCR analyzes performed were negative except for the results of the positive controls.
**Conclusions:** The negative results obtained are probably due to two factors: long-term fixation of the tissue samples in formalin and storage for a long period of time (several years) at room temperature of the histological specimens.
**Acknowledgements:** This research was funded by the Bulgarian National Science Fund within National Science Program VIHREN, contract number KP-06-DV/10-21.12.2019.

## 41. ФИЗИОЛОГИЧНО ОСНОВАН ФАРМАКОКИНЕТИЧЕН ЦИФРОВ МОДЕЛ ЗА ОЦЕНКА НА МИНИМАЛНАТА ЕФЕКТИВНА ДОЗА НА ПРИЛОЖЕНИЕ НА ТРИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛОЗНИ МЕДИКАМЕНТА ОТ ПЪРВА ЛИНИЯ - ИЗОНИАЗИД, РИФАМПИЦИН, ПИРАЗИНАМИД

Йордан Ходжев, Бориславa Цафарова, Владимир Толчков, Стефан Панайотов

Национален център по заразни и паразитни болести, София

Туберкулозата е заболяване, което силно влошава качеството на живот и често води до летален изход за значителна част от световното население. Въпреки че нейният произход е установен преди век и половина и оттогава са известни значителен брой подходи за лечение, туберкулозата си остава труден обект за борба. Една от постоянните трудности за справяне с туберкулозата е неправилното определяне на индивидуалната доза за лечение или внезапно прекъсване на курса на лечение, което води до възникване на резистентни и мултирезистентни щамове при *Mycobacterium tuberculosis*.

Целта на настоящото изследване е да приложи установен математически модел, известен като физиологично основан фармакокинетичен модел за цифрово симулиране на самостоятелно и комбинирано приложение на на най-често използваните противотуберкулозни медикаменти - Изониазид, Рифампицин и Пиразинамид. За целта е създаден цифров модел за симулации чрез модулът SimBiology на средата за програмиране Matlab 9.0. Той е валидиран при работа с известни опитни данни от предходни клинични и *in vitro* изследвания, както и резултати от други математически модели. Получените симулационни данни описват възможно най-реалистично фармакокинетиката на изследваните лекарствени средства. Разгледани са набор от лекарствени комбинации, като се взема предвид поддържането на оптимална концентрация на лекарствените средства в кръвната плазма. Симулирани са голям брой виртуални пациенти в разнообразни възрастови диапазони (18-70 години), разпределени по пол и особености на тялото и интензитет на метаболизма. При симулацията е получен изходен набор от данни, който включва оптималните дозови интервали с подходящите времена за прилагане при пациенти с различни групови особености.

В заключение, представеният физиологично основан модел на фармакокинетика е подходящ инструмент за изследване на оптималното дозиране на противотуберкулозни средства. Този модел и инструмент може да разкрие пълния набор от възможни схеми на приложение. Като резултат, специалистите могат да подберат най-ефективните схеми, които да се използват при клинични изпитвания и клиничната практика.

**Благодарности:** Изследването се финансира от Фонд „Научни изследвания“ на МОН с договор ДН13/4 15.12.2017.

Ключови думи: физиологично основан фармакокинетичен модел, туберкулоза, симулиран пациент

## 41. PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC *IN SILICO* MODEL FOR EVALUATION OF THE DOSE ADMINISTRATION OF THREE FIRST LINE ANTI-TUBERCULOSIS AGENTS - ISONIAZID, RIFAMPICIN, PYRAZINAMIDE

Yordan Hodzhev, Borislava Tsafarova, Vladimir Tolchkov, Stefan Panaiotov

National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

Tuberculosis is a disease that hampers quality of life and leads to death of a significant portion of the world population. Although its origin is well known for nearly a century and a half and a number of treatment schemes have been applied since then, tuberculosis is still difficult to battle. Incorrect dosing or interruptions during the course of drug administration often lead to generation of resistant and multiresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The aim of present study is to apply well known mathematical model known as physiologically based pharmacokinetic (PBPK) to simulate digitally variety of single and combinatory administration of most common first line anti-tuberculosis agents such as Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamide.
We used a well established PBPK model built in the SimBiology module of Matlab, which was validated against available empirical data from previous clinical, *in vitro* and model studies. Thus we obtained a realistic description of pharmacokinetic and drug distribution. A set of drug combinations and doses were tested having in mind maintenance of optimal drug concentration in the plasma. Large number of virtual patients of different age (18-70 years), gender, body and metabolism characteristics were simulated.
The simulation generated an output data set with optimal dose interval with appropriate time period of administration for virtual patients with different group characteristics.
In conclusion, we were able to demonstrate that PBPK is a viable tool for modeling optimal administration of anti-tuberculosis drugs, which can reveal the full spectrum of possible administration patterns from which the best possible treatment for clinical trials and in the clinical practice.
Acknowledgements: This project has received funding from the Bulgarian National Science Fund (BNSF) grant No ДН13/4 15.12.2017.

Key words: physiologically based pharmacokinetic model (PBPK), tuberculosis, simulated patient

## 42.СЪВРЕМЕННА ЛАБОРАТОРНА ДИАГНОСТИКА НА ХЕРПЕС СИМПЛЕКС ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С РАЗЛИЧНИ НЕВРОЛОГИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ

Снежана Дикова, Драгана Ангелов, Петя Генова-Калу

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

**Въведение:** Човешките херпесни вируси (HHV) причиняват сериозни заболявания на нервната система. Като се има предвид, че тези инфекции се проявяват клинично с разнообразни и често неспецифични симптоми, а от друга страна съществува ефективна етиотропна терапия, съвременната етиологична диагностика в тези случаи е от съществено значение. В настоящия момент златен стандарт за доказване на етиологичната роля на ЧХВ е анализа на ликвор от пациентите с неврологични заболявания с помощта на молекулярно-генетичните методи (конвенционален PCR, RealTime PCR (RT-PCR)). Тези методи позволяват бърза идентификация на етиологичния агент; определяне на вирусния товар (брой копия на ДНК) в ликвора с цел мониториране тежестта, продължителността и изхода на заболяването, както и ефикасността на антивирусната терапия. Тук ние обобщаваме резултатите си от 18 месечно проучване (януари 2020 г. – юни 2021 г.) като отчитаме необходимостта от интензифициране на изследванията в това направление.
**Материали и методи:** Ликвори от 222 пациенти на възраст между 7 месеца и 90 год. от хоспитализирани пациенти в различни клиники на страната с енцефалити, менингити, менингоенцефалити, енцефаломиелити и други неврологични заболявания са изследвани с конвенционален PCR и RT-PCR за няколко или всички от следните HHV: HSV-1, HSV-2, CMV и EBV. Доказването на различните видове HHV е осъществено с търговски китове за RT-PCR и in house едностъпкови конвенционални PCR системи.
**Резултати:** По-голяма част от изследваните ликвори (49,5%) са от пациенти с енцефалити, енцефаломиелити, менингити и менингоенцефалити. В 13 % от ликворите са открити един или няколко херпесни вируси. Херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1) е установен в 4, а HSV-2 в 5 от изследваните за тези вируси ликвори. Само 1 от ликворите е положителен за CMV, а за EBV 2. При деца до 12 години херпесни вируси не са открити.
**Заключение:** В резултат на натрупания опит в НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси" към НЦЗПБ е разработена диагностична схема, включваща комплекс от методи за подобряване на ранната лабораторна диагностика на HHV в ликвори, позволяваща предприемането на адекватна етиотропна терапия, водеща до благоприятен изход за пациентите.

**Ключови думи:** човешките херпесни вируси (HHV), ликвор, конвенционален PCR и RT-PCR

## 42.CONTEMPORARY LABORATORY DIAGNOSIS OF HERPES SIMPLEX VIRAL INFECTIONS IN PATIENTS WITH VARIOUS NEUROLOGICAL COMPLICATIONS

Snezhana Dikova, Dragana Angelov, Petya Genova-Kalou
NRL "Cell cultures, rickettsia and oncogenic viruses", Department of Virology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)

**Introduction:** Human herpes viruses (HHV) cause serious diseases of the nervous system. Given that these infections are clinically manifested with a variety of often non-specific symptoms and on the other hand there is an effective etiotropic therapy, modern etiological diagnosis in these cases is essential. At present, the gold standard for proving the etiological role of HHV is the analysis of cerebrospinal fluid from patients with neurological diseases using molecular genetic methods (conventional PCR, RealTime PCR (RT-PCR)). These methods allow rapid identification of the etiological agent; determination of the viral load (number of copies of DNA) in the cerebrospinal fluid in order to monitor the severity, duration and outcome of the disease, as well as the effectiveness of antiviral therapy. Here we summarize our results from an 18-month study (January 2020 - June 2021), taking into account the need to intensify research in this area.

**Materials and methods**: Cerebrospinal fluid from 222 patients aged between 7 months and 90 years from hospitalized patients in different clinics of the country with encephalitis, meningitis, meningoencephalitis, encephalomyelitis and other neurological diseases were examined by conventional PCR and RT-PCR for several or all to detect HHV: HSV-1, HSV-2, CMV and EBV. Demonstration of different types of HHV has been performed with commercial kits for RT-PCR and in-house single-stage conventional PCR systems.

**Results**: Most of the studied cerebrospinal fluid (49.5%) were from patients with encephalitis, encephalomyelitis, meningitis and meningoencephalitis. One or more herpes viruses are found in 13% of the cerebrospinal fluid. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) was detected in 4 and HSV-2 in 5 of the cerebrospinal fluid tested for these viruses. Only 1 of the cerebrospinal fluid is positive for CMV and for EBV 2. Herpes viruses have not been detected in children under 12 years of age.

**Conclusion**: As a result of the experience gained in NRL "Cell cultures, rickettsia and oncogenic viruses" at NCIPD a diagnostic scheme has been developed, including a set of methods for improving the early laboratory diagnosis of HHV in cerebrospinal fluid, allowing adequate etiotropic therapy leading to favorable patient outlet.

**Keywords:** human herpesvirus (HHV), cerebrospinal fluid, conventional PCR and RT-PCR