

СБОРНИК НАУЧНИ ТРУДОВЕ

16 НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС
ПО КЛИНИЧНА МИКРОБИОЛОГИЯ И ИНФЕКЦИИ
НА БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ НА
МИКРОБИОЛОЗИТЕ



София, 10–12 май 2018 г.
Парк-хотел „Москва“

СЪДЪРЖАНИЕ

СЕСИЯ I	
Отчети на НРЦ.....	5
СЕСИЯ II	
Микробна лекарствена резистентност.....	13
СЕСИЯ III	
Инфекции на респираторния тракт.....	19
СЕСИЯ IV	
Сексуално-предавани инфекции.....	23
СЕСИЯ V	
Ваксина-предотвратими инфекции.....	27
СЕСИЯ VI	
Инфекции, причинявани от храни и води.....	31
СЕСИЯ VII	
Векторно-предавани инфекции. Инфекции в хирургията и педиатрията. Инфекции, свързани с медицинското обслужване и при имунодефицитни състояния.....	34
СЕСИЯ VIII	
Зооантропонози с епидемичен риск.....	38
ПОСТЕРИ	41

Отчети на НРЦ

НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР
„РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ И ТУБЕРКУЛОЗА” –
АНАЛИЗ НА ДЕЙНОСТТА ПРЕЗ 2017

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

Цел: Анализ на 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 2017/18 г. за грипни вируси тип А и В бяха тествани 1230 назофарингеални секрета на пациенти с грипозни заболявания/ОРЗ. Респираторни проби на 360 деца на възраст <5 год. бяха изследвани и спрямо 8 други респираторни вируси. През 2017 г. бяха извършени микроскопски и културелни изследвания за туберкулоза на 274 пациента и потвърдителни изследвания на 482 щамове, изпратени от цялата страна. Осъществена бе видова идентификация на нетуберкулозните микобактерии. Чрез сполитипиране и 24-локусен MIRU-VNTR анализ бе извършено генотипиране на повече от 150 чувствителни и 40 мултирезистентни туберкулозни щамове събрани от цялата страна. На 37 щамове с генотип SIT41 бе направено цялостно геномно секвениране. Квантиферонов тест бе проведен при 51 лица със съмнение за туберкулозна инфекция. За коклюш бяха изследвани чрез PCR 408 пациента. За легионерска болест бяха изследвани 25 пациенти.

Резултати: Грипен сезон 2017/18 г. се характеризираше с доминиращо разпространение на грипни вируси В/Yamagata и слаба циркулация на вирусите А(H1N1)pdm09 и А(H3N2), доказани в 345 (28%), 65 (5,3%) и 11 (0,9%) проби, съответно. Сред негрипните вируси РСВ бе най-често докладван – 42 (11%). *M. tuberculosis* бе идентифициран в 18 (6,6%) от изследваните пациенти; 402 щамове бяха потвърдени като *M. tuberculosis* complex, а 80 щамове бяха идентифицирани като NTM. Общо 28 туберкулозни щамове бяха определени като MDR, от които 1 щам – като XDR. Генетичският анализ показва, че генотипове SIT41 и SIT53 съставляват 75% от мултирезистентните щамове. Значителна част (50%) от изониазид резистентните щамове са с генотип SIT41. При квантифероновото тестване в 7 (23%) от изследваните пациенти бе потвърдена инфекция с МТБ. Положителни резултати за коклюш бяха получени при 26% от изследваните пациенти. Легионерска болест бе установена при 2 пациента.

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

Ключови думи: грип, РСВ, туберкулоза, коклюш, легионерска болест

NATIONAL REFERENCE CENTER “RESPIRATORY
INFECTIONS AND TUBERCULOSIS” –
ANALYSIS OF ACTIVITY IN 2017

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

Aim: analysis of the results of epidemiological and laboratory surveillance of respiratory tract infections with viral and bacterial aetiology in Bulgaria.

Materials and methods: Epidemiological analysis of the influenza/ARI incidence was done on the basis of data from internet-based information systems. During the 2017/18 season, a total of 1230 nasopharyngeal swabs of patients with influenza-like illness/ARI were tested for influenza type A/B viruses. Respiratory specimens of 360 children aged <5 years were also examined for 8 other respiratory viruses. In 2017, microscopic and culture examination for tuberculosis of 274 patients and confirmation tests of 482 TB strains were performed. Species identification of non-tuberculous mycobacteria strains was done. More than 150 drug sensitive and 40 MDR *M. tuberculosis* strains collected from all over the country were genotyped by applying spoligotyping and 24 loci MIRU-VNTR analysis. On 37 strains of SIT41 (TUR) spoligotype we performed whole genome sequencing. Quantiferon testing (QFT) of 51 persons with suspect tuberculosis was conducted. A total of 408 patients were tested for *B. pertussis* using PCR. In 2017, 25 patients were examined for legionella infection.

Results: Influenza 2017/18 season was characterized by dominant spread of influenza B/Yamagata viruses and low circulation of A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses detected in 345 (28%), 65 (5,3%) and 11 (0,9%) specimens, respectively. RSV was found in 42 (11%) children. *M. tuberculosis* was identified in 18 (6,6%) of the patients examined, 402 strains were confirmed as *M. tuberculosis* complex, 80 strains were identified as NTM. A total of 28 TB strains were characterized as MDR-TB (out of them 1 was XDR). In the QFT, MTB infection was proved in 7 (23%) persons. 26% of examined patients were positive for *B. pertussis*. Confirmed Legionnaires disease was found in two patients.

Conclusions: NRC “Respiratory infections and tuberculosis” integrated efforts of various experts in order to more complete and comprehensive study of respiratory infections and tuberculosis in Bulgaria.

Keywords: influenza, respiratory-syncytial virus, tuberculosis, pertussis, Legionnaires disease

**НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР
ПО ИНФЕКЦИИ, ПРЕДАВАНИ С ХРАНИ
И ВОДИ (НРЦ-ИПХВ), АНАЛИЗ
НА ЗАБОЛЯЕМОСТТА, 2017 Г.**

*Л. Николаева-Гломб, А. Курчатова, И. Райнова,
Н. Цветкова, Г. Николов, А. Стоянова, В. Йончева,
М. Карагеоргиев, М. Павлова, 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 2017 г.

Материали/методи. Използван е годишният анализ на отдел "Епидемиология" и данните на НРЛ "Чревни инфекции", НРЛ "Ентеровируси и НРЛ "Диагностика на паразитозите". Анализът е по нозологични единици съгласно изискванията на Наредба № 21/18.07.2005 г. на МЗ.

Резултати. През 2017 г. чревните инфекции заемат 36,43% от регистрираните случаи на остри заразни болести в страната. Водеща остава групата на острите ентероколити и гастроентерити (76,75% от всички инфекциозни чревни заболявания). През 2017 г. са регистрирани 26 смъртни случая, които са с 10 повече в сравнение с 2016 г. (27,96% от всички починали от заразни болести). Това определя общ леталитет за чревните инфекции от 0,14%. Заболяемостта е както следва: ботулизъм – няма регистрирани заболявания, гастроентерит/ентероколит: 206,28‰ (234,65‰ през 2016 г.), шигелоза 4,34‰ (4,07‰ през 2016 г.), йерсиниоза 0,24‰ (0,14‰ през 2016 г.), кампилобактериоза 2,76‰ (2,82‰ през 2016 г.), колиентерити (ешерихиози) 3,38‰ (5,03‰ през 2016 г.), салмонелоза 11,21‰ (10,04‰ през 2016 г.). Заболяемостта от ротавирусна инфекция е с тенденция за повишение (40,52‰ в сравнение с 30,64‰ през 2016 г.). През 2017 г. няма регистрирани заболявания от инфекции, предизвикани от *E. Coli*, продуциращи *Shiga/Vero* токсини. Регистрирани са 2 заболявания от коремно-тиф съответно в областите София град и Кюстендил. Екстензивността на жиаурдиазата е 0,26% (0,25% през 2016 г.) от общия брой изследвани лица за чревни паразити. За криптоспоридиоза са изследвани 276 лица и са установени 14 положителни, от които 7 лица са с ХИВ-инфекция. За норовируси са изследвани 80 клинични проби, от които 6 са положителни (7,5%).

Заклучение. В сравнение с 2016 г. заболяемостта от салмонелоза, шигелози, йерсиниоза и ротавирусна инфекция е повишена, а от гастроентерит/ентероколит, колиентерити (ешерихиози) и кампилобактериоза е понижена. Все още в страната не се търси достатъчно диагностика на норовирусната инфекция.

Ключови думи: инфекции предавани с храна и вода, анализ, заболяемост.

**NATIONAL REFERENCE CENTER
FOR FOOD- AND WATERBORNE DISEASES
(NRC FWD), MORBIDITY ANALYSIS, 2017**

*L. Nikolaeva-Glomb, A. Kurchatova, I. Rainova,
N. Tsvetkova, G. Nikolov, A. Stoianova, V. Iontcheva,
M. Karageorgiev, M. Pavlova, 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 2017.

Materials and methods. The annual report of the Department Epidemiology and the data obtained from the NRL of Enteric Pathogens, NRL of Enteroviruses and NRL for Diagnosis of Parasitic Diseases were used to perform the analysis. Analysis includes the infections according to Ordinance № 21/18.07.2005 of the Ministry of Health.

Results. In 2017, enteric infections comprised 36,43% of the totally registered acute infectious diseases in this country. Acute enterocolitides and gastroenteritides remain the leading enteral infections (76,75%). In 2017, a total of 26 deaths were registered, that is 10 more cases as compared to 2016 (27,96% of all deaths of infectious diseases or 0,14% case fatality rate). Incidence rate of enteric infections is as follows: no botulism, gastroenteritis/enterocolitis 206,28‰ (234,65‰ in 2016), shigellosis 4,34‰ (4,07‰ in 2016), yersiniosis 0,24‰ (0,14‰ in 2016), campylobacteriosis 2,76‰ (2,82‰ in 2016), colienteritis (escherichiosis) 3,38‰ (5,03‰ in 2016), salmonellosis 11,21‰ (10,04‰ in 2016). Incidence rate of rotaviral gastroenteritis shows an increasing trend – 40,52‰ (30,64‰ in 2016). Infections caused by *Shiga/Vero* toxin producing *E. coli* were not registered in 2017. Two cases of typhoid fever were registered, one in Sofia, and one in Kyustendil. Extensive invasion of giardiasis was 0,26% (0,3% in 2016) from all persons investigated for enteric parasites. A total of 276 persons in the country were investigated for cryptosporidiosis and 14 positive (7 persons were HIV-infected) were registered. 80 samples were screened for noroviruses and 6 of them were positive (7.5%).

Conclusion. The incidence rate of salmonellosis, shigellosis, yersiniosis and rotaviral gastroenteritis is increased as compared to 2016 and the incidence rate of gastroenteritis/enterocolitis, colienteritis (escherichiosis) and campylobacteriosis is decreased. There are still minor diagnostic activities for norovirus infections in this country.

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

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

*И. Н. Иванов¹, М. Недялков¹, Б. Тодорова¹⁺²,
Е. Добрева¹, Р. Христова¹, И. Филипова¹, З. Иванова¹,
Н. Корсун¹, И. Алексиев¹, С. Ангелова¹, Т. Тенев¹,
Р. Харизанов¹, И. Кафтанджиев¹, Н. Владимирова¹,
С. Събчева², Х. Даскалов³, Т. Кантарджиев¹*

1. Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, гр. София
2. Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология, гр. София
3. Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт, гр. София

Националният референтен център по микробна лекарствена резистентност и антибиотична консумация интегрира задълбочени проучванията 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 2017 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 бъдещата ни рутинна дейност.

В тази връзка и с цел синхронизиране на работата на микробиологичните лаборатории с Европейските изисквания, ще се отдели време да се разяснят начините на електронно отчитане на предстоящия първи цикъл на външния контрол на качеството. Ще обсъдим повтарящите се грешки на участниците в интерпретацията на врогената резистентност, неприложимостта на даден антибиотик за лечение на конкретен причинител и какво се докладва, когато няма достатъчно данни за антибиотика по EUCAST. Ще се обсъдят повтарящите се и чести проблеми при електронното отчитане на контрола и докладването по BulSTAR.

Ще бъдат докладвани национални данни за нивата на антиретровирусна резистентност при HIV, резистентността към противогрипни, противо-хепатитни и антипаразитни препарати, както антимикотичната резистентност.

Ключови думи: BulSTAR, микробна резистентност, EUCAST

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

*I. N Ivanov¹, M. Nedyalkov¹, B. Todorova¹⁺²,
E. Dobрева¹, R. Hristova¹, I. Philipova¹, Z. Ivanova¹,
N. Korsun¹, S. Angelova¹, I. Alexiev¹, T. Tenev¹,
R. Harizanov¹, I. Kaftandjiev¹, N. Vladimirova¹,
S. Sabtcheva², H. Daskalov³, T. Kantardjiev¹*

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 Consumption integrates in-depth studies from specialists in the field of drug resistance in bacterial, fungal, viral and parasitic agents involved in infections in the community and hospitals as well as antimicrobial resistance in the agriculture and food industry. The National surveillance system of etiological structure of infections, bacterial resistance and antibiotic consumption in Bulgaria – BulSTAR presents with the latest trends summarized up to 2017 and after analysis of annual reports of more than 150 microbiology laboratories. Collected data address the issues related to the registered unusual phenotypes in specific microorganisms and antibiotic susceptibilities with aspect to correct interpretation. The means to avoid misinterpretation in our future routine work will be discussed.

In this context and in order to synchronize the work of microbiological laboratories with European requirements, guidelines for the electronic reporting with respect to the upcoming first round of External control of the Quality Management System will be discussed. We will elaborate on the repetitive mistakes in the interpretation of intrinsic resistance, inapplicability of a given antibiotic to treat specific infections and what to report when there is insufficient data for an antibiotic in EUCAST. The frequent problems associated with the electronic reporting in BulSTAR will be presented and discussed. National data on the rates of antiretroviral resistance in HIV, anti-influenza and anti-hepatitis drug resistance, as well as antifungal and antiparasitic resistance will be reported.

Keywords: BulSTAR, microbial resistance, EUCAST.

**НАЦИОНАЛЕН РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗООАНТРОПОНОЗИ С ЕПИДЕМИЧЕН РИСК,
НОВИ ИНФЕКЦИИ И УПРАВЛЕНИЕ
НА БИОРИСКА -2017(НРЦ ЗЕРНИ-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, С. Ангелова,
И. Кафтанджиев, Е. Кънева, А. Младжова, 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 тежки последици за общественото здравеопазване. Причинителите на някои зооантропонози са микроорганизми от рисковни групи 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.

През 2017 г. НРЦ ЗЕРНИ-УБ поддържа готовност за съвременна и компетентна реакция при необходимост от детекция на потенциални биотерористични агенти. Културелно бе потвърден 1 случай на кожен антракс при животновъд от с. Трапище, Разградска област. Молекулярното типирание на изолатът *Bacillus anthracis* показва генотип сходен с този на щамове от Шуменска област. Бяха диагностицирани 3 нови, епидемиологично свързани случая на бруцелоза при животновъди от Сливенска област. При скринингови серологични изследвания на таргетни групи в районите на миналите два автохтонни взрива от бруцелоза не са открити серопозитивни лица. Това говори за успешното овладяване на инфекцията в тези огнища. През 2017г няма диагностицирани случаи на туларемия. За годината бяха диагностицирани 2 случая на ККХТ и 7- на ХТБС. Намерени бяха лабораторни данни за 1 случай на Западно-Нилска треска, лептоспироза- 8 пациента; листериоза – 7 случая. Няма доказани инфекции при хора причинени от Марбург, Ебола, Ласа, MERS-CoV и птичи грипни вируси. През 2017 г. са диагностицирани 32 пациента с остра Ку-треска в различни региони на страната. Регистрирани са два взрива от заболяването в Благоевградска и Габровска области с 11 и 7 случая, съответно. Проследени са и 4 пациента с хронична форма на инфекцията с развитие на ендокардит. За годината са диагностицирани 103 пациента с трихинелоза. Регистрирани с 6 взрива на заболяването в областите Бургас (2); Ст. Загора; Ст. Загора и Пловдив, Хасково и Шумен. При 4 от взривовете източник е домашна свиня, а при 2 – диво прасе. Регистрирани са 218 случая на ехинококоза от които 196 първични, 22 с рецидив и 1 смъртен случай в Кърджали. Двадесет и една проби от мигранти бяха отрицателни за ехинококоза.

Специалисти на НРЦ ЗЕРНИ-УБ са участвали активно в разработването на научни тематички, методични указания за мрежата, наредби на МЗ, експертни съвети. Активно е и сътрудничеството към съответните мрежи на ECDC и WHO. НРЦ в състава на НРЦ ЗЕРНИ-УБ, успешно участва в международни схеми за оценка качеството на диагностика на зоонозни инфекции при хора, организирани от проект EMERGE, INSTAND, WHO. Във връзка с повишаване квалификацията на медицинските специалисти са проведени курсове по всички специалности в инфектологията. Разнообразната дейност на НРЦ ЗЕРНИ-УБ през изтеклата година бе популяризирана чрез редица публикации и участия в конгреси.

Ключови думи: зооантропонози, нови инфекции, управление на биориска

**NATIONAL REFERENT CENTER
OF ZOONOSES WITH EPIDEMIC RISK,
NEW INFECTIONS AND BIOHAZARD
MANAGEMENT – 2017 (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, A. Mladjova, 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 consequences. The causative agents of some zoonoses are microorganisms from risk group 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 2017, NRC ZERNI-BM maintained preparedness for timely and competent reaction for detection of potential bioterrorist agents. Cutaneous anthrax in a stockbreeder from the village of Trapishte, Razgrad district was culture confirmed. Molecular typing of the *Bacillus anthracis* isolate showed a genotype similar to strains from Shumen region. Three new, epidemiologically related cases of brucellosis were diagnosed in stockbreeders from the region of Sliven. No seropositive individuals were found in screening serological tests of target groups from the previous 2 autochthonous outbreaks of brucellosis. This showed that the control measures undertaken during these outbreaks were successful. In 2017 there were no cases of Tularemia. Two cases of CCHF and 7 of HFRS were diagnosed. Laboratory evidence were found for: West Nile fever – 1 case; Leptospirosis – 8 patients; Listeriosis – 7 cases. No human infections caused by Ebola, Marburg, Lassa, MERS-CoV were found. Thirty-two patients with acute Q fever were diagnosed during the year in different regions of the country. Two outbreaks of the disease were registered in Blagoevgrad and Gabrovo districts with 11 and 7 cases, respectively. Four chronic Q fever patients with endocarditis were monitored. A total of 103 persons were diagnosed with Trichinellosis. During the year 6 outbreaks of this disease were reported in Burgas (2); St. Zagora; St. Zagora – Plovdiv, Haskovo and Shumen districts. Domestic pigs was source of the infection in 4 outbreaks and wild boars in 2. There were 218 cases of Echinococcosis registered in 2017. From them 196 were with primary form, 22 with relapse, and 1 patient from Kardjali was with fatal outcome. Twenty-one samples from migrants were negative for Echinococcosis.

NRC ZERNI-BM experts participated actively in the development of scientific projects, 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, organized by the EMERGE project, INSTAND, WHO. The results from various NRC ZERNI-BM activities during 2017 were presented in a number of articles and congresses.

Keywords: zoonoses, new infections, biohazard management

БАКТЕРИАЛНИ, ВИРУСНИ И ПАРАЗИТНИ ВЕКТОР-ПРЕНОСИМИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2017 Г.

И. Христова, И. Трифонова, Т. Гладнишка, Е. Панайотова,
Р. Харизанов, П. Генова-Калу, А. Курчатова, О. Миков,
В. Иванова, Е. Тасева, Н. Миткова, И. Райнова

НЦЗПБ

Общо през 2017 г. бяха регистрирани 402 потвърдени случая на Лаймска борелиоза

(290 случая за 2016 г.) и 180 случая на Марсилска треска (212 за 2016 г.). Доказани бяха 10 болни с вирусни хеморагични трески: 2 случая на Кримска-Конго хеморагична треска ККХТ (4 за 2016 г.) и 8 случая на хеморагична треска с бъбречен синдром (10 случая за 2016 г.). Потвърдени бяха 2 болни с флавирусни инфекции: един със Западнонилска треска и друг с кърлежов енцефалит. Няма регистрирани смъртни случаи от ККХТ, ХТБС, Ку-треска и Лаймска борелиоза, регистрирани са 3 смъртни случая от Марсилска треска. През 2017 г. продължи участието на специалисти от референтния център по векторни инфекции в Националната програма за профилактика и контрол на векторно-предавани трансмисивни инфекции при хората в Р. България, 2014–2018 г. В 18 области от страната беше проведен надзор за наличие на азиатския тигров комар *Aedes albopictus*. Установи се присъствието му в 14 области, осем от които са новоинвазирани. При 32 пациента беше доказана остра форма на инфекция от Ку-треска, със симптоматика на продължително неясно фебрилно състояние, атипична пневмония, хепато- и спленомегалия, ендокардит и др., хоспитализирани в различни клинични заведения. Два епидемични взрива от Ку-треска бяха диагностицирани – в областите Благоевград и Габрово. При 4 пациента беше доказана хронична форма на инфекцията с развитие на ендокардит. Изследвани бяха най-малко по 2 серумни проби чрез ELISA и едностъпков конвенционален PCR. Заболяване от Марсилска треска беше установено при 21 пациента, нямаше епидемични взривове от Марсилска треска през 2017 г. За първи път от десет години насам не бяха регистрирани случаи на автохтонна висцерална лайшманиоза. Продължава тенденцията ежегодно да се регистрират и случаи на внос на малария. През 2017 г. бяха регистрирани 8 случая на вносна малария с причинители: *P. falciparum* (6 случая), *P. malariae* и *P. vivax* (по един случай). Четирима от болните са български граждани и четирима са чужди граждани. Случаи на заболяване бяха регистрирани на територията на четири области: София (пет случая), Плевен, Варна и Хасково (по един случай).

Кл. думи: вектор-преносими инфекции, Лаймска борелиоза, ККХТ, Марсилска треска, Ку-треска, висцерална лайшманиоза

BACTERIAL, VIRAL AND PARASITIC VECTOR-BORNE INFECTIONS IN BULGARIA, 2017

I. Christova, I. Trifonova, T. Gladnishka, E. Panayotova,
R. Harizanov, P. Genova-Kalu, A. Kurchatova, O. Mikov,
V. Ivanova, E. Taseva, N. Mitkova, I. Rainova

NCIPD

A total of 402 confirmed cases of Lyme borreliosis (290 cases in 2016) and 180 cases of Mediterranean spotted fever (212 in 2016) were registered in 2017. A total of 10 patients with viral haemorrhagic fevers were detected: 2 cases of Crimean-Congo hemorrhagic fever (4 in 2016) and 8 cases of hemorrhagic fever with renal syndrome (10 cases for 2016). Two patients with flavivirus infections were confirmed: one with West Nile fever and another with tick-borne encephalitis. There are no recorded deaths from CCHF, HFRS, Q-fever and Lyme borreliosis, while 3 deaths from Mediterranean spotted fever were recorded. Specialists from National reference center for vector-borne diseases continue their activities as participants of the National Program for prophylaxis and control of vector-borne infections in Republic of Bulgaria, 2014–2018. A surveillance on the presence of Asiatic tiger mosquito *Aedes albopictus* was conducted in 18 regions of the country. The species was found in 14 regions, with eight of them being newly invaded. In 32 patients acute Q-fever was diagnosed with symptoms of prolonged unclear febrile illness, atypical pneumonia, hepato- and splenomegaly, endocarditis, etc. hospitalized in different hospitals of the country. Two outbreaks of Q-fever were diagnosed – in districts of Blagoevgrad and Gabrovo. In 4 patients, chronic form of the infection with endocarditis was demonstrated. At least 2 serum samples were tested by ELISA and one-step conventional PCR. Mediterranean spotted fever was found in 21 patients, no outbreaks of Mediterranean spotted fever occurred in 2017. For the first time in ten years there were no cases of autochthonous visceral leishmaniasis. Imported cases of malaria continue to appear. In 2017, 8 imported malaria cases were registered, caused by *P. falciparum* (6 cases), *P. malariae* and *P. vivax* (one by each). Four of the patients are Bulgarians and 4 foreigners. Malaria cases are recorded on the territory of four regions: Sofia (five cases), Pleven, Varna and Haskovo (one case in each).

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,
И. Иванов, Е. Шикова, В. Левтерова, И. Симеоновски,
Е. Голкочева-Маркова, И. Райнова, Н. Цветкова, И. Алексиев,
А. Минкова, А. Курчатова, Н. Владимирова*

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

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

В тази връзка ще бъдат обобщени и анализирани резултатите от диагностичната дейност, имунологичният мониторинг и епидемиологичния надзор на най-често срещаните сексуално предавани бактериални и вирусни инфекции и паразитози през 2017, както и ще бъдат обсъдени някои от съвременните тенденции при СПИ в Европа и у нас.

**ДЕЙНОСТИ НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН
ЦЕНТЪР ПО ИНФЕКЦИИ, СВЪРЗАНИ
С МЕДИЦИНСКО ОБСЛУЖВАНЕ (НРЦ-ИСМО)
ПРЕЗ 2017Г.**

*Е. Добрева, Н. Владимирова, И. Н. Иванов, И. Томова,
М. Николова, С. Йорданова, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова*

Национален Център по Заразни и Паразитни болести (НЦЗ-ПБ), гр. София

Дейностите на НРЦ-ИСМО се осъществяват в няколко ключови направления в съответствие с годишния план за 2017г.: епидемиологичен надзор на инфекциите свързани с медицинското обслужване (ИСМО) и епидемиологичен анализ на ИСМО за 2016г.; молекулярни анализи на клинично значими микроорганизми с потенциален риск за здравето на амбулаторни и хоспитализирани пациенти; вирусологични изследвания за носителство сред медицински персонал и проучвания, относно стерилизацията и дезинфекцията в болнична среда.

**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 etiologic 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 2017 will be summarized and analyzed as well as some of the current trends in STIs in Europe and in Bulgaria .

**ACTIVITIES OF NATIONAL
REFERENCE CENTER OF HEALTHCARE
ASSOCIATED INFECTIONS (NRC-HAI)
IN 2017**

*E. Dobreva, N. Vladimirova, I. N. Ivanov, I. Tomova,
M. Nikolova, S. Yordanova, T. Tenev, E. Golkocheva- Markova*

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

The activities of NRC-HAI were implemented in several key areas in accordance with the annual plan for 2017: epidemiological surveillance of healthcare-associated infections (HAI) and epidemiological analysis of HAI for 2016; molecular analyzes of clinically significant microorganisms with potential health risk for outpatient and hospitalized patients; viralscreening studies among medical staff and performance of surveys on sterilization and disinfection in hospitals.

Seventy five genetic analyses were performed for identification and confirmation of *Clostridium difficile*. Positive results were found in 25.6% (11/43) out-

Проведени са 75 генетични анализа за идентификация и потвърждение на *Clostridium difficile* като положителен резултат показаха 25.6% (11/43) от изследваните амбулаторни пациенти и 75% (24/32) от хоспитализираните пациенти. Резистентността към карбапенеми е проучена при 107 полуреизистентни изолата. NDM-продуциращите *K. pneumoniae* са изолирани все по-често в Българските болници, в сравнение с предходната година.

Обобщените резултати от проведените изследвания в лечебни заведения на питейна вода и вода за медицински/дентални манипулации демонстрират 32.14% позитивни проби за *Legionella pneumophila* (вкл. Sg1).

Проследено е носителството на HBsAg и anti-HCV на медицински специалисти от различни здравни заведения в страната, както е проучен и имунитетът срещу хепатит В вирусна инфекция.

Направените анализи от проведеното проучване в четири лечебни заведения, относно употребата на бактерицидни лампи за дезинфекция на въздух и повърхности допринасят за по-добри резултати в борбата с ИСМО.

През септември-ноември, 2017г. в 12 болници от страната бе организирано «Второ превалянтно проучване на инфекции, свързани с медицинското обслужване и антимикробна употреба в европейските болници за активно лечение». В седем от лечебните заведения се реализира и проучване, относно валидиране на данните. Статистически обработените ECDC доклади бяха предоставени на участващите болници за анализ, с цел подобряване на дейността им в превенцията и контрола на ИСМО.

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

„ВАКСИНОПРЕДОТВРАТИМИТЕ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ“, ГОДИШЕН ОТЧЕТ ЗА ДЕЙНОСТТА НА НАЦИОНАЛНИЯ РЕФЕРЕНТЕН ЦЕНТЪР ПО ВПБ, 2017 Г.

Н. Владимирова¹, А. Курчатова¹, Л. Николаева-Гломб², С. Крумова², А. Стоянова², Т. Тенев², Е. Маркова², Е. Шикова², В. Левтерова³, Н. Бранкова³, И. Симеоновски³, А. Дечева³, М. Николова⁴

НЦЗПБ, Национален референтен център по ваксинаепредотвратими инфекции,

1. Отдел Епидемиология
2. Отдел Вирусология
3. Отдел Микробиология
4. Отдел Иммунология

Цел: Годишният отчет на цялостната дейност на екипа на Националния референтен център по ваксинаепредотвратими болести (НЦЗПБ) цели да предостави обобщение на работата по епидемиологичния и лабораторния надзор на ВПБ, профилактиката на ВПБ и комуникациите на информация за ВПБ към специалисти в здравеопазването и към обществото.

Материали и методи: годишните данни от епидемиологичния надзор и индикаторите за ВПБ на национално ниво са анализирани едновременно с данни от референтната лабораторна диагностика на етиоло-

patients and 75% (24/32) hospitalized patients. The resistance to carbapenems was studied in 107 multidrug resistant isolates. NDM-producing *K. pneumoniae* were isolated more frequently from Bulgarian hospitals compare to previous year.

Summarised results from investigation of potable water and water in health-care facilities for medical/dental treatment show 32.14% *Legionella pneumophila* (incl. Sg1) positive samples.

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

The study on the use of bactericidal lamps to disinfect air and surfaces in four hospitals contribute better results in the fight with HAI.

During September-November, 2017 in 12 hospitals of the country was organized «The Second point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals». In seven acute care hospitals was realized validation data process. Statistically processed ECDC reports were provided to participating hospitals for analysis in order to improve the activity in the prevention and control of HAI.

Key words: Healthcare-associated infections (HAI), surveys

“VACCINE PREVENTABLE DISEASES IN BULGARIA”, ANNUAL REPORT ON THE ACTIVITIES OF THE NATIONAL REFERENCE CENTER-VPD, 2017

N. Vladimirova¹, A. Kurchatova¹, L. Nikolaeva-Glomb², S. Ivanova², A. Stoyanova², E. Markova², E. Shikova², V. Levterova³, N. Brankova³, I. Simeonovski³, A. Decheva³

NCIPD, National Reference Center for Vaccine Preventable Diseases,

1. Department of Epidemiology and Communicable Diseases Surveillance
2. Department of Virology
3. Department of Microbiology
4. Department of Immunology

Aim: The Annual Report of integrated activities of the National Reference Center on Vaccine Preventable Diseases (NRC –VPD) aims to provide an overview of the epidemiological and laboratory surveillance of vaccine preventable diseases in Bulgaria, VPD prevention and also communication of information related to VPD, and targeted to medical specialists and to the community.

Materials and methods: Annual data of epidemiological surveillance at national level and indicators for VPD are analyzed simultaneously with data obtained through reference laboratory diagnostics of VPD- etiological agents.

логични причинители на ВПБ. Събрана е също и информацията относно комуникации по темата за ВПБ с участието на експерти от НРЦ.

Резултати:

1. Анализ на ваксинапредотвратимите болести в България (2016 г.);
2. Отчет за имунизациите и имунизационния обхват (2016 г.);
3. Референтна лабораторна диагностика за доказване причинителите на ВПБ, подлежащи на лабораторен надзор;
4. Дейности в подкрепа на Министерство на здравеопазването и Регионалните здравни инспекции по време на епидемията от морбили (2017);
5. Дейности по време на Европейската имунизационна седмица в България (2017);
6. Колаборация с ECDC и регионалния офис на СЗО;
7. Научна и преподавателска работа в областта на следдипломното обучение на експертите от НРЦ-ВПБ;
8. Комуникация на информацията за ВПБ.

Заклучение: Широк обхват дейности по отношение контрола, науката, преподаването и обучението в областта на ВПБ бяха проведени през 2017 г. Работата на НРЦ-ВПД помага на здравните власти при вземането на решения, основани на доказателства, при планирането и подобряването на услугите и действията по превенция и управление на тези болести, и продължава да допринася за подобряване на епидемиологичната ситуация в страната при всяка една ВПБ.

Ключови думи: ваксинапредотвратими болести, надзор, имунизации

Information on communication activities of NRC experts related to the VPD topic is collected too.

Results:

1. Analysis of vaccine preventable diseases (2016);
2. Report on Immunizations and Immunization coverage (2016);
3. Reference laboratory diagnostics for evidence of VPD antigens subject of lab surveillance;
4. Activities to support Ministry of health and Regional Health Inspectorates during the measles outbreak (2017);
5. Activities during the European Immunization Week in Bulgaria (2017);
6. Collaboration with the ECDC and WHO regional office;
7. Scientific work and post-graduate training/teaching activities of experts of NRC-VPD;
8. Communication of information regarding VPD.

Conclusions: Wide range of activities in regard to VPD control, science, teaching and education were performed in 2017. The work of NRC-VPD assist health authorities in making evidence-based decisions to plan and improve services and interventions for preventing and treating these diseases, and continues to contribute how best to improve the epidemiological situation of each VPD in the country.

Key words: vaccine preventable diseases, surveillance, immunizations

Микробна лекарствена резистентност

НОВ МЕТОД ЗА РУТИННО ОТКРИВАНЕ И ДИФЕРЕНЦИРАНЕ НА КАРБАПЕНЕМАЗА-ПРОДУЦИРАЩИ *ENTEROBACTERIACEAE*

Стефана Събчева¹, Божана Тодорова¹, Иван Иванов²,
Магдалена Лесева³, Красимира Иванова², Веселин Добринов²,
Мартин Недялков², Елена Терзиева³, Цветелина Господинова³,
Елина Добрева², Румяна Христова², Тодор Кантарджиев²

1. Микробиологична лаборатория, Университетска специализирана болница за активно лечение по онкология
2. Национална референтна лаборатория „Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност“, Национален център по заразни и паразитни болести
3. Микробиологична лаборатория, Университетска многопрофилна болница за активно лечение и спешна медицина „Н. И. Пирогов“

Цел: Рутинното откриване на карбапенемаза-продуциращи *Enterobacteriaceae* (КПЕ) е от съществено значение за лечението на болните и контрола на инфекциите. В предишно наше проучване установихме, че Mastdiscs ID Carbapenemase Detection Set (MAST-CDS) комбиниран с disk темоцилин и KPC&MBL&OXA-48 disc kit осигуряват надеждно фенотипно потвърждаване на карбапенемази от класовете А и В в изолати *Enterobacteriaceae*, с изключение на *Proteus*, и подпомагат идентификацията на OXA-48. Целта на това проучване е да се определи ефективността на Mastdiscscombi Carba plus (MAST-Carba plus) – нов метод за откриване на карбапенемази, включително OXA-48, в български изолати *Enterobacteriaceae*.

Материал/методи: MAST-Carba plus съдържа disk темоцилин с MBL инхибитор, disk фаропенет самостоятелно и в комбинация с MBL инхибитори, KPC инхибитор и AmpC инхибитор. Тестовете бяха изпълнени съгласно инструкциите на производителя. В първата част на това проучване направихме оценка на ефективността на MAST-Carba plus, използвайки набор от 161 клинични изолати *Enterobacteriaceae* и 5 референтни щамове с генетично определени карбапенемази от Националната референтна лаборатория „Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност“. Колекцията включва 80 NDM продуценти (*Klebsiella pneumoniae*, n = 72; *Escherichia coli*, n = 8); 47 продуценти на VIM (*Proteus mirabilis*, n = 42; *Serratia marcescens*, n = 2; *K. pneumoniae*, n = 2; *Citrobacter freundii*, n = 1), 31 KPC-продуценти (*K. pneumoniae* и 8 щамове с OXA-48 (*K. pneumoniae*, n = 5; *C. freundii*, n = 1; *Enterobacter cloacae*, n = 1; *E. coli*, n = 1). Допълнително бяха изследвани 116 нови карбапенем-нечувствителни клинични изолати едновременно с MAST-Carba plus и молекулярни методи. Тази колекция включва 91 последователни изолати от УСБАЛО и 25 изолата от УМБАЛСМ «Н. И. Пирогов», изолани между януари 2017 г. и февруари 2018 г.

A NEW METHOD FOR ROUTINE DETECTION AND DIFFERENTIATION OF CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE

Stefana Sabtcheva¹, Bozhana Todorova¹, Ivan Ivanov²,
Magdalena Lesseva³, Krasimira Ivanova², Veselin Dobrinov²,
Martin Nedyalkov², Elena Terzieva³, Tzvetelina Gospodinova³,
Elina Dobрева², Rumyana Hristova², Todor Kantardjiev²

1. Laboratory for Clinical Microbiology, University Specialised Hospital for Active Treatment in Oncology
2. National Reference Laboratory for Control and Monitoring of Antibiotic Resistance, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases
3. Laboratory for Clinical Microbiology, Emergency Medical Institute “N. I. Pirogov”

Objectives: Routine detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) is essential for patient care and infection control procedures. In our previous study, we found that the Mastdiscs ID Carbapenemase Detection Set (MAST-CDS) combined with temocillin disc and the KPC&MBL&OXA-48 disc kit provide reliable phenotypic confirmation of class A and B carbapenemases in non-*Proteus* *Enterobacteriaceae* species isolated in Bulgaria, and aid the presumptive identification of OXA-48. The aim of this study was to determine the ability of the new Mastdiscscombi Carba plus system (MAST-Carba plus) to detect carbapenemase production, including OXA-48, in Bulgarian *Enterobacteriaceae* isolates.

Material/methods: MAST-Carba plus is a five disc detection set comprising of a temocillin disc with a MBL inhibitor, a faropenem only disc, and with MBL inhibitors, KPC inhibitor and AmpC inhibitor discs. The disc set testing, designated to detect all carbapenemase types was performed following manufacturer's instructions. In the first part of this study, we evaluated the effectiveness of MAST-Carba plus system using a collection of 161 clinical *Enterobacteriaceae* and 5 reference strains with genetically defined carbapenemases from the National Reference Laboratory for Control and Monitoring of Antibiotic Resistance. The test collection included 80 NDM producers (*Klebsiella pneumoniae*, n=72; *Escherichia coli*, n=8); 47 VIM producers (*Proteus mirabilis*, n=42; *Serratia marcescens*, n=2; *K. pneumoniae*, n=2; *Citrobacter freundii*, n=1) 31 KPC producing *K. pneumoniae*, and 8 OXA-48 producers (*K. pneumoniae*, n=5; *C. freundii*, n=1; *Enterobacter cloacae*, n=1, *E. coli*, n=1). A further evaluation of MAST-Carba plus was performed using 116 recent carbapenem non-susceptible clinical isolates in parallel with molecular methods for carbapenemase detection. This collection included 91 consecutive isolates from the Cancer hospital and 25 isolates from EMI „N. I. Pirogov“ recovered during January 2017-February 2018.

Results: Of 166 CPE isolates, 127, 31 and 8 were defined as MBL, KPC, and OXA-48 producers, respectively, including VIM-positive *P. mirabilis* strains, not detected previously with meropenem-based combined disc methods. For

Резултати: От 166-те КПЕ, 127 (включително и VIM-позитивните *P. mirabilis*, които не бяха открити в предишното ни проучване), 31 и 8 бяха определени съответно като продуценти на MBL, KPC и OXA-48. MAST-Carba plus правилно класифицира и новооткритите 93/116 КПЕ, идентифицирани като NDM (*K. pneumoniae*, n = 87; *E. coli*, n = 1); VIM (*P. mirabilis*, n = 2), KPC (*K. pneumoniae*, n = 2) и OXA-48 (*S. marcescens*, n = 1).

Заклучение: MAST-Carba plus е нов метод подходящ за рутинно откриване и диференциране на всички карбапенемаза-продуциращи *Enterobacteriaceae*, изолирани в България.

Ключови думи: *Enterobacteriaceae*, карбапенемази, фенотипно откриване

116 recent isolates, MAST-Carba plus correctly classified 93 newly identified carbapenemase producers with NDM (*K. pneumoniae*, n=87; *E. coli*, n=1); VIM (*P. mirabilis*, n=2), KPC (*K. pneumoniae*, n=2) and OXA-48 (*S. marcescens*, n=1).

Conclusions: MAST-Carba plus is a simple, convenient, and highly predictive disc system for routine detection and differentiation of all carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, isolated in Bulgaria.

Key words: *Enterobacteriaceae*, carbapenemases, phenotypic detection

ГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ НА АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ КЛИНИЧНО-ЗНАЧИМИ ИЗОЛАТИ НА *STAPHYLOCOCCUSAUREUS* И *STREPTOCOCCUSPNEUMONIAE*

М. Мурджева^{1,2}, Й. Калчев^{1,2}, И. Иванов³,
В. Кирина^{1,2}, Р. Райчева⁴, Т. Кантарджиев³

1. Катедра по микробиология и имунология, Фармацевтичен факултет, Медицински университет-Пловдив
2. Лаборатория по Микробиология на УМБАЛ „Св. Георги“-Пловдив
3. Национален център по заразни и паразитни болести-София
4. Катедра по Социална медицина и организация на здравеопазването, Факултет по обществено здраве, Медицински университет-Пловдив

ЦЕЛ: Да се проучат механизмите на резистентност към някои антибиотици при клинично значими изолати на пневмококи и стафилококи.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ: Изследвани са 15 клинично значими изолати на *Staphylococcus aureus* и 20 на *Streptococcus pneumoniae*, изолирани и идентифицирани в Лабораторията по Микробиология на УМБАЛ „Св. Георги“-Пловдив. Извършен е мултиплексен PCR в НРЛ на НЦПЗБ-София за откриване на гени за резистентност към антибиотици.

РЕЗУЛТАТИ: В над половината стафилококи се доказаха едновременно *mecA* и *erm* гени, обуславящи резистентност съответно към бета-лактами и макролиди. Най-често (в 75%) се откриват *ermA* гени, *ermB* – в 12,5% и *ermC* – в 12%, а в 20% – *tetM* и *tetK* гени, медиращи резистентност към тетрациклини. При *S. aureus* не се установиха *aac(6)-Ie+aph(2'')* гени зарезистентност към аминогликозиди. При пневмококите *rbp1* генът за резистентност към пеницилини се доказа в 60%, *rbp2b* – в 20%, а *rbp2x* – в 5%. Свързаните с макролидна резистентност *erm* гени се определиха в 50% от пневмококите, а *mefA* – в 60%. При пневмококите в 75% се установиха *tet* гени с доминиращо участие на *tetM*.

ЗАКЛУЧЕНИЕ: Резистентността към бета-лактами при клинично значими *S. aureus*, определяна от наличие на *mecA* гена, се съчетава и с резистентност към макролиди с преобладаване на *ermA* гени. При *S. pneumoniae* резистентността към пеницилин се дължи предимно на *rbp1* гена, а макролидната – на *ermB* и *mefA* гени. Резистентността към тетрациклин, обусловена от *tet* гени, е по-честа при пневмококи, отколкото при *S. aureus*. Получените данни за генетичните механизми на резистентност са основа за правилен избор на антибиотична терапия при различни стафилококови и пневмококови инфекции.

GENETIC MARKERS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *STAPHYLOCOCCUSAUREUS* AND *STREPTOCOCCUSPNEUMONIAE* CLINICALLY IMPORTANT ISOLATES

М. Murdjeva^{1,2}, Y. Kalchev^{1,2}, I. Ivanov³,
V. Kirina^{1,2}, R. Raycheva⁴, T. Kantardjiev³

1. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Medical University-Plovdiv
2. Laboratory of Microbiology, University Hospital “St. George”-Plovdiv
3. National Center of Infectious and Parasitic Diseases – Sofia
4. Department of Social Medicine and Health Organization, Faculty of Public Health, Medical University-Plovdiv

AIM: to study the mechanisms of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* clinically important isolates

MATERIAL AND METHODS: Clinically important pathogens – 15 *Staphylococcus aureus* and 20 *Streptococcus pneumoniae*, were isolated and identified in the Laboratory of Microbiology, University Hospital “St. George”-Plovdiv. They were tested in the National Reference Laboratory, NCIPD-Sofia using multiplex PCR to determine genes of antimicrobial resistance.

RESULTS: *erm* gene, which mediates resistance to macrolides, was established in 53,3% of all *S. aureus* isolates. *ermA* accounted for 75%, *ermB* for 12,5% and *ermC* for 12,5% of the strains. In 53,3% of the isolates the presence of *mecA* and *erm* genes was detected simultaneously. No *aac(6)-Ie+aph(2'')* genes, mediating aminoglycoside resistance, were found in *S. aureus* but *tetM* and *tetK* genes, responsible for tetracycline resistance, were determined in 20%. Among pneumococcal isolates *pbp1* gene was found in 60%, *pbp2b* in 20% and *pbp2x* in 5%. *erm* gene was established in 60% and *mefA* gene in 50%, both mediating macrolide resistance among pneumococci. Tetracycline resistance genes were detected in 75% of all *S. pneumoniae* isolates with *tetM* prevailing.

CONCLUSION: Antimicrobial resistance to beta-lactams in *S. aureus* mediated by *mecA* gene is associated in half of the isolates with *ermA* genes, responsible for resistance to macrolides. Resistance to penicillins in *S. pneumoniae* is mainly due to *pbp1* gene and macrolide resistance is based on *ermB* and *mefA* genes. The resistance to tetracycline, determined by *tet* genes, is more frequent among *S. pneumoniae* than *S. aureus*. The data gained in this study about the mechanisms of antimicrobial resistance is a basis for adequate antimicrobial treatment in patients with pneumococcal and staphylococcal infections.

**STENOTROPHOMONAS MALTOPHILA –
АНТИМИКРОБНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И
ЭПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА
НОЗОКОМИАЛНИ ИЗОЛАТИ ЗА 5-ГОДИШЕН
ПЕРИОД (2011–2016 Г.)**

Е. Савов¹, А. Трифонова¹, Е. Кьосева¹,
Св. Димов², И. Митов³, Т. Стратева³

1. Лаборатория „Микробиология“, Катедра „Военна епидемиология и хигиена“, Военномедицинска Академия – София;
2. Катедра „Генетика“, Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“;
3. Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет – София.

РЕЗЮМЕ

Цел: Да се проучи чувствителността към антимикробни лекарствени средства (АМАС) и епидемиологията на нозокомиални изолати *Stenotrophomonas maltophilia*.

Материали и методи: Общо 167 изолата *S. maltophilia* бяха събрани за периода 2011–2016 г. от пет университетски болници в България. Видова идентификация беше извършена с VITEK 2 (bioMérieux) и потвърдена с 23S рНК полимеразно-верижна реакция (PCR). Чувствителността към АМАС беше определена чрез дифузионен дисков метод и Etest, в съответствие с препоръките на EUCAST и CLSI. Всички щамове, разпределени в два хронологични периода (2011–2013 и 2014–2016 г.), бяха генотипизирани чрез случайно амплифициране на полиморфна ДНК (RAPD)-PCR. Получените полиморфни профили бяха подложени на биоинформатичен UPGMA анализ чрез софтуер *GeneTools* 4.01 (Syngene).

Резултати: Чувствителността на изолатите беше следната: minocycline 97.6%, levofloxacin 91.0%, trimethoprim/sulfamethoxazole 86.2%, ticarcillin/clavulanic acid 50.3%, ceftazidime 38.9%. Чрез UPGMA бяха установени по 14 клъстерни групи (с клонална свързаност между щамове в тях над 70%) и в двата хронологични периода. Десет щамове (8 и 2, съответно от 2011–2013 и 2014–2016) показваха уникални RAPD профили и липса на клъстерна принадлежност.

Заклучение: Най-активен от тестваните АМАС е minocycline, следван от levofloxacin и trimethoprim/sulfamethoxazole. Епидемиологичното типизиране демонстрира подчертано хетерогенна популация, състояща се предимно от клонално несвързани клинични изолати *S. maltophilia*, в мониторираните болници. Нарастващата честота на изолиране на патогена, както и появата на резистентни щамове към стратегически антибиотици, налагат непрекъснат надзор върху антимикробната лекарствена резистентност и епидемиологията на нозокомиалните инфекции, причинени от *S. maltophilia*.

Ключови думи: *S. maltophilia*, антимикробна чувствителност, епидемиологично типизиране.

**STENOTROPHOMONAS MALTOPHILA –
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY
AND EPIDEMIOLOGICAL TYPING
OF NOSOCOMIAL ISOLATES DURING
A 5-YEAR PERIOD (2011–2016)**

E. Savov¹, A. Trifonova¹, E. Kioseva¹,
S. Dimov², I. Mitov³, T. Strateva³

1. Laboratory of Microbiology, Department of Military Epidemiology and Hygiene, Military Medical Academy – Sofia;
2. Department of Genetics, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”;
3. Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University of Sofia.

ABSTRACT

Aim: To explore microbiological research on antimicrobial susceptibility, as well as epidemiology of nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* isolates.

Materials and Methods: A total of 167 isolates of *S. maltophilia* was collected during 2011–2016 from five university hospitals in Bulgaria. Species identification was done by VITEK 2 (bioMérieux) and confirmed using polymerase chain reaction (PCR) assay of the 23S rRNA gene. Susceptibility to antimicrobial agents was performed by both disk diffusion method and Etest, according to the EUCAST and CLSI recommendations. All strains, divided into two chronological periods (2011–2013 and 2014–2016), were genotyped by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR. The resulting polymorphic patterns were subjected to bioinformatic UPGMA analysis with the *GeneTools* 4.01 software (Syngene).

Results: The susceptibility of the isolates was as follows: minocycline 97.6%, levofloxacin 91.0%, trimethoprim/sulfamethoxazole 86.2%, ticarcillin/clavulanic acid 50.3%, ceftazidime 38.9%. Fourteen cluster groups (with clonal relatedness between the strains in them above 70%) were determined in both chronological periods by UPGMA analysis. Ten strains (8 and 2, respectively from 2011–2013 and 2014–2016) revealed unique RAPD profiles and lack of cluster affiliations.

Conclusion: The most potent of the tested antimicrobials is minocycline, followed by levofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole. Epidemiological typing demonstrates a markedly heterogeneous population consisting predominantly of clonal unrelated clinical isolates of *S. maltophilia* in the monitored hospitals. The increasing frequency of the pathogen's isolation, as well as emergence of strains, resistant to strategic antibiotics, require continuous surveillance of antimicrobial resistance and epidemiology of nosocomial infections caused by *S. maltophilia*.

Key words: *S. maltophilia*, antimicrobial susceptibility, epidemiological typing.

ИНФЕКЦИИ ОТ МНОЖЕСТВЕННО-РЕЗИСТЕНТНИ ПАТОГЕНИ В ПЕДИАТРИЧНА ОНКО-ХЕМАТОЛОГИЧНА КЛИНИКА. АНАЛИЗ, РИСКОВИ ФАКТОРИ, НОСИТЕЛСТВО И КЛИНИЧНИ СЛУЧАИ .

Р. Вачева-Добревска¹, П. Стефанова¹, В. Дичева¹,
Е. Енчева¹, А. Мучинова², М. Йорданова², Д. Константинов²

1. Лаборатория „Микробиология и Вирусология“, УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“, София
2. Клиника „Детска клинична хематология и онкология“, УМБАЛ „Царица Йоанна- ИСУЛ“, София

Цел: Множествено резистентни (MDR) патогени се доказват с повишена честота в нашето съвремие, като причинители на инфекции при имунокомпрометирани пациенти. Проучването цели да анализира повишаване нивото на резистентност в детска онко-хематологична клиника (PEDONCO); рискови фактори, носителство на MDR бактерии и *Candida spp.*; инфекции на кръвообращението (BSI); поява нови механизми на резистентност. Представяне на клинични случаи.

Материали/методи: Анализирани са данни за антибиотичната резистентност (AMR) в периода 2015–2017. Идентификация и изпитване чувствителността към антибиотици: с VITEK 2 и *api20CAUX*, *BioMerieux, France* и конвенционални методи. Приложена EUCAST 2016 (v.6–1) система. Мултиплекс PCR (VIM, IMP, KPC, NDM, OXA-48, GES) е използван за детекция на карбапенемази.

Резултати: В периода 2015–2017 се регистрира повишаване нивото на: MRSE изолати общо за болницата 51,7% -66,3%; ESBL (+) *K. pneumoniae* 76,8% до 80,9%; *E. coli* ESBL (+) 32%-47,6%. В PEDONCO стабилно покачване на MRSE 83,3% – 89,5%; *K. pneumoniae* ESBL (+) 22,5% – 69, 56%; ESBL (+)*E. coli* 69,56% – 85,71%. Инфекциите на кръвта са тежки усложнения при тези пациенти по време на химиотерапия. Доминиращи патогени при BSI :2016 – MRSE 38,8%, *S. maltophilia* 13,8%; 2017- MRSE 39,5%. Регистриран взрив с шест случая BSI от *K. pneumoniae* ESBL (+). Проучено е фекално носителство на MDR патогени, като рисков фактор: 23,6% *E. coli* (ESBL+), 21,03% *C. albicans* and 15,8% *Candida non-albicans*. Идентифицирани осем случая (3,4%) на *C. difficile*. Циркулиращи единични случаи на *K. pneumoniae* клон В (PFGE), доказан NDM-1 посредством секвениране. Карбапенем R *A. baumannii* 72% от изолатите, *blaOXA- 23, blaOXA-40, blaOXA-58*. Представят се случаи на *Trichosporon asahii* BSI и *Listeria monocytogenes* менингит.

Заклучение: Рисковите фактори химиотерапия, кортикостероиди, продължителен прием на антибиотици, продължителност на неутропения, изискват специфична програма за управление употребата на антибиотици: подходяща начална терапия, време до започване на адекватна АБ терапия. Бързата детекция, скрининг, изолация на носителите и стриктен контрол на инфекциите са с важна роля за предотвратяване усложнения от MDR патогени и значителната смъртност при критично увредени педиатрични пациенти.

Ключови думи: Детска онко-хематология, MDR, ESBL взрив, *T. asahii*

INFECTIONS WITH MULTIDRUG- RESISTANT BACTERIA IN A PEDIATRIC HEMATOLOGY-ONCOLOGY CLINIC. ANALYSIS, RISK FACTORS, CARRIERS AND CASE STUDIES .

R. Vatcheva-Dobrevska¹, P. Stefanova¹, V. Dicheva¹,
E. Encheva¹, A. Muchinova², M. Yordanova², D. Konstantinov²

1. Microbiology and Virology Department, University Hospital Queen Joanna, Sofia Bulgaria
2. Pediatric Hematology and Oncology Clinic, University Hospital Queen Joanna, Sofia Bulgaria

Aim: Multidrug-resistant (MDR) bacteria are now increasingly identified as an etiological cause of infections in immunocompromised hosts. The aim of this study is to analyze the increasing resistance level in the pediatric hematology-oncology clinic (PEDONCO); evaluating the risk factors, MDR bacteria and *Candida spp.* carrier; blood-stream infections (BSI); the new resistance mechanisms emergence. To present case studies.

Materials/methods: The AMR data originated from 2015–2017 were analyzed. The identification and antimicrobial susceptibility tests: by VITEK 2 and *api20CAUX*, *BioMerieux, France*; and conventional methods. The EUCAST 2016 (v.6–1) system applied. Multiplex PCR (VIM, IMP, KPC, NDM, OXA-48, GES) used for carbapenemases detection.

Results: Between 2015 and 2017 registered increasing AMR level: MRSE isolates totally in hospital 51,7% -66,3%; persisting high level of ESBL producing *K. pneumoniae* totally for hospital 76,8% to 80,9%; *E. coli* ESBL (+) hospital data 32%-47,6%. In PEDONCO found strong increasing of MRSE isolates 83,3% – 89,5%; *K. pneumoniae* ESBL (+) 22,5% to 69, 56%; ESBL producing *E. coli* from 69,56% to 85,71%. Blood-stream infections (BSI) are severe complications in these patients during chemotherapy. The BSI dominated pathogens for 2016: MRSE 38,8%, *S. maltophilia* 13,8%; for 2017-MRSE 39,5%. Registered and analyzed a short outbreak of six BSI cases with *K. pneumoniae* ESBL (+). Fecal carrier of MDR as a risk factor are investigated: 23,6% *E. coli* (ESBL+), 21,03% *C. albicans* and 15,8% *Candida non-albicans*. Eight cases (3,4%) of *C. difficile* identified. Single cases *K. pneumoniae* Clone B (PFGE), identified as NDM-1 via sequencing circulates. Carbapenem R *A. baumannii* represent 72% of isolates with detected *blaOXA- 23, blaOXA-40, blaOXA-58*. The case studies of *Trichosporon asahii* BSI and *Listeria monocytogenes* meningitis are described.

Conclusion: Risk factors included chemotherapy, corticosteroids, prolonged antibiotic use, duration of neutropenia required specific antibiotic stewardship for these patients: appropriate initial antibiotic treatment, time to initiate adequate antibiotic therapy. Rapid detection, screening, carriers isolation and infection control measures with important role in avoiding MDR complications and substantial mortality of critically ill young patients.

Key words: Pediatric Oncology-hematology, MDR, ESBL outbreak, *T. asahii*

**СЪВРЕМЕННИ ХАРАКТЕРИСТИКИ
НА БАКТЕРИЕМИИТЕ СЪС *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS*. ОДИТ 2016–2017 Г.
В МЕДИЦИНСКИ ИНСТИТУТ – МВР**

Е. Кьолеян, Ш. Тете, Д. Панайотова

Медицински институт – МВР

Цел на настоящата работа е да направи съвременна характеристика на сепсисите със *Staphylococcus aureus*, както и одит на бактериемииите със *S. aureus* в Медицински институт – МВР (МИ) за периода 2016–2017 г.

Материали/ методи. Извършен е преглед на съвременната литература с акцент върху фактори на патогенност и вирулентност, имуноен отговор на макроорганизма, рискови фактори за SIRS, тежък сепсис и септичен шок. Анализирани са бактериемииите със *S. aureus* при пациенти на МИ 2016–2017 г. Лабораторната им диагностика е с Bactec 9050 и според Стандарт „Микробиология“ на МЗ.

Резултати. Съвременната епидемиология на бактериемииите със *S. aureus* е различна в различните страни и континенти. Европа и у нас се наблюдава тенденция за намаляването на бактериемииите със *S. aureus* и MRSA (13.7 % средно MRSA в Европа, 2016 г). Натрупват се нови данни за участието на фактори на вирулентност, като суперантигени, използване на липоева киселина. Установено е значението на отношението на про-инфламаторни и анти-инфламаторни цитокини за тежестта на сепсиса и прогнозата на заболяването. В проведеня одит на бактериемииите в МИ 2016–2017 г., бяха идентифицирани 22 пациента със *S. aureus*. Относителният дял на MRSA щамове е 10 %, 10 % от пациентите са имали и II причинител; при 2 от случаите *S. aureus* е изолиран и от ликвор (менинго-енцефалит). Антибиотичната терапия е съобразена с Препоръките и Микробиологичния резултат. Анализира се случай на пациент, преди диагностициран и лекуван в друга болница.

Заклучение. Въпреки напредъка в диагностичните подходи и новите терапевтични възможности, бактериемииите със *S. aureus* продължават да бъдат предизвикателство за медицинските специалисти, с висока заболяемост и смъртност, и изискващи навременна и по-продължителна антибиотична терапия, особено при пациенти с имunosупресия.

Ключови думи: *S. aureus*– сепсис

**CONTEMPORARY CHARACTERISTICS
OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* -BACEREMIAE.
AN AUDIT 2016 – 2017 IN THE MEDICAL
INSTITUTE – MINISTRY OF THE INTERIOR.**

E. Keuleyan, Sh. Tete, D. Panayotova

Medical Institute – Ministry of the Interior

The aim of the current work is to make a contemporary characteristic of sepsis with *Staphylococcus aureus*, as well as, an audit of *S. aureus*– bacteremiae in the Medical Institute – Ministry of the Interior (MI) for the period 2016–2017.

Materials/ methods. Review of contemporary literature was performed with an accent on factors of pathogenicity and virulence, host immunity response, risk factors for SIRS, severe sepsis and septic shock. Cases of *S. aureus* bacteremiae in MI 2016–2017 were analyzed. Laboratory diagnosis was with Bactec 9050 and according to the Standard “Microbiology” of the Ministry of Health.

Results. Contemporary epidemiology of bacteremiae with *S. aureus* is different in different countries and continents. In Europe and in Bulgaria there is a decreasing trend for *S. aureus* and MRSA (13.7 % mean MRSA in Europe, 2016). New data is accumulating for the participation of virulence factors, as superantigens, use of lipoic acid. Significance of the ratio pro-inflammatory versus anti-inflammatory cytokines has been established for the severity of sepsis and disease prognosis. In the conducted audit of bacteremiae at MI 2016–2017, 22 patients have been identified with *S. aureus*. Relative rate of MRSA strains was 10 %, 10 % of patients had also a II pathogen; in 2 of cases *S. aureus* had been isolated from the cerebrospinal fluid (meningo-encephalitis). Antibiotic therapy was consistent with the Guidelines and the Microbiology result. A patient case was analyzed who had been previously diagnosed and treated in another hospital.

Conclusions: Despite the progress in the diagnostic approaches and new therapeutic options, bacteremiae with *S. aureus* continue to represent a challenge to medical specialists, with high rate of morbidity and mortality, and requiring a prompt and more-prolonged antibiotic therapy, especially in immunocompromised patients .

Key words: *S. aureus*– sepsis

INVITED SPEAKER'S LECTURE

“DEFENSE AGAINST SMALLPOX: PAST, PRESENT, FUTURE”

M. Bray MD MPH

Editor-in-chief, Antiviral Research

Smallpox was eradicated in the late 1970s, but there is concern that the disease might be deliberately re-introduced through bioterrorism, especially since advances in molecular biology now make it possible to synthesize the causative agent, variola virus. It is therefore necessary to maintain capabilities for diagnosis, prevention and treatment. Efforts to prevent smallpox began more than 1000 years ago, with the inoculation of material from skin lesions (“variolation”). Edward Jenner developed a safer method employing cowpox virus (“vaccination”) in the 1790s, and his method, using vaccinia virus, is still the basis of smallpox defense. However, the replication of virus in the skin surface may result in a variety of complications, especially in people with defects in innate or adaptive immunity. Safer attenuated vaccines are now available, and could be used to protect many vulnerable individuals. New antiviral drugs could also supplement the response to a smallpox outbreak. The licensed DNA polymerase inhibitor cidofovir, which can only be administered intravenously, may be replaced by an orally available version, brincidofovir, which is active against a range of DNA viruses. A specific inhibitor of poxvirus replication, tecovirimat, which can also be taken by mouth, is being stockpiled in the USA. These novel therapies might be used to protect unvaccinated persons exposed to a smallpox attack and to improve the safety of traditional vaccination.

Инфекции на респираторния тракт

ЧЕТИРИВАЛЕНТНИТЕ ПРОТИВОГРИПНИ ВАКСИНИ – ЕФЕКТИВНА ПРЕВЕНЦИЯ И КОНТРОЛ НА ГРИПА

проф. д-р Нели Корсун, гмн

Национална референтна лаборатория „Грип и ОРЗ“, Национален център по заразни и паразитни болести, София

РЕЗЮМЕ

Сезонните грипни епидемии са свързани с висока заболяемост, голям брой амбулаторни прегледи, хоспитализации, огромни медицински и социално-икономически разходи. Причинители са грипните вируси тип А (субтипове H1N1 и H3N2) и тип В, който се разделя на две генетични линии, ко-циркулиращи сред хората от 90-те години на 20 век. Тривалентните грипни ваксини съдържат антигени от двата А субтипа и един В щам, представител на едната или другата линия (Victoria или Yamagata). Несъвпаденията между генетичните линии на ваксиналните и епидемичните В вируси, както и трудностите в прогнозирането на линията, която ще доминира през следващия грипен сезон, обуславят необходимостта от разработване на 4-валентни грипни ваксини, съдържащи два В щамове, представители на двете линии. Докладът представя данни за циркулацията на грипните вируси в България, разглежда различни аспекти от епидемиологията на грип В, ваксинапрофилактиката на грипната инфекция и ползата от използването на кватривалентна грипна ваксина за превенция и контрол на сезонен грип.

Ключови думи: грип, кватривалентна грипна ваксина

ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ И ВИРУСОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ГРИПЕН СЕЗОН 2017/2018

И. Георгиева¹, С. Ангелова¹, И. Трифонова¹,
С. Волева¹, А. Минкова², А. Курчатова², Н. Корсун¹

1. Национална референтна лаборатория „Грип и ОРЗ“;
2. Отдел Епидемиология, НЦЗПБ, София

Цел: епидемиологичен и вирусологичен анализ на грипен сезон 2017/2018 г.

Материали и методи: Данните за регистрираните случаи на грип и ОРЗ в периода от 40-та седмица на 2017 г. до 8 седмица на 2018 г. са получени от информационната система за сентинелен надзор. В него са включени общо 218 лечебни заведения за извънболнична помощ, които обслужват 381493 души от всички възрастови групи в 28-те областни града на страната. За оценка на епидемията са използвани методите на персентилите и верижните епидемии. За наличие на грипни вируси са

QUADRIVALENT INFLUENZA VACCINES – EFFECTIVE PREVENTION AND CONTROL OF INFLUENZA

Prof. Neli Korsun, MD, DSc

National Reference Laboratory “Influenza and ARD”
National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

ABSTRACT

Seasonal influenza epidemics are associated with high morbidity, large number of doctors' office visits, hospital admissions, enormous medical and socio-economic costs. The causes are influenza viruses type A (subtypes H1N1 and H3N2) and type B, which are divided into two genetic lineages co-circulating among humans from the 1990s of the 20th century. Trivalent influenza vaccines contain antigens from both A subtypes and one B strain representative of one or the other lineage (Victoria or Yamagata). The mismatches between the genetic lineages of vaccine and epidemic B viruses as well as the difficulties in predicting the lineage that will dominate in the next influenza season determine the need to develop 4-valent influenza vaccines containing two B strains representatives of both lineages. The report presents data on the circulation of influenza viruses in Bulgaria, various aspects of the epidemiology of influenza B, vaccine prophylaxis of influenza infection and the benefits of the use of a quadrivalent influenza vaccine for prevention and control of seasonal influenza.

Key words: influenza, quadrivalent influenza vaccine

EPIDEMIOLOGICAL AND VIROLOGICAL CHARACTERISTICS OF INFLUENZA SEASON 2017/2018

Irina Georgieva¹, S. Angelova¹, I. Trifonova¹, S. Voleva¹, A. Minkova²,
A. Kurchatova², N. Korsun¹

1. National Reference Laboratory “Influenza and ARD”,
2. Department of Epidemiology, NCIPD, Sofia

Aim: epidemiological and virological analysis of the influenza 2017/2018 season.

Methods: Data on registered cases of influenza and ARI during the period from 40 week 2017 to 8 week 2018 are obtained from the information system for influenza and ARI sentinel surveillance. A total of 218 outpatient health care units, serving 381493 people of all age groups from 28 regional cities are included in the sentinel surveillance. The percentile and moving epidemic methods are used for epidemic evaluation. Clinical specimens (nasopharyngeal swabs) of ambulatory treated and hospitalized patients with influenza like ill-

изследвани клинични проби (назофарингеални смивове) от амбулаторно лекувани и хоспитализирани пациенти с грипозни заболявания/ОРЗ от цялата страна. Доказването и типирването/субтипирването на грипните вируси е извършено чрез Real-time RT-PCR реакции. Първите доказани в България грипни вируси са секвенирани в CDC, Атланта и WHO-CC, Лондон.

Резултати: Грипната епидемия през сезон 2017/2018 започна през седмица № 2 на 2018 г. и епидемичният пик беше достигнат през 4-та седмица на 2018 г. Тогава бяха регистрирани 8 806 случая на грип и ОРЗ и заболяемост от 230.83 на 10 000 души. В някои области на страната като Благоевград, Видин, Враца, Перник, Пловдив, Разград, София град, Стара Загора и Ямбол беше отчетена много висока интензивност. От лабораторно изследваните 1230 клинични проби, грипни вируси бяха открити в 436 (35%): A(H1N1)pdm09 – 65 (5,3%), A(H3N2) – 11 (0,9%), B/Yamagata – 345 (28%) и B/Victoria – 15 (1,2%). Секвенираните три вируса B/Yamagata попадат в генетичен клейд 3.

Изводи: Грипната епидемия през сезон 2017/2018 в България започна по-късно в сравнение с предишния сезон. Заболяемостта по време на епидемичния пик беше по-висока в сравнение с предходните два сезона. По време на епидемията доминираха В вирусите от линията B/Yamagata, като съставляваха 79% от доказаните грипни вируси. Секвенираните B/Yamagata вируси попадат в същия генетичен клейд, към който се отнася и ваксиналният вирус B/Phuket/3073/2013 (компонент на 4-валентната грипна ваксина).

Ключови думи: сентинелен надзор, грип, грипни вируси

ВИРУСНА ЕТИОЛОГИЯ НА ОСТРИТЕ ИНФЕКЦИИ НА ДОЛНИЯ РЕСПИРАТОРЕН ТРАКТ ПРИ ДЕЦА НА ВЪЗРАСТ ДО 5 ГОДИНИ В БЪЛГАРИЯ

*Ивелина Трифонова¹, Светла Ангелова¹,
Ирина Георгиева¹, Ирен Цочева², Снежина Лазова²,
Снежана Парина², Сирма Милева², Силвия Волева¹,
Пенка Переновска, Атанас Мангъргов³, Нели Корсун¹*

1. ННРА „Грип и ОРЗ“, Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, София, България;
2. Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Александровска“, МУ-София, България;
3. Инфекциозна болница „Проф. Иван Киров“, София, България

Въведение: Основна причина за високата заболеваемост и болничен прием при децата са остриите инфекции на долните дихателни пътища. Изследването цели да се определи вирусната етиология на тези инфекции при децата под 5-годишна възраст в рамките на два последователни епидемични сезона в България.

Методи: Клиничните, епидемиологичните данни и назофарингеалните секрети бяха събирани регулярно от деца под 5-годишна възраст с остри респираторни инфекции през сезоните 2016/2017 и 2017/2018. Вирусната етиология във връзка с участието на 11 респираторни вируса беше анализирана чрез Singleplex Real Time PCR.

Резултати: От 387 изследвани деца 288 (74%) бяха положителни за поне един респираторен вирус. Коинфекциите с два и три вируса бяха установени при 57 и 6 от инфектираните деца (22%) съответно. Най-общо RSV беше най-често доказваният вирус (131/387, 33,9%), следват от риновируси (15,8%), бокавируси (10,9%), аденовируси (8,8%); грипни вируси от тип А (H3N2) (7%); човешки метапневмовируси (5,2%); параинфлуенца вируси 1/2/3 (4,4%); грипни вируси от тип В (3,4%) и тип А (H1N1) pdm09 (1,3%). Честотата на инфекциите с RSV по време на

ness/ARI from the whole country are tested for influenza viruses. Detection and typing/subtyping of influenza viruses are carried out by Real Time RT-PCR. The first influenza viruses detected in Bulgaria are sequenced in the CDC, Atlanta and WHO-CC, London.

Results: The influenza 2017/2018 season started during the week 2 of 2017 and the epidemic peak was reached in week 4 of 2018 with 8806 influenza and ARI cases registered and 230.83 per 10 000 population incidence rate. The intensity level was very high in some regions of the country: Blagoevgrad, Vidin, Vratsa, Pernik, Plovdiv, Razgrad, Sofia city, Stara Zagora and Yambol. Out of the 1230 clinical samples laboratory tested, 436 (35%) were positive for influenza viruses: A(H1N1)pdm09 – 60 (5,3%), A(H3N2) – 11 (0,9%), B/Yamagata – 345 (28%) and B/Victoria – 15 (1,2%). The sequenced three B/Yamagata viruses belonged to the genetic clade 3.

Conclusions: The influenza 2017/2018 season in Bulgaria started later compared to the previous season and the incidence rate in week 4 was higher than the incidence rate during the epidemic peak in previous two seasons. During the epidemic influenza B/Yamagata viruses predominated accounting 79% of detected influenza viruses. The sequenced B/Yamagata viruses belonged to the same genetic clade as the vaccine virus B/Phuket/3073/2013, a component of the 4-valent influenza vaccine.

Key words: sentinel surveillance, influenza, influenza viruses

VIRAL AETIOLOGY OF ACUTE LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTIONS AMONG CHILDREN YOUNGER THAN 5 YEARS OLD IN BULGARIA (2016–2018)

*Ivelina Trifonova¹, Svetla Angelova¹,
Irina Georgieva¹, Iren Tzocheva², Snezhina Lazova²,
Snezhana Parina², Sirma Mileva², Silvia Voleva¹,
Penka Perenovska², Atanas Mangarov³, Neli Korsun¹*

1. National Laboratory “Influenza and ARD”, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria;
2. Pediatric clinic, University Hospital Alexandrovska, Medical University, Sofia, Bulgaria;
3. Infectious Hospital Prof. Ivan Kirov, Sofia, Bulgaria

Background: Acute lower respiratory tract infections (LRTI) are a leading cause of morbidity and hospital admissions in children. This study aimed to determine the viral aetiology of these infections in children younger than 5 years of ageduring two successive epidemic seasons in Bulgaria

Methods: Clinical, epidemiological data and nasopharyngeal swabs were prospectively collected from children under 5 years old presenting with acute LRTI during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons. Viral etiology was determined by Singleplex Real Time PCR against 11 respiratory viruses

Results: Of the 387 children examined, 288 (74%) were positive for at least one respiratory virus. Co-infections with two and three viruses were found in 57 and 6 of infected children, respectively (22%). Overall, RSV was the most commonly detected virus (131/387, 33,9%), followed by rhinoviruses (15,8%), bocaviruses (10,9%), adenoviruses (8,8%); influenza A(H3N2) (7%); human metapneumovirus (5,2%); parainfluenza viruses 1/2/3 (4,4%); influenza type B (3,4%) and A(H1N1)pdm09 (1,3%). During the 2016/2017 season, detection rate of RSV was higher compared to 2017/2018 season (47% vs 15%). RSV subgroup B outnumbered those of the subgroup A in both seasons. At least one respiratory virus was identified in 55%, 87% and 65% of children with bronchitis, bronchiolitis and pneumonia, respectively.

зимен сезон 2016/2017 беше по висока, в сравнение с тази през сезон 2017/2018 (47% срещу 15%). През двата анализирани сезона преобладаваха респираторно синцитиалните вируси от субгрупа Б над тази на субгрупа А. Поне един респираторен вирус беше установен при 55%, 87% и 65% от децата с бронхит, бронхиолит и пневмония.

Заклучение: Респираторните вируси и в най-голяма степен RSV, са водещи патогени причиняващи остри инфекции на долните дихателни пътища при деца на възраст под 5 години. Диагностичните тестове, използващи молекулярни методи за детекция на респираторни вируси могат да доведат до намаляване на употребата на антибиотици и да подпомогнат мерките за контрол на инфекциите.

РИФАМПИЦИНОВА РЕЗИСТЕНТНОСТ СРЕД ЩАМОВЕ *M. TUBERCULOSIS*, РАЗПРОСТРАНЕНИ В БЪЛГАРИЯ

Е. Бачийска, С. Йорданова, Ю. Атанасова,
Я. Тодорова, А. Байкова, М. Минкова

Национален център по заразни и паразитни болести
(НЦЗПБ), гр. София
Национална референтна лаборатория по туберкулоза (НРЛ ТБ)

Цел: Да бъдат проучени разпространените в България щамове на *M. tuberculosis* с Рифампицинова резистентност през 2016 и 2017г., като се сравняват фенотипните с генетични методи за определяне на лекарствена чувствителност и се представят съответствията между тях.

Методу: В НРЛ ТБ, НЦЗПБ беше проучена лекарствената резистентност на 346 щамове *M. tuberculosis* от цялата страна чрез 2 метода едновременно: фенотипен тест с автоматизирана система BACTECMGIT 960 и линейнохибридизационен анализ (LPA) с молекулярно генетичен тест GenoTypeMTBDRplus (HAIN, Lifescience), v. 1.0. Критична концентрация при определяне на Рифампицинова резистентност с MGIT беше 1 µg/ml. Определянето на резистентността към Рифампицин чрез LPA се базира на мутации в т. нар. гореща точка – кодон 507 до 533 (RRDR) от 81 bp на *rpoB* гена.

Резултати: Определени бяха 51 щамове *M. tuberculosis* с Рифампицинова резистентност по двата метода, като 47 от тях бяха MDR-TB и 4 моно Рифампицин резистентни. В 88,24% (n=45) беше открита мутация S531L, следвана от H526D – 9,8% (n=5) и D 516V – 1,96% (n=1). Фенотипно Рифампицин чувствителни 1,73% (n=6) щамове бяха с Рифампицинова резистентност по LPA, като разминаването се дължеше на откритите т. нар. тихи мутации – с липса само на *giv* тип (n=2 ΔWT2; n=2ΔWT7; n=2ΔWT8), без наличие на мутация. Тихите мутации определят фалшиво положителна рифампицинова резистентност, която няма клинична значимост. Не бяха открити случаи на фалшиво отрицателни случаи, когато мутациите са извън RRDR (LPA е с Рифампицинова чувствителност), а фенотипните тестове са Рифампицин резистентни.

Заклучение: С фенотипни (MGIT) и генетични тестове (LPA) бяха проучени 346 щамове *M. tuberculosis* от цялата страна за 2 годишен период. Прецизиране на случаите с разминаване на резултатите от фенотипните и генетични тестове е от ключово значение за правилната интерпретация на резистентността към Рифампицин – основен антибиотик в терапевтичната схема на туберкулозата.

Благодарности. Това проучване бе проведено, благодарение на безвъзмездно предоставените апаратура и тестове по програмите, финансирана от Глобалния фонд за борба със СПИН, туберкулоза и малария в България: BUL-607-G02-T; BUL-809-G03-T; BGR-T-MoH, 2015–2018.

Ключови думи: *M. tuberculosis*, Рифампицинова резистентност

Conclusions: Respiratory viruses, especially RSV, are principal pathogens of LRTI in children younger than 5 years of age. Diagnostic testing for respiratory viruses using molecular methods may lead to the reduced use of antibiotics and may assist in measures to control infection.

RIFAMPICIN RESISTANT *M. TUBERCULOSIS* STRAINS SPREAD IN BULGARIA

Е. Bachiyska, S. Yordanova, Y. Atanasova,
Y. Todorova, A. Baykova, M. Minkova

National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD),
Sofia, Bulgaria
National Reference Laboratory for Tuberculosis (NRLTB)

Purpose: To study rifampicin resistant *M. tuberculosis* strains isolated in Bulgaria, 2016–2017, comparing phenotypic and genotypic methods for DST and to present discordance between them.

Methods: In NRLTB, NCIPD there were examined 346 strains *M. tuberculosis* from all over the country using 2 methods for DST: phenotypic – BACTECMGIT 960 and genotypic method – LPA, GenoTypeMTBDRplus (HAIN, Lifescience), v.1.0. The critical concentration for Rifampicin was 1 µg/ml. LPA is based on mutations in the codons 507–533 (RRDR) in 81 bp of *rpoB* gene.

Results: There were defined 51 Rifampicin resistant *M. tuberculosis* strains using the both methods. Out of them 47 were MDR-TB and 4 were mono RIF-R. In 88.24% (n=45) was detected mutation S531L, followed by H526D – 9.8% (n=5) and D 516V – 1.96% (n=1). Six phenotypic RIF-S strains – 1.73% were RIF-R by LPA. The discordance was due to “silent mutations” – without wild type (n=2 ΔWT2; n=2ΔWT7; n=2ΔWT8) and without mutation. The “silent mutation” may cause false positivity in molecular tests – not relevant for drug resistance. There were not detected false negative cases, when the mutations are outside the RRDR – RIF-S, but phenotypic is RIF-R.

Conclusion: Using phenotypic (MGIT) and genotypic (LPA) methods for DST there were examined 346 strains *M. tuberculosis* from all over the country in two years period of time. Precise the cases with discordance between phenotypic and genotypic results have a key role for the correct interpretation of the Rifampicin resistance, as Rifampicin remain the basic drug in the TB therapeutic scheme.

Acknowledgements: This study was conducted thanks to the equipment and testing kits provided by the Progras funded by Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria, in Bulgaria: BUL-607-G02-T; BUL-809-G03-T; BGR-T-MoH, 2015–2018

Key words: *M. tuberculosis*, Rifampicin resistance, LPA

КОЖНА ФОРМА НА АСПЕРГИЛОЗА У МОМЧЕ С ОСТРА ЛЕВКЕМИЯ: УРОЦИТЕ ОТ „ОБИКНОВЕНИЯ“ СЛУЧАЙ

М. Божкова¹, Т. Стоева¹, Б. Маринска², В. Калева²,
Д. Дженков³, Д. Димитрова¹, В. Каменова¹, И. Резник⁴

1. Катедра по микробиология и вирусология, Медицински Университет, Варна; УМБАЛ "Света Марина", Варна
2. Катедра по педиатрия, Клиника по детска онкохематология, Медицински Университет, Варна; УМБАЛ "Света Марина", Варна
3. Катедра по патологична анатомия и съдебна медицина, Медицински Университет, Варна; УМБАЛ "Света Марина", Варна
4. Катедра по медицинска генетика, Медицински Университет, Варна; УМБАЛ "Света Марина", Варна

Цел: Да се проучи случай на кожна аспергилоза при момче с остра лимфобластна левкемия, успешно лекувано с voriconazole.

Материали и методи: Микроскопски и културелно върху кръвен и Сабуро агар бяха изследвани тъканни срезове от кожната лезия. Чрез ELISA бяха изследвани серумни проби от пациента за наличие на *Aspergillus* галактоманан антиген. Компютърна томография на гръдна клетка с контраст бе проведена двукратно.

Резултати: Въз основа на всички клинични, микробиологични и хистологични резултати се прие, че се касае за случай на кожна аспергилоза и вероятна начална фаза на инвазивна белодробна аспергилоза, причинени от *Aspergillus flavus*. Предприета бе етиотропна терапия с voriconazol, в резултат на което кожната и нодуларна лезии в белодробния паренхим претърпяха пълно обратно развитие.

Заклучение: Задълбоченият анализ на този клиничен случай демонстрира, че белодробната нодуларна лезия би могла да е потенциално входно място на инфекцията. Това позволи случая да бъде разглеждан като ранен етап на инвазивна белодробна аспергилоза, успешно лекуван с voriconazole.

Ключови думи: *Aspergillus flavus*, voriconazole.

CUTANEOUS ASPERGILLOSIS IN A BOY WITH ACUTE LEUKEMIA: THE LESSONS FROM A "SIMPLE" CASE

M. Bozhkova¹, T. Stoeva¹, B. Marinska², V. Kaleva²,
D. Dzhakov³, D. Dimitrova¹, V. Kamenova¹, I. Resnick⁴

1. Department of Microbiology and Virology, University hospital "St. Marina", Medical University, Varna, Bulgaria
2. Department of Pediatric Oncohematology, University hospital "St. Marina", Medical University, Varna, Bulgaria
3. Department of Clinical Pathology, University hospital "St. Marina", Medical University, Varna, Bulgaria
4. Department of Medical Genetics, University hospital "St. Marina", Medical University, Varna, Bulgaria

Aim: to study a case of cutaneous aspergillosis in a boy with acute lymphoblastic leukemia, successfully treated with voriconazole.

Materials and Methods: Tissue samples from the skin lesion were examined by microbiological methods (microscopically and by cultivation in Sabouraud and blood agar). Serum levels of *Aspergillus* galactomannan antigen were also tested. Computed tomography of the chest with application of contrast was done twice.

Results: On the basis of all clinical, microbiological and histological findings, the case was considered as a cutaneous aspergillosis and probable early stage of invasive pulmonary aspergillosis. Etiotropic therapy with voriconazol was conducted, and as a result both the skin lesion and the nodular pulmonary lesion were completely dissolved.

Conclusion: the detailed analysis of this clinical case demonstrates that a small solitary pulmonary nodule could be a possible portal of entry. This let consider the disease as an early stage of invasive pulmonary aspergillosis, successfully treated with voriconazole.

Key words: *Aspergillus flavus*, voriconazole

Сексуално-предавани инфекции

ЕФЕКТИВНОСТ НА МОНИТОРИНГА И ЛЕЧЕНИЕТО НА ЛИЦАТА С ХРОНИЧНА HIV ИНФЕКЦИЯ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2017 Г.

М. Николова¹, Р. Емилова¹, Я. Тодорова¹, Н. Янчева²,
И. Еленков², М. Стойчева³, Д. Николова⁴, Ц. Дойчинова⁵,
Л. Пекова⁶, И. Алексиев⁷, В. Георгиева⁸, Т. Върлева⁸

1. НРЛ по имунология, Национален център по заразни и паразитни болести
2. СБАЛИПБ «проф. Иван Киров», София
3. Инфекциозна клиника, УМБАЛ «Св. Георги», Пловдив
4. УМБАЛ «Св. Марина», Варна
5. УМБАЛ «г-р Г. Странски», Плевен
6. УМБАЛ проф. Д-р С. Куркович Ст. Загора
7. НРЛ по HIV, Национален център по заразни и паразитни болести
8. Национална програма за превенция и контрол на ХИВ и СПИ, Министерство на здравеопазването

Увод. Комбинираната антиретровирусна терапия (АРТ) намалява HIV-свързаните усложнения и смъртност и ограничава разпространението на инфекцията. У нас АРТ се прилага и мониторира съгласно актуалните европейските стандарти.

Цел. Оценка на ефективността от прилагането на ART при българските пациенти с хронична HIV инфекция през 2017 г.

Методи. Анализирани са епидемиологични и лабораторни данни, предоставени от специализираните отделения (СО) за HIV/СПИИ и мониториращите лаборатории в страната.

Резултати. През 2017 г. в СО са регистрирани 1320 HIV+ лица, 91% от които получават АРТ (срещу 82% и 76% през 2016 и 2015г., $p < 0.001$). За пръв път са започнали АРТ 174 души, с CD4 абсолютен брой средно 426 клетки/ μ l. Използвани са режими, базирани на интегразен инхибитор (INSTI) – 15% (1), нуклеозиден инхибитор на обратната транскриптаза (NNRTI) – 15% (2), протеазен инхибитор второ поколение (PIs) – 41% (3), протеазен инхибитор първо поколение (PIf) – 25% (4), други – 4%. Средната честота на вирусологичен мониторинг е била 1,47; на имунологичен мониторинг – съответно 2,5 преди и 2,1 по време на АРТ. Вирусна супресия (HIVVL < 40 копия/ml) е постигната при 68% от изследваните. Средната продължителност на АРТ през 2017 г. е била 39 мес., като 72 % от мониторираните са лекувани най-малко 1 г. са, а 9% – над 10 г. Средните достигнати през 2017 г. стойности на CD4AC и CD4/CD8 индекс, в зависимост от продължителността на АРТ, са били: 652 и 0,73 (над 1 г.); 675 и 0,77 (над 2 г.); 662 и 0,81 (над 5 г.) и 696 и 0,84 (над 10 г.). С изразен имуноен дефицит (CD4 AC < 200) са били 7% от пациентите, лекувани над 1 г. При лекувани пациенти с вирусологична супресия над 2г. ($n=430$) установихме, че режимът (1–4) не повлиява абсолютно нарастване на CD4 и CD4/CD8 ($KWp > 0.5$), но

EFFICIENCY OF MONITORING AND TREATMENT OF CHRONIC HIV INFECTION IN BULGARIA- 2017

М. Nikolova¹, R. Emilova¹, Y. Todorova¹, N. Yancheva²,
I. Elenkov², M. Stoycheva³, D. Nikolova⁴, C. Doichinova⁵,
L. Pekova⁶, I. Alexiev⁷, V. Georgieva⁸, T. Vurleva⁸

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. University Hospital St. George, Plovdiv
4. University Hospital St. Marina, Varna
5. University Hospital Dr. Ivan Stranski, Pleven
6. University Hospital Prof. Ivan Kirkovich, Stara Zagora
7. NRL of HIV, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
8. National Program for Prevention and control of HIV and STI, Ministry of Health

Background. Combination antiretroviral therapy (cART) decreases HIV-related complications and death, and prevents HIV transmission. In Bulgaria, cART is delivered and monitored according to the current European standards.

Aim. To assess ART efficiency in the Bulgarian HIV+ population treated in 2017.

Methods. Epidemiological and laboratory data were provided by the specialized departments and monitoring laboratories for HIV/AIDS in the country (Sofia, Plovdiv, Plevan, Stara Zagora).

Results. In the end of 2017, 1320 HIV+ patients were registered in specialized HIV/AIDS departments, and 91% of them were on cART (vs. 82% and 76% in 2016 and 2015, $p < 0.001$). In 2017, 174 naive HIV+ patients were started on ART, with average CD4 absolute count (CD4AC) 426 cells/ μ l. The following ART regimens were used: (1) integrase inhibitor (INSTI)-based, (15%), (2) non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) -based (15%), (3) second generation protease inhibitor (PIs)-based (41%), (4) first generation protease inhibitor (PIf)-based (25%), other (4%). The average frequency of virological monitoring was 1,47; and of immunological monitoring – 2,5 before the start of cART, and 2,1 for patients on cART. Viral suppression (HIVVL < 40 copies/ml) was documented in 68% of the tested. The mean treatment duration of patients monitored in 2017 was 39 mo, with 72 % treated at least 1 year, and 9% – over 10 years. The average levels of CD4AC (cells/ μ l) and CD4/CD8 ratio achieved in 2017, depending on cART duration, were: 652 and 0,73 (over 1y); 675 и 0,77 (over 2y); 662 and 0,81 (over 5y); 696 and 0,84 (over 10y). However, 7% of those treated over 1y remained in a state of immune deficiency (CD4 AC < 200). Among cART+ patients with sustained viral suppression over 2 y ($n=430$), the ART regimen (1–4) had no significant effect on the absolute increase of CD4AC and CD4/CD8 ratio ($KWp > 0.5$), but – on the rate of immune recovery ($V \Delta CD4$, $KWp = 0.02$). Pif-based

се отразява на скоростта на имунологично възстановяване (VdeltaCD4, Kwр=0.02). Режимите, базирани на Pif, осигуряват значително по-бавно нарастване на CD4/CD8, на фона на недоловим HIVVL (MWр=0.03).

Изводи. Постигането на максимална ефективност от ART в индивидуален и обществен план изисква своевременно стратиране, оптимален мониторинг и преминаване към препоръчителните режими от ново поколение.

Ключови думи: HIV, ART, имунологичен мониторинг

HIV-1 В ТРАНСМИСИОННАТА ГРУПА НА ХЕТЕРОСЕКСУАЛНИТЕ ЛИЦА 1986–2016 (ПРЕДВАРИТЕЛЕН АНАЛИЗ)

Ренета Димитрова¹, Ася Костадинова¹, Лора Николова¹, Даниела Сиракова¹, Анна Ганчева¹, Ивайло Еленков², Нина Янчева², Мариана Стойчева³, Цеца Дойчинова⁴, Лилия Пекова⁵, Ивелина Тодорова⁶, Ивайло Алексиев¹

1. Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България.
2. Специализирана болница по заразни и паразитни болести, София, България.
3. Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Пловдив, България.
4. Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Плевен, България.
5. Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Стара Загора, България.
6. Университетска болница „Св. Марина“, Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Варна, България.

Цел. От 1986 до края на 2017 г. в България са регистрирани 2691 случая на HIV, разпределени в няколко основни трансмисионни групи. Най-голяма е групата на инфектираните чрез хетеросексуална трансмисия (ХЕТ) – 1347 (50,06%), следвани от групата на мъже, които правят секс с мъже (МСМ) – 763 (28,35%), интравенозни наркомани (ИВН) – 495 (18,39%) и МСМ+ИВН – 42 (1,56%). Целта на настоящото проучване е да се анализира HIV-1 разнообразието в най-голямата трансмисионна група – ХЕТ.

Материали и Методи. По време на вирусологичния мониторинг и с цел да се установят разпространените субтипове на HIV-1 сред ХЕТ, регистрирани до края на 2016 бяха анализирани 491 HIV-1 *pro*/секвенции, получени чрез Trugene и/или Viroseq HIV-1 генотипиращи системи. Секвенциите бяха анализирани чрез Интернет базираната програма COMET v2.2.

Резултати. Епидемиологичните ни данни показват, че 296 (60,29%) от лицата включени в проучването са мъже, 195 (39,71%) са жени. Средната възраст по време на регистрацията е 34 години. 86/491 (17,52%) са мигранти, включително 23 чужденци диагностицирани в България и 63 български граждани, вероятно инфектирани в чужбина. 232 (47,25%) секвенции бяха оценени като субтип В, 86 (17,52%) CRF01_AE, 39 (7,94%) CRF02_AG, 32 (6,52%) са субтип С, А1–32 (6,52%), F1–28 (5,70%), неклассифицирани форми – 23 (4,68%). Бяха установени 9 други HIV-1 субтипове, циркулиращи и уникални рекомбинантни форми.

Заклучение. Инфектираните по хетеросексуален път са най-голямата трансмисионна група с HIV в страната. Генетичното разнообразие в тази група е значително с доминиране на не-В субтипове. Наблю-

regimens provided a significantly slower increase of CD4/CD8 ratio in conditions of undetectable HIV VL. (MWр=0.03).

Conclusion. The timely start of cART, optimal monitoring, and application of last generation first-line regimens are indispensable for the maximal efficiency of cART in the individual and public aspect.

Key words: HIV, cART, immunological monitoring

HIV-1 IN THE TRANSMISSION GROUP OF THE HETEROSEXUAL PERSONS 1986–2016 (PRELIMINARY ANALYSIS)

Reneta Dimitrova¹, Asya Kostadinova¹, Lora Nikolova¹, Daniela Sirakova¹, Anna Gancheva¹, Ivaylo Elenkov², Nina Yancheva², Mariyana Stoycheva³, Tsetsa Doychinova⁴, Liliya Pekova⁵, Ivelina Todorova⁶, Ivailo Alexiev¹

1. National Reference Conformatory Laboratory of HIV, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria.
2. Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria.
3. Department of Infectious Diseases, Medical University, Plovdiv, Bulgaria.
4. Department of Infectious Diseases, Medical University, Pleven, Bulgaria.
5. Clinic of Infectious diseases, University Hospital, Stara Zagora, Bulgaria.
6. University Hospital „St. Marina“, Medical University, Clinic of Infectious Diseases, Varna, Bulgaria.

Objectives. From 1986 till the end of 2017, 2691 cases of HIV have been diagnosed in Bulgaria, distributed in several major transmission groups. Heterosexual transmission (HET) were the largest group consisting of 1347 (50.06%), followed by the group of men who have sex with men (MSM) – 763 (28.35%), intravenous drug users (IDUs) – 495 (18.39%) and MSM + IDU – 42 (1.56%). The aim of this study is to analyze HIV-1 diversity in the largest transmission group – HET.

Materials and Methods. During virological monitoring and to identify prevalent HIV-1 subtypes among HET registered till the end of 2016, 491 HIV-1 *pro* sequences obtained by Trugene and/or Viroseq HIV-1 genotyping systems were analyzed. The sequences were further analyzed using Internet-based program COMET v2.2.

Results. Our epidemiological data show that 296 (60.29%) of people included in the study were men, 195 (39.71%) were women. The average age at the time of diagnosis is 34 years. 86/491 (17.52%) are migrants, including 23 foreigners diagnosed in Bulgaria and 63 Bulgarian citizens, possibly infected abroad. 232 (47.25%) sequences were evaluated as subtype B, 86 (17.52%) CRF01_AE, 39 (7.94%) CRF02_AG, 32 (6.52%) were subtype C, A1–32 (6.52%), F1–28 (5.70%), unassigned forms – 23 (4.68%). It was established 9 other HIV-1 subtypes, circulating and unique recombinant forms.

Conclusion. Heterosexual infected people are the largest HIV transmission group in the country. Genetic diversity in this group is significantly dominated by non-B subtypes. There is an uneven distribution of infected men and women. A significant proportion of those diagnosed with HIV may have acquired the infection abroad. Our results indicated that providing of molecular-epidemiological surveillance of HIV-1 diversity among different transmission groups is important for better control of HIV-1 epidemic in Bulgaria.

Keywords: HIV, subtype, heterosexuals

габа се неравномерно разпределение на инфектираните мъже и жени. Значителна част от диагностицираните с HIV, вероятно са придобили инфекцията в чужбина.

Резултатите показват необходимостта от провеждането на постоянно молекулярно-епидемиологично наблюдение сред различните трансмисионни групи, с цел по-добър контрол на инфекцията.

Ключови думи: HIV, субтип, хетеросексуални лица

СЕРОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА НА HIV С ХЕМИЛУМИНИСЦЕНТЕН МЕТОД (CLIA)

Кунчев М., А. Гоцева, К. Мекушинов

Лаборатория по Вирусология, Военномедицинска Академия

РЕЗЮМЕ

Скринингът и диагнозата на HIV инфекцията се базират на доказване на антитела срещу вируса (anti HIV). От 2013 г. във Вирусологичната лаборатория на Военномедицинска академия-София се работи с високотехнологична апаратура (анализатор Liaison XL). Технологията за комбинирано откриване на p24 антиген на HIV1 и специфични антитела на HIV1/2 в човешки серумни и плазмени проби е базирана на Хемилуминисцентния имунотест (CLIA). За четиригодишен период (2013–2017) са изследвани общо 9140 проби: 4286 на лежачо болни и 4854 на кандидати за военна служба. От потвърдените 15 (0,1%) реактивни резултати, 14 (0,3%) позитивни са на хоспитализирани пациенти и един (0,02%) на кандидат за военна служба.

Ключови думи: Серологична диагностика, HIV, Хемилуминисцентен метод

ХЕРПЕС ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С НЕВРОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНО ПРОУЧВАНЕ ЗА ПЕРИОДА 2014–2017

Е. Шикова и А. Куманова

НРЛ „Херпесни и онкогенни вируси“, НЦЗПБ, София

Цел. Херпес вирусните инфекции могат да доведат до сериозни заболявания на нервната система, понякога с фатални усложнения и смърт. Целта на настоящото проучване е да установи разпространението на херпесните вируси в ликвори на пациенти с неврологични заболявания с оглед изясняване значението на тези вируси за невропатологията в страната.

Материали и методи. В проучването бяха включени ликвори от 503 пациенти с неврологични заболявания на възраст между 17 дни и 90 години, постъпили за изследване в Лаборатория „Херпесни и онкогенни вируси“ през периода 2014–2017г. Ликворите са изследвани с PCR като бяха проведени общо 1227 изследвания за следните херпесни вируси: херпес симплекс вирус (HSV) тип 1, HSV тип 2, Варицела зостер вирус (VZV), цитомегаловирус (CMV) и Епщайн-Бар вирус (EBV). Доказването на херпесните вируси се осъществяваше с търговски китове за RT PCR и in house nested PCR системи за детекция на HSV тип 1, HSV тип 2, VZV, CMV и EBV.

Резултати. По-голяма част (над 65%) от изследваните ликвори бяха от пациенти с енцефалити, енцефаломиелиити, менингити и ме-

HIV SEROLOGICAL DIAGNOSIS WITH CHEMILUMINESCENCE METHOD (CLIA)

Kunchev M., A. Gotseva, K. Mekouchinov

Laboratory of Virology, Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria

SUMMARY

Screening and diagnosis of HIV infection is based on evidence of antibodies to the virus (anti HIV). From 2013 in the Virology Laboratory of Military Medical Academy -Sofia is working with high-tech equipment (Liaison XL). The technology for the combined detection of p24 antigen of HIV1 and specific HIV1 / 2 antibodies in human serum and plasma samples is based on the Chemiluminescence Immunoassay (CLIA). For a four-year period (2013–2017), a total of 9140 samples were investigated: 4286 for the lying patients and 4854 for the military service candidates. Of the confirmed 15 (0.1%) reactive results, 14 (0.3%) positive were for hospitalized patients and one (0.02%) for a candidate for military service.

Key words: Serological Diagnosis, HIV, Chemiluminescence Method

HERPES VIRUS INFECTIONS IN PATIENTS WITH NEUROLOGICAL DISEASES: MOLECULAR GENETIC STUDY FOR THE PERIOD 2014–2017

E. Shikova and A. Kumanova

NRL “Herpes and oncogenic viruses”, NCIPD, Sofia

Objective. Herpes virus infections can lead to serious diseases of the nervous system, sometimes with fatal complications and death. The aim of this study was to determine the prevalence of herpes viruses in the CSFs of patients with neurological diseases in order to clarify the importance of these viruses for neuropathology in the country.

Materials and Methods. The study included 503 CSF samples obtained from patients with neurological diseases, aged between 17 days and 90 years, submitted for testing at the NRL “Herpes and oncogenic viruses” during the period 2014–2017. CSFs were screened by PCR with in total 1227 tests performed to detect the following herpesviruses: herpes simplex virus (HSV) type 1, HSV type 2, varicella zoster virus (VZV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV). Detection of viruses was performed by commercial kits for RT PCR and by in house nested PCR systems for HSV type 1, HSV type 2, VZV, CMV and EBV.

Results. Most (over 65%) of the CSFs we tested were from patients with encephalitis, encephalomyelitis, meningitis and meningoencephalitis. 32.6% of all CSFs were positive for one or several herpes viruses. The most prevalent were HSV type 1, VZV and EBV – each of them found in about 19% of the CSFs tested for these viruses. HSV type 2 and CMV were detected in 7.7% and 7% of the respective samples. Co-infection of two different herpesviruses we found in

нингоенцефалити. 32.6% от всички ликвори бяха позитивни за един или няколко херпесни вируси. Най-често срещани бяха HSV тип 1, VZV и EBV – всеки от тях бе установен в около 19% от изследваните за тези вируси ликвори. HSV тип 2 и CMV бяха открити в 7.7% и 7% от съответните проби. В 15 от ликворите бе установена ко-инфекция на два различни херпесни вируси. Изследвана бе преваляцията на различните херпесни вируси в зависимост от възрастта, пола и клиничната прогноза на пациентите.

Заклучение. Установен е сравнително висок процент на ликворите, позитивни за херпесни вируси, което предполага важна роля на тези вируси за невропатологията в страната. Като се има предвид и съществуващата ефективна етиотропна терапия, своевременната етиологична молекулярна диагностика в тези случаи е от съществено значение и би трябвало да стане задължителен елемент от диагностичните алгоритми при тези заболявания.

Ключови думи: херпесни вируси, невропатология, PCR

15 CSFs. The prevalence of different herpes viruses according to the age, gender and clinical diagnosis of patients was estimated.

Conclusions. We found a relatively high proportion of herpesviruses in CSFs obtained from patients with neurological diseases, suggesting an important role of these viruses for neuropathology in the country. Taking into account the existing effective etiologic therapy, timely etiologic molecular diagnosis in all these cases is essential and should become a mandatory element of the diagnostic algorithms for these diseases.

Key words. herpesviruses, neuropathology, PCR

Ваксина-предотвратими инфекции

РЕЗУЛТАТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНАТА ДИАГНОСТИКА И ТИПИЗИРАНЕ НА НАЙ-ЧЕСТИТЕ БАКТЕРИАЛНИ МЕНИНГИТИ (*N. MENINGITIDIS*, *S. PNEUMONIAE* И *H. INFLUENZAE*) В БЪЛГАРИЯ ЗА ПЕРИОД ОТ 5 ГОДИНИ (2013Г.– 2017Г.).

*И. Симеоновски¹, В. Левтерова¹, Н. Бранкова¹, М. Малчева¹,
И. Томова², А. Мангъргов², Н. Дървеняшка², М. Мурджева³,
Ц. Дойчинова³, Ангелова-Стоичева⁴, Г. Лазарова⁵, Р. Панчева⁶,
А. Бъчварова⁷, Г. Ганчева⁸, В. Егрева⁸, Стаматова⁹,
Баев¹⁰, Игова¹¹, Т. Стоева¹², С. Ашкова-Попова¹³,
Д. Димитров¹⁴, С. Павлова¹⁵, Т. Кантарджиев¹*

1. Национален център по заразни и паразитни болести, София,
2. СБАЛИПБ „проф. Иван Киров“, гр. София,
3. УМБАЛ „Св. Георги“, гр. Пловдив,
4. ЕМБАЛ „Хр. Ботев“, гр. Враца,
5. МБАЛ „Проф. д-р Ст. Куркович“, гр. Стара Загора“,
6. МБАЛ „Св. Иван Рилски“, гр. Дупница
7. МБАЛ „Токуда“, гр. София,
8. УМБАЛ „д-р Георги Странски“, гр. Плевен,
9. МДЛ Бургас,
10. МБАЛ „Д-р Иван Селимински“, гр. Сливен,
11. МБАЛ-Русе,
12. УМБАЛ „Св. Марина“, Варна,
13. МБАЛ Ловеч,
14. МБАЛ Благоевград,
15. Перник ОАРИЛ

Цел: Целта на това изследване е да се проучи етиологията на циркулиращите сред обществото в България бактериални менингити причинени от трите патогена през периода 2013г. – 2017г.

Материали и методи: Използвани са молекулярни методи за диагностика на изпратените материали (ликвор, хемокултура и щамове) на пациенти с бактериален менингит. Материалите са изпратени в Националната референтна лаборатория по „Молекулярна микробиология“ за идентификация и типизиране. Идентификацията на трите патогена и тяхното типизиране е извършено с молекулярни методи за диагностика – полимеразно-верижната реакция в реално време (RealTimePCR) и конвенционален PCR.

Резултати: През периода 2013–2017г. успешно продължава съвместната работа на специалистите от НРЛ Молекулярна микробиология и лекарите от болниците в цялата страна по проблемите на етиологичната диагностика на бактериалните менингити. Получени са 213 клинични материала, които са изследвани за *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Положителни за *N. meningitidis* са 43 броя, за *S. pneumoniae* са 56 и за *H. influenzae* са 8. В последствие положителните за *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* са типизирани за определяне на серогрупата и серотипа чрез полимеразно верижна реакция.

RESULTS OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND TYPIZATION OF THE MOST FAVORABLE BENEFITS (*N. MENINGITIDIS*, *S. PNEUMONIAE* AND *H. INFLUENZAE*) IN BULGARIA FOR THE PERIOD OF 5 YEARS (2013–2017).

*I. Simeonovski¹, V. Levterova¹, N. Brankova¹, M. Malcheva¹,
I. Tomova², A. Mangarov², N. Darvenyashka², M. Murdzheva³,
T. Doychinova³, Angelova-Stoicheva⁴, G. Lazarova⁵, R. Pancheva⁶,
A. Bachvarova⁷, D. Gancheva⁸, V. Edreva⁸, Tsvetanova⁹,
Stamatova⁹, Baev¹⁰, Igova¹¹, T. Stoeva¹², S. Ashkova-Popova¹³,
D. Dimitrov¹⁴, S. Pavlova¹⁵, T. Kantardzhiev¹*

1. National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia,
2. SBALIPB „Professor. Ivan Kirov, Sofia“,
3. „St. George“, Plovdiv,
4. Emil „Hr. Botev“, Vratsa,
5. Hospital „Prof. Dr. Stefan. Kirkovich“ Str., Stara Zagora“,
6. Hospital „St. Ivan Rilski“, Dupnitsa,
7. „Tokuda“, Sofia,
8. University Hospital „Dr. George Stransky“ city. Pleven,
9. MDL Burgas,
10. Hospital „Dr. Ivan Seliminski“ Sliven,
11. „Hospital Ruse“,
12. Hospital „St.. Marina“, Varna,
13. „Hospital Ruse“,
14. MBAL Blagoevgrad,
15. Pernik OARIL

Objective: The aim of this study is to investigate the etiology of bacterial meningitis circulating among the public in Bulgaria caused by the three pathogens during 2013. – 2017

Materials and Methods: Molecular methods were used for diagnostics of sent materials (cerebrospinal fluid, blood culture and strains) of patients with bacterial meningitis. The materials were sent to the National Reference Laboratory of „Molecular Microbiology“ for identification and typing. The identification of the three pathogens and typing of *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* was performed with molecular methods for diagnostics – polymerase chain reaction in real time (Real Time PCR) and conventional PCR.

Results: During the period 2013–2017 successfully continues the joint work of experts from the NRL Molecular Microbiology and doctors from hospitals across the country on issues of etiological diagnosis of bacterial meningitis. 213 clinical materials were received and examined for *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae*. The positive for *N. meningitidis* are 43, for *S. pneumoniae* are 56 and for *H. influenzae* – 8. Subsequently, the positive ones of *N. meningitidis* and *S. pneumoniae* were typed for determination of the serotype and serogroup by the polymerase chain reaction.

Conclusion: The laboratory tests conducted in the NRL „Molecular Microbiology“ show that serogroups b and c of *N. meningitidis* are prevailing for Bul-

Заклучение: Проведените лабораторни изследвания в НРЛ „Молекулярна микробиология“ показват, че при *N. Meningitidis* преобладаващите за България серогрупи са В и С. При *S. pneumoniae* преобладават серотип 3 и серотипове от неваксиналните щамове. При *H. influenzae* получените резултати са тип 6 и нетипабилни.

Ключови думи: менингококова инфекция, типизиране, *N. Meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.

СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА КОКЛЮШ ЗА 2016 И 2017Г.

Надя Бранкова, Виктория Левтерова,
Иван Симеоновски, Тодор Кантарджиев

Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, София

Цел: Цел на проучването е да се направи сравнителен анализ на разпространението на коклюш през 2016г. и 2017г. по възрастови групи сред населението в България.

Материали / Методи: Материалите, използвани за молекулярно-генетична диагностика бяха назофарингеални секрети, взети от респираторния епител на горните дихателни пътища. За периода 2016 – 2017г. бяха събрани, обработени и анализирани 701 бр. материали от суспектни и контактни деца и възрастни за коклюшна инфекция. За генетичния агент на коклюша *Bordetella pertussis* използвахме молекулярно-генетичния метод полимеразно-верижна реакция (PCR).

Резултати: През 2017г. най-високо ниво на заболяемост от коклюш показахме при децата под 1г. (37,80%), докато през 2016г. положителните случаи в същата възрастова група са 23,53%. Във възрастовата група от 1 до 4г. през 2016г. данните сочат наличие на взрив от заболяване от коклюш с ниво на положителни случаи от 32,69%, докато през 2017г. в същата възрастова група процентът на положителни случаи е 24,72%, което ниво е съпоставимо с данни от предходни години. За останалите групи по възраст данните за положителните случаи през 2016 и 2017г. са съпоставими по нива.

Заклучение: Коклюшът е основна ваксинапредотвратима, но все още реална и застрашаваща здравето и живота на кърмачетата бактериална инфекциозна болест. Получените от нас данни потвърждават ролята на погростващи и възрастни в поддържането на циркуляцията на причинителя на коклюш сред населението поради намаляване с времето на естествения имунитет на популацията. Това налага въвеждане на периодични реимунизации за поддържане на ваксиналната защита на всеки отделен индивид и за поддържане на постигнатия профилактичен ефект от имунизацията на населението (колективен имунитет).

Ключови думи: коклюш, PCR диагностика, ваксинация.

МОЛЕКУЛЯРНА ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА МОРБИЛЕН ВИРУС В БЪЛГАРИЯ (2013–2017)

Ст. Крумова, А. Павлова, Н. Владимирова,
А. Курчатова, Т. Кантарджиев

Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗ-ПБ), София, България

Молекулярно епидемиологичните проучвания са ключов компонент в процеса на елиминация на морбили. Генетичните данни в комбинация със стандартната епидемиологична информация, може да се използват за

гария. The prevalent strains of *S. pneumoniae* are serotype 3 and non-vaccine serotypes. For the strains *H. influenzae* it is concluded that the bacteria are serotypes and nontypeable.

Keywords: meningococcal infection, typing, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE PERTUSSIS DISTRIBUTION FOR 2016 AND 2017

Objective: The aim of this study is to do a comparative analysis of the pertussis distribution in 2016 and 2017 by age groups among the population in Bulgaria.

Materials/Methods: From 2016 to 2017 we collected and tested 701 nasopharyngeal swabs from infants and adults suspected for infection and who have been in contact with infected people. Molecular method Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for detection of *Bordetella pertussis*.

Results: In 2017 the highest percentage of positive cases were obtained from children below 1 year (37,80%), whereas in 2016 positive cases in the same age group were 23,53%. In the age group from 1 to 4 years. in 2016 the data show the presence of a pertussis outbreak with a positive samples (32,69%), while in 2017 in the same age group the rate of positive cases is 24,72%, which is comparable to data from previous years. From 2016 and 2017 data for positive cases are comparable in levels for the remaining age groups.

Conclusion: Pertussis is vaccine-preventable disease with high life-threatening potential for the newborns and infants. The data we have obtained confirm the role of adolescents and adults in maintaining circulation of the pertussis agent in the population due to a decrease in the natural immunity of the population over time. This necessitates the introduction of periodic boosters to maintain the vaccine protection of each individual and used to maintain the prophylactic effect of immunization of the population (herd immunity).

Key words: pertussis, PCR diagnosis, vaccination.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF MEASLES VIRUS IN BULGARIA (2013–2017)

St. Krumova, A. Pavlova, N. Vladimirova,
A. Kurchatova, T. Kantardjiev

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

Background: Molecular epidemiologic studies are a key component of verification of measles elimination. Genetic data in combination with standard epi-

проследяване на разпространението и идентифициране на източниците на инфекцията. От друга страна само секвенционният анализ може да послужи за разграничаване на ваксиналната реакция от инфекцията с див тип вирус.

Цел: Да се проследи циркуляцията на диви морбилни генотипове и да се докаже отсъствието на ендемични такива за страната през периода януари 2013 – декември 2017 г.

Материали/Методи: В настоящото изследване са включени 88 пациенти диагностицирани и лабораторно потвърдени с морбили през периода януари 2013 – декември 2017 г. Специализираният лабораторен надзор в НРЛ „Морбили, паротит, рубеола“, НЦЗПБ е извършен чрез изследването на поне два вида клиничен материал от всеки пациент: серумни проби (n=86), назофарингиален секрет (n=54) и урина (n=17). Използвани са серологични (индиректен ELISA тест за доказване на специфични морбилни IgM/IgG антитела в серум) и молекулярни (RT-PCR тест за доказване на вирусна РНК) методи. Извършен е секвенционен и филогенетичен анализ, посредством софтуерни програми BioEdit v7.1 и MEGA v. 5.0.

Резултати: От включените в изследването пациенти лабораторно потвърдени в НРЛ са 13/88 (14.77%) през 2013 г., 1/88 (1.14%) през 2016 г. и 74/88 (84.09%) през 2017 г. При всички изследвани серумни проби, с изключение тази от 2016 г., е доказано присъствие на първично реактивни морбилни IgM антитела. Наличие на оптимални стойности на защитни морбилни IgG антитела не е доказано при изследваните първи пациентски серумни проби. Случаите са потвърдени, чрез спазване на поне един от критериите за лабораторно потвърждаване, съгласно изискванията на СЗО. Извършеният филогенетичен анализ потвърждава вносна инфекция от три морбилни генотипа: D8, вариант *D8-Frankfurt-Main* за 2013 г., H1 за 2016 г. и B3, вариант *MVs/Dublin. IRL/08.16* и нов негодладван преди това вариант на B3 за 2017 г.

Заклучение: Комбинираният лабораторен подход при доказване на морбилна инфекция в акредитирана от СЗО лаборатория (имуноензимно и молекулярно-биологично изследване на всеки съмнителен случай), е необходимо условие за чувствителността на надзора при морбили и е основна предпоставка за успешна елиминация.

Ключови думи: морбили, генотипиране, елиминация

ЕЛИМИНАЦИЯ НА МОРБИЛИ И РУБЕОЛА В БЪЛГАРИЯ 2012–2016 Г.: РАЗВИТИЕ И ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА

Надежда Владимирова^{1,3}, Стефка Крумова^{1,3},
Анна Курчатова^{1,3}, Нина Гачева²

1. Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. Национален верификационен комитет към МЗ
3. Национален верификационен комитет към МЗ / техническа група

Въвежение: Елиминацията на морбили и рубеола е от един от най-важните приоритети на имунизационните програми в Европейския регион и следователно, в България. Всяка година членовете на българския национален верификационен комитет (НВК) и експерти от техническата група към него, базирана в НЦЗПБ се срещат, за да оценят състоянието по елиминация на морбили и рубеола в страната въз основа на документацията, предоставена от регионите и данните налични на национално ниво.

Цел: Да представим заключенията по верификацията на напредъка на елиминацията на морбили и рубеола в България, направена от Европейската Регионална верификационна комисия за елиминация на морбили

и епидемиологична информация може да се използва за проследяване на модели на предаване и идентифициране на източниците на инфекция. От друга страна само анализ на последователности може да различи ваксиналната реакция от инфекция с див тип вирус.

Аим: To determine the circulation of wild measles genotypes and absence of endemic genotypes in the period January 2013 – December 2017.

Materials and Methods: This study included 88 patients diagnosed and laboratory confirmed as measles during the period January 2013 – December 2017. The specialized laboratory monitoring in NRL “Measles, Mumps, Rubella”, NCIPD was performed by testing of at least two types of clinical material of each patient: serum samples (n = 86), nasopharyngeal swab (n = 54) and urine (n = 17). The serological (indirect ELISA test for detection of specific measles IgM/IgG antibodies in serum) and molecular (RT-PCR assay for detection of viral RNA) methods were used. A sequencing and phylogenetic analysis by using software programs BioEdit v7.1 and MEGA v. 5.0 were conducted.

Results: During the study period 13/88 (14.77%) in 2013, 1/88 (1.14%) in 2016 and 74/88 (84.09%) in 2017 were laboratory confirmed in NRL. In all tested serum samples with the exception in one of 2016, it has been demonstrated the presence of primary reactive measles IgM antibodies. The presence of optimal values protective measles IgG antibodies has not been proven in the first tested serum samples. The cases were confirmed by observing at least one of the criteria for laboratory confirmation, according to WHO requirements. The performed phylogenetic analysis confirmed imported viral infection from three measles genotypes: D8, variant *D8-Frankfurt-Main* in 2013, H1 2016 and in 2017 – B3, variant *MVs/Dublin. IRL/08.16* and a new sequence variant of B3.

Conclusion: The combined laboratory approach to detect measles in WHO accredited laboratory (immunoenzymatic and molecular assay of each suspected case) is a requisite for measles surveillance sensitivity and is crucial for successful elimination.

Key words: measles, genotyping, elimination

MEASLES AND RUBELLA ELIMINATION IN BULGARIA 2012–2016: PROGRESS AND CHALLENGES

Nadezhda Vladimirova^{1,3}, Stefka Krumova^{1,3},
Anna Kurchatova^{1,3}, Nina Gatcheva²

1. National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
2. National Verification Committee, Ministry of health
3. National Verification Committee, Ministry of health / technical group

Introduction: Eliminating measles and rubella is one of the top immunization priorities of the European Region and consequently in Bulgaria. Every year members of the Bulgarian National Verification Committee (NVC) and experts of the technical group based at NCIPD meet to evaluate the status of measles and rubella elimination in the country based on documentation submitted by each region and data available at national level.

Aim: to present the conclusions on verifying progress of measles and rubella elimination in Bulgaria made by the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC) for the period 2012–2016 and to define challenges to the process based on some data derived from the Annual status updates (ASU).

и рубеола (РВК) за периода 2012–2016 г. и да определим предизвикателствата към процеса въз основа на данни, извадени от Актуалния годишен статус (АГС).

Материали и методи: Прегледани са АГС за морбили и рубеола в България за 5-годишен период, както и епидемиологичната информация свързана с тях. Докладите на РВК, издадени от СЗО за 2010–2012, 2014 и 2015 г. и официалното писмо на СЗО за 2016 г. също са разгледани.

Резултати: Тези доклади включват информация за епидемиологията на морбили и рубеола, молекулярна епидемиология, анализ на изпълнението на имунизационната програма, качеството на надзора и промените, които може да са възникнали след последния такъв доклад по състоянието на елиминация на морбили и рубеола, представен от НВК. Установено е, че чувствителността на надзора при морбили и рубеола е неприемливо ниска. Имунизационният обхват с първи и втори прием морбили – рубеола ваксина (МРВ) е над 95%. През 2016 г. обхватът с МРВ1 или МРВ2 е <90% в 15 от 28-те региона.

Заклучение: Елиминацията на морбили се поддържа в страната. За 2016 г. е прекъснато разпространението на рубеола за период от 12 месеца. РВК препоръчва да се поддържа прекъснатото разпространение на морбили и да се постигне прекъсване разпространението на рубеола. РВК приканва националните здравни власти да проведат целево ретроспективно проучване за синдрома на вродената рубеола и да подобрят нивото на вирусната детекция на рубеола. Подобряването на имунизационния обхват с първи и втори прием на ваксина срещу морбили и рубеола е друга препоръка на РВК.

Ключови думи: морбили, рубеола, елиминация

Materials and methods: ASU for measles and rubella in Bulgaria for 5 year period were reviewed as well as supporting epidemiological documentation. Reports of the RVC issued by WHO for 2010–2012, 2014 and 2015 and official letter of WHO for 2016 were reviewed too.

Results: These reports include information on measles and rubella epidemiology, molecular epidemiology, the analysis of immunization programme performance, the quality of surveillance, and changes that may have occurred since the last report submitted by the NVC on measles and rubella elimination status. It was found that measles and rubella surveillance sensitivity rate is unacceptable low. Immunization coverage with first and second doses of measles and rubella containing vaccine (MRCV) is below 95%. MRCV1 or MRCV2 coverage is <90% in 15 out of 28 regions for 2016.

Conclusion: Measles elimination has been sustained in the country. It is concluded that for 2016, rubella transmission is interrupted for the period of 12 months. The RVC commends to sustain the interruption of measles transmission and to achieve interruption of rubella transmission. RVC invites national health authorities to conducting a targeted retrospective survey of congenital rubella syndrome and to improve the rate of viral detection of rubella.

Improving immunization coverage with first and second dose of measles and rubella containing vaccines is another recommendation of RVC.

Key words: measles, rubella, elimination

INVITED SPEAKER'S LECTURE

THE ROLE OF CLINICAL LABORATORY IN ANTIBIOTIC STEWARDSHIP ACTIVITIES

Prof. Athanasios Tsakris

Head, Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Antimicrobial resistance is a growing public health problem and by 2050 multidrug-resistant infections may become the leading cause of death worldwide. Consumption of antibiotics is probably the most important cause for the spread of antimicrobial resistance. Moreover, poor quality of health services, incorrect antimicrobial treatment practices and inadequate diagnostic testing for early detection of bacterial pathogens may contribute to its spread. Therefore, effective hospital and primary care antimicrobial stewardship programs based on early and accurate pathogen detection may deliver a measurable impact in clinical practice. The harmonized introduction of innovative molecular technologies along with traditional phenotypic methods plays a significant role in early pathogen diagnosis and accurate reporting of antimicrobial susceptibility testing. The implementation of molecular antibiogram can also detect resistance genes and predict clinical resistance. In addition, syndromic diagnosis using multiplex *molecular* assays or pathogen class-specific multiplex *molecular* assays is a key element for appropriate use of antimicrobials. All these approaches may provide relevant information for personalized antimicrobial treatment, suitable introduction of new broad-spectrum antibiotics and infection control activities. Inspiration should be given to younger scientists and those involved in infection control activities to appreciate the significant role of clinical laboratory in diagnostic and antibiotic stewardship.

Инфекции, причинявани от храни и води

НОРОВИРУСНИТЕ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ В ПЕРИОДА 2014–2017 Г.

Ася Стоянова*, Любомира Николаева-Гломб

НРЛ „Ентеровируси“, Отдел Вирусология, НЦЗПБ, София

Цел. Макар и леки като клинично протичане, доказването на норовирусните инфекции е от голямо значение за различни отрасли на обществения живот. У нас тези инфекции не подлежат на задължително регистриране. Целта на проучването е да се установи етиологичната роля на норовирусите при пациенти с гастроинтестинални оплаквания за периода 2014–2017 г.

Материали/методи. Изследвани са 493 клинични проби – 491 фекални и 2 повърнати материали. 17 от пробите са на амбулаторни пациенти, а 456 – на хоспитализирани. 20 проби са на контактни лица при установен епидемичен взрив.

Използваните методи са RT-PCR, секвениране и филогенетичен анализ.

Резултати. Най-висока честота е установена в рисковите групи – над 60 и под 5 г.

Филогенетичният анализ показва неголямо разнообразие на норовирусните генотипове, но през различните години се установява замяна на един доминиращ генотип с друг. По полимеразния ген са установени следните генотипове: през 2014 г. – GII. P2 и GII. Pe; през следващата 2015 г. – доминиращият GII. P17, GII. P15, GII. P7 и GII. Pe; през 2016 г. доминира отново GII. P17, в единична проба е доказан GII. P21, а по капсидния ген – GII.17, GII.6 и GII.15 за 2015 г. и GII.17 и GII.13 през 2016.

Заклучение. Честотата на доказване на норовируси сред изследваните в НЦЗПБ проби за 4-годишния период е около 20%. Установени са две рекомбинантни форми, срещащи се у нас за първи път; глобално доминиращият генотип GII. P17 измества доминиращия дотогава GII.4. Големият процент генетично сходство между българските щамове от даден генотип и установяването на ко-циркуляция на различни генотипове показва наличие на няколко източника на инфекция. А установяването на тези генотипови комбинации в няколко от изследваните лица указва за тяхното епидемично разпространение. Данните показват, че е необходимо целенасочено търсене на норовируси при пациенти със стомашно-чревни разстройства.

Ключови думи: норовирус, разпространение, диария

NOROVIRUS INFECTIONS IN BULGARIA IN THE PERIOD 2014–2017

Asya Stoyanova*, Lubomira Nikolaeva-Glomb

NRL “Enteroviruses”, Department of Virology, NCIPD, Sofia

Objective. Although mild as a clinical course norovirus infections are of major importance for public life. In this country, norovirus infections are not a subject to mandatory registration. The aim of the present study is to establish the etiological role of noroviruses in patients with gastrointestinal complaints for the period 2014–2017.

Materials/methods. 493 clinical specimens were investigated – 491 faecal and 2 vomited materials. 17 of the samples were outpatients and 456 were hospitalized. 20 samples were from contact individuals in an established epidemic outbreak.

The methods used are RT-PCR, sequencing and phylogenetic analysis.

Results. The highest frequency is found in the risk groups over 60 and under 5 years of age.

The phylogenetic analysis reveals a minor variety of genotypes, but in the different years there is a substitution of one dominant genotype by another. The following genotypes were found according to the polymerase gene: in 2014 – GII. P2 and GII. Pe; in the next 2015, the dominant GII. P17, GII. P15, GII. P7 and GII. Pe; in 2016 GII. P17 again dominated, GII. P21 is shown in a single sample, and according to the capsid gene – GII.17, GII.6 and GII.15 for 2015, and GII.17 and GII.13 for 2016.

Conclusion. The frequency of noroviruses among samples tested at the NCIPD for the 4 year period is about 20%. Two recombinant forms are detected for the first time in this country; in 2015 the globally dominant genotype GII. P17 replaces the predominant until then GII.4. The high percentage of genetic similarity between the Bulgarian strains of a given genotype and the establishment of co-circulation of different genotypes indicates the presence of several sources of infection. And the identification of these genotypic combinations in several of the subjects surveyed indicates their epidemic spread. Data suggest that a purposeful search for noroviruses is required in patients with gastrointestinal disorders.

Key words: Norovirus, spread, diarrhea

АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *CAMPYLOBACTER SPP.* ПРИ ХОСПИТАЛИЗИРАНИ БОЛНИ С ДИАРИЕН СИНДРОМ

М. Павлова¹, В. Велев², Е. Добрева¹, И. Н. Иванов¹,
И. Томова², А. Мангърров², М. Йонева³, Т. Кантарджиев¹

1. Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“, Медицински университет, София
3. Аджибадем Сити Клиник Болница Токуга

Campylobacter spp. са най-често изолираните бактериални причинители на остри диарии в света, особено при деца до 7 годишна възраст.

Материали и методи: За календарната 2017 г. са проучени 260 болни хоспитализирани с диарийен синдром. От тях 66 (25.38%) са положителни за *Campylobacter spp.* по имунохроматографски тест верифициран с посявка и Multiplex PCR. Чрез дисково-дифузионен метод клиничните изолати са изследвани за чувствителност срещу 5 антимикробни средства.

Резултати: От изолираните проби с *Campylobacter* 60 (91%) са *C. jejuni* и 6 (9%) *C. coli*. Всички изолати на *C. jejuni/ coli* са чувствителни на Азитромицин (AZI), както и всички изолати на *C. coli* са чувствителни на Кларитромицин (CLA) и Еритромицин (ER). Три (5%) изолата на *C. jejuni* са резистентни на CLA и 7 (11.6%) на ER. На Ципрофлоксацин (CIP) са резистентни 35 (58.3%) от изолатите на *C. jejuni* и 2 (33.3%) на *C. coli*; При Тетрациклина (TE) резистентността е съответно 23 (38.3%) за *C. jejuni* и 1 (16.6%) за *C. coli*. При *C. jejuni* имаше 3 (5%) мултирезистентни изолата към CIP-CL-ER-TE едновременно; също 3 (5%) към CL-ER-CIP и 7 (11.6%) към TE- ER. При *C. coli* имаше 1 (16.6%) изолат резистентен към TE- ER.

Заклучение: Наблюдава се повишена резистентност на *Campylobacter spp.* към най-често използваните в практиката антимикробни препарати. Особено притеснителна е високата резистентност по отношение на Ципрофлоксацин, както и все по-често срещаните се мултирезистентни клинични изолати.

Ключови думи: *Campylobacter*, резистентност, Ципрофлоксацин, Еритромицин

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF CLINICAL ISOLATES CAMPYLOBACTER SPP. IN HOSPITALIZED PATIENTS WITH DIARRHEA

М. Pavlova¹, V. Velev², E. Dobрева¹, I. N. Ivanov¹,
I. Tomova², A. Mangarov², M. Joneva³, T. Kantardjiev¹

1. National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
2. Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Medical University of Sofia
3. Acibadem City Clinic Hospital Tokuda

Campylobacter spp. are the most commonly isolated bacterial agents of acute diarrhea in the world, especially in children under 7 years of age.

Materials and methods: For the calendar year 2017, 260 patients were hospitalized with diarrhea syndrome. Of these, 66 (25.38%) are positive for *Campylobacter spp.* by immunochromatographic assay verified by culture and Multiplex PCR. By means of a disc-diffusion method, clinical isolates were tested for susceptibility against 5 antimicrobials agents.

Results: The isolates of *Campylobacter* 60 (91%) are *C. jejuni* and 6 (9%) *C. coli*. All *C. jejuni / coli* isolates are Azitromycin (AZI) sensitive, and all *C. coli* isolates are susceptible to Clarithromycin (CLA) and Erythromycin (ER). Three (5%) *C. jejuni* isolates are resistant to CLA and 7 (11.6%) to ER. Ciprofloxacin (CIP) is resistant to 35 (58.3%) of *C. jejuni* isolates and 2 (33.3%) of *C. coli*; For Tetracycline (TE) the resistance is 23 (38.3%) for *C. jejuni* and 1 (16.6%) for *C. coli*, respectively. In *C. jejuni* there were 3 (5%) multi-resistant isolates to CIP-CL-ER-TE simultaneously; also 3 (5%) to CL-ER-CIP and 7 (11.6%) to TEE-ER. In *C. coli* there was 1 (16.6%) TE-ER-resistant isolate.

Conclusion: Increased resistance to *Campylobacter spp.* to the most commonly used antimicrobial preparations. Particularly worrying is the high resistance to ciprofloxacin as well as the increasingly common multi-drug resistant isolates.

Key words: *Campylobacter*, resistance, Ciprofloxacin, Erythromycin

**ОЦЕНКА ПРИЛОЖЕНИЕТО НА БЪРЗИ
ИМУНОХРОМАТОГРАФСКИ ТЕСТОВЕ
ЗА ДИАГНОСТИКА НА *CRYPTOSPORIDIUM
PARVUM*, *GIARDIA LAMBLIA* И *ENTAMOЕВА
HISTOLYTICA/DISPAR* СРЕД РИСКОВИ
ГРУПИ ЛИЦА, ИЗСЛЕДВАНИ
ЗА *HELICOBACTER PYLORI*-ИНФЕКЦИЯ**

Борислава Чакърова¹, Ирена Младенова²,
Олга Грекова², Иван Димов³, Александър Любимов⁴

1. Катедра „Микробиология и паразитология“, Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора, България,
2. Катедра „Хигиена, епидемиология и инфекциозни болести“, Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора, България,
3. Катедра „Анатомия“, Педиатричен Медицински университет, Санкт-Петербург, Русия,
4. Катедра «Инфекциозни болести и епидемиология», Педиатричен Медицински университет, Санкт-Петербург, Русия

Цел на изследването е да се извърши скринингова на копродиагностиката сред лица в рисковни групи, като се използват морфологични и имунологични тестове. Изследвани и проучени за *Helicobacter pylori*-инфекция в копропроба са общо 80 лица, разпределени в четири групи: (1) Оперирани пациенти по повод *Carcinoma ventriculi*, подложени на имуносупресивна химиотерапия, n=15; (2) Роднините им от първа съребрена линия, положителни за *H. pylori*-антиген, n=25; (3) Роднините от първа съребрена линия, отрицателни за *H. pylori*, n=25; (4) Контролна група, n=16. Приложени са оцветителни морфологични и бързи имунохроматографски тестове *in vitro* диагностика за качествено определяне на *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* и *Entamoeba histolytica/dispar* във фекална проба.

От проучените 14 (17,5%) са положителни за ентеропаразити. Копроантигени на *C. parvum* са открити при 2 (2,50%) пациенти, на *G. lamblia* – при 8 (10,00%), на *E. histolytica/dispar* – при 1 (1,25%). Морфодиагностично, в 3 (3,75%) проби са идентифицирани цисти на *B. hominis*, но не и цисти или трофозоити на други ентеропаразити. Най-опаразитени с ентеропаразити е групата на роднините, инфектирани с *H. pylori* – 9 (36,0%). Сред *H. pylori*-отрицателните роднини, един е с носителство на *B. hominis*. Най-голям е относителният дял на инфектираните с *H. pylori* роднини, опаразитени с *G. lamblia* – 10,0%, а най-малък – с *E. histolytica/dispar* – 1,25%.

При оперираните пациенти, 9 (60,00%) са положителни за *H. pylori*. От тях нито един не е положителен за чревни паразити, а един, отрицателен за *H. pylori* е положителен за *B. hominis*. При имуносупресивните пациенти няма установени данни за клинично остро протичаща криптоспоридиоза и не са открити копроантигени срещу *C. parvum*.

Паралелното провеждане на два диагностични метода – морфологичен и имунологичен води до оптимизация на идентификацията на чревните паразити. Бързите имунохроматографски тестове имат по-висок диагностичен капацитет и в пробата може да бъде отчетено и малко количество антиген, но са чувствителни само към определен набор паразитни агенти. Морфодиагностичните възможности на светлинната микроскопия са по-големи в това отношение – чрез нея се визуализират и други паразити.

Ключови думи: ентеропаразити, *H. pylori*-инфекция, морфодиагностика, бързи имунохроматографски тестове

**ESTIMATE OF THE USE
OF RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC
TESTS FOR DIAGNOSIS OF *CRYPTOSPORIDIUM
PARVUM*, *GIARDIA LAMBLIA*,
ENTAMOЕВА HISTOLYTICA/DISPAR AMONG
RISK GROUPS INVESTIGATED
FOR *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION**

Borislava Chakarova¹, Irena Mladenova²,
Olga Grekova², Ivan Dimov³, Alexander Lyubimov⁴

1. Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Trakian University – Stara Zagora, Bulgaria
2. Department of Hygiene, Epidemiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Trakian University – Stara Zagora, Bulgaria
3. Department of Anatomy, St. Petersburg Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia
4. Department of Infectious Diseases and Epidemiology, St. Petersburg, Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia

The aim of the study was to perform screening coprodiagnostics among persons in risk groups, using morphological and immunological tests. In total 80 persons divided into four groups have been investigated for *Helicobacter pylori* infection: (1) operated patients with gastric carcinoma receiving immunosuppressive chemotherapy, n=15; (2) their first degree relatives who are positive for *H. pylori* antigen, n=25; (3) first degree relatives who are negative for *H. pylori*, n=25; (4) control group, n=16. Morphological and immunochromatographic rapid assay for the qualitative determination of *Cryptosporidium parvum*, and/or *Giardia lamblia* and/or *Entamoeba histolytica/dispar* in stool samples.

From investigated, 14 (17.5%) are positive for enteroparasites. Coproantigens of *C. parvum* have been found in 2 (2.50%) patients, *G. lamblia* – in 8 (10.00%), *E. histolytica/dispar* – in 1 (1.25%). In 3 (3.75%) samples by morphological tests, were identified *B. hominis* cyst, but not cysts or trophozoites of other enteroparasites. In the relatives, infected with *H. pylori* is the highest proportion of enteroparasites-positive patients – 9 (36.0%). In the *H. pylori*-negative relatives, one was a carrier of *B. hominis*. The highest is the proportion of individuals infected with *G. intestinalis* – 10.0% of the *H. pylori*-positive relatives, and the smallest – with *E. histolytica/dispar* – 1.25%. From the operated patients *H. pylori* – positive are 9 (60.00%). None of them is positive for enteroparasites, and one that is negative for *H. pylori* is positive for *B. hominis*. In immunocompromised patients, there was no evidence of clinically acute cryptosporidiosis, and no coproantigens were found for *C. parvum*.

Parallel carrying out two diagnostic methods – morphological and immunological – leads to optimization of identification of enteroparasites. Rapid immunochromatographic tests have a higher diagnostic ability, and a small amount of antigen can be detected in the sample, but they are susceptible only to a certain set of parasitic agents. In this regard morphodiagnostic possibilities of light microscopy are higher; it is possible to see also other parasites.

Key words: enteroparasites, *H. pylori* infection, morphodiagnosis, rapid immunochromatographic tests

Векторно-предавани инфекции.
Инфекции в хирургията и педиатрията.
Инфекции, свързани с медицинското обслужване
и при имунодефицитни състояния.

ПРОУЧВАНЕ С ¹³C УРЕЕН
ДИХАТЕЛЕН ТЕСТ НА *HELICOBACTER PYLORI*
ИНФЕКЦИЯТА ПРИ ПЕДИАТРИЧНИ ПАЦИЕНТИ

Людмила Боянова¹, Радка Куманова²,
Петьо Хаджийски³, Галина Гергова¹,
Румяна Марковска¹, Даниел Йорданов¹, Иван Митов¹

1. Катедра медицинска микробиология, МУ-София
2. Медицински център „Детско здраве“, София
3. Катедра педиатрия, Университетска педиатрична болница, МУ-София

Цел: Ерадикацията на *Helicobacter pylori* при децата може рязко да намали доживотния риск от тежки гастроудоденални заболявания в по-късна възраст. Целта на настоящото проучване беше да определи честотата на *H. pylori* инфекцията при педиатрични пациенти.

Материали/методи: Бяха изследвани 134 деца, от които 33 лекувани посредством ¹³C уреен дихателен тест (UBT).

Резултати: Общата честота на *H. pylori* инфекцията беше 41.8%. UBT показва положителен резултат по-често (52.7%) при нелекувани деца с остър/хроничен гастрит или с дуоденална язва, в сравнение с децата с гастроэзофагеална рефлуксна болест или други заболявания (18.5%). Двете най-малки деца (съответно на 3 и на 4 години) бяха положителни. Над 1/3 от лекуваните пациенти (36.4%) бяха *H. pylori* положителни. Повечето от децата употребявали прополис и/или лактобацили един до няколко дни преди изследването бяха отрицателни с UBT.

Заклучение: Инфекцията с *H. pylori* беше често при българските деца с гастроудоденална симптоматика и се придобива в ранна възраст (3 години). Необходимостта да се избягва употребата на прополис и/или пробиотици поне няколко дни преди UBT изследването следва да бъде допълнително проучена. Ерадикационният успех е субоптимален и е необходима неговата оптимизация. Препоръчва се насочена терапия съобразена с чувствителността на щамове, особено след като вече е имало неуспех при опитите за ерадикация.

Ключови думи: *Helicobacter pylori*, инфекция, деца

¹³C UREA BREATH TEST EVALUATION
OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION
IN BULGARIAN PEDIATRIC PATIENTS

Lyudmila Boyanova¹, Radka Koumanova²,
Petyo Hadzhiyski³, Galina Gergova¹,
Rumyana Markovska¹, Daniel Yordanov¹, Ivan Mitov¹

1. Department of Medical Microbiology, Medical University of Sofia, Zdrave street 2, 1431 Sofia, Bulgaria
2. Medical centre “Child health”, Sofia, Bulgaria
3. Department of Pediatrics, University Pediatric Hospital, Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria

Aim: *Helicobacter pylori* eradication in children can sharply reduce the life-long risks for severe gastroduodenal diseases in adulthood. The aim of this study was to assess *H. pylori* infection prevalence in pediatric patients.

Materials/Methods: Totally, 134 children, of whom 33 treated patients were evaluated by ¹³C urea breath test (UBT).

Results: Overall *H. pylori* infection prevalence was 41.8%. The UBT positivity was higher (52.7%) in untreated children with acute/chronic gastritis and duodenal ulcer compared with those with gastroesophageal reflux disease or other diseases (18.5%). The two youngest children aged three and four years were positive. Among the treated pediatric patients, more than 1/3 (36.4%) were *H. pylori* positive. Most of the children who had used propolis or lactobacilli, or both of them one to several days before the test were UBT negative.

Conclusion: *H. pylori* infection was frequent in Bulgarian symptomatic children and was acquired as early as at the age of 3 years. The need for avoiding propolis and probiotic use at least several days before the UBT test should be further evaluated. The eradication success was suboptimal and its optimization is required. A tailored therapy according to strain susceptibility testing results is recommended, especially after eradication failures.

Key words: *Helicobacter pylori*, infection, children

ФЕНОТИПНИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ ПРИ *ENTEROCOCCUS SPP.* ОТ КЛИНИЧНИ МАТЕРИАЛИ

Йорданова Р¹, Г. Лазарова^{1,2}, Д. Руканова²,
К. Рачкова², Х. Дженева², М. Мурджева³, М. Среждкова⁴

1. УМБАЛ „С. Киркович“ АД, Стара Загора, лаб. „Микробиология“
2. ТУ-МФ, Стара Загора, к-ра „Микробиология“
3. МУ, Пловдив, к-ра „Микробиология“
4. М, Плевен, к-ра „Микробиология“

РЕЗЮМЕ

Цел: Сравнително проучване на факторите на вирулентност при щамове *Enterococcus spp.* изолирани от клинични материали и носители.

Материали и методи: Анализирани са данни от общо 121 щам *Enterococcus spp.*, изолирани от клинични материали от Университетски болници в Ст. Загора, Пловдив и Плевен (84 щам) и от носители (37 щам). От клиничните материали 71 щам (85%) принадлежат към *E. faecalis* и 13 щам (15%) – към *E. faecium*. Изолираните щамове са от: урини и уретрални катетри – 43 (51%), раневи секрети и пунктати – 27 (32%) и хемокултури – 14 (17%).

Антибиотичната резистентност на изолатите е тествана с DDM и определяне на MIC, съгласно изискванията на EUCAST (2017).

За определяне на факторите на вирулентност са използвани фенотипни методи: цитоллизин (хемолизин, Todd-Hewitt agar с 5% човешка кръв), желатиназа (Todd-Hewitt agar с 30 g/l желатин) и образуване на биофилм (Tube-method-Christensen, Congo red agar method).

Резултати: От общо 84 изолата *Enterococcus spp.* от клинични материали, хемолизин положителни са 34 щам (40,5%); желатиназа положителни са 30 щам (35,7%), като 12 щам са били положителни едновременно за двата теста (14,3%).

Изолатите *Enterococcus spp.* от фецес – 37 щам не показват продукция на хемолизин и желатиназа.

Заклучение: Наличието на хемолизин, желатиназа и биофилм продукция, единствено при *Enterococcus spp.* щамове от клинични материали, и отсъствието им при щамове от носители (фецес) дава основание да се предположи значението на тези токсини и ензими – QS (*Quorum Sensing*) детерминирани като фактори на вирулентност и антибиотична резистентност.

Ключови думи: *Enterococcus spp.*, QS (*Quorum Sensing*), хемолизин, желатиназа, биофилм

ЕПИДЕМИЯТА ОТ ЖЪЛТА ТРЕСКА И НАШИТЕ ДИАГНОСТИЧНИ ВЪЗМОЖНОСТИ

И. Христова, И. Трифонова, Е. Панайотова, Т. Гладнишка

НРЛ „Векторно-предавани инфекции“, НЦЗПБ

Вирусът, причиняващ жълта треска (YFV) произлиза от Африка и се разпространява при търговията с роби някъде около 1650 г., първоначално на остров Барбадос и Карибските острови. По-късно големи епидемии са описани в Панама при прокопаването на Панамския канал и сред американските войски в Куба в края на 19 век, което довежда до насочени проучвания от г-р Walter Reed, който установява връзката с *Aedes aegypti*. В Аф-

PHENOTYPIC DETECTION METHODS OF VIRULENCE FACTORS IN *ENTEROCOCCUS SPP.* FROM CLINICAL MATERIALS

Yordanova R¹, G. Lazarova^{1,2}, D. Rukanova²,
K. Rachkova², H. Jeneva², M. Murdzheva³, M. Sredkova⁴

1. UMBAL “S. Kirkovic AD, Stara Zagora, “Microbiology Lab. “
2. TU-MF, Stara Zagora, Dept. “Microbiology”
3. MU, Plovdiv, Dept. “Microbiology”
4. M, Pleven, Dept. “Microbiology”

ABSTRACT

Purpose: A comparative study of the virulence factors in strains of *Enterococcus spp.* isolated from clinical materials and carriers.

Materials and Methods: Data from a total of 121 strains of *Enterococcus spp.*, isolated from clinical materials from University Hospitals St. Zagora, Plovdiv and Pleven (84 strains) and from carriers (37 strains) were analyzed. 71 strains (85%) of clinical materials belong to *E. faecalis* and 13 strains (15%) – to *E. faecium*. Isolated strains are mostly from: urine and urethral catheters – 43 (51%), wound swabs and punctates – 27 (32%) and hemocultures – 14 (17%).

The antibiotic resistance patterns of *Enterococcus spp.* is tested with DDM and MIC determination, as required by EUCAST (2017).

For determination of virulence factors, the following phenotypic methods were used: cytolysin (hemolysin, Todd-Hewitt agar with 5% human blood), gelatinase (Todd-Hewitt agar with 30 g / l gelatin) and biofilm formation (Tube-method- Christensen, red agar method).

Results: Out of a total 84 *Enterococcus spp.* isolates from clinical materials, **haemolysin** positive were 34 strains (40.5%); **gelatinase** positive were 30 strains (35.7%), and 12 strains were positive for both tests (14.3%).

All isolates *Enterococcus spp.* from carriers (37 strains) were **hemolysin** and **gelatinase** negative.

Conclusion: The presence of hemolysin, gelatinase and biofilm production only in *Enterococcus spp.* from clinical materials and their absence in carrier, s strains (feces) suggests the importance of these toxins and enzymes, **QS (Quorum Sensing)** determined as factors of virulence and antibiotic resistance.

Key words: *Enterococcus spp.*, Virulence factors, QS (*Quorum Sensing*), **hemolysin, gelatinase, biofilm**

YELLOW FEVER OUTBREAK AND OUR DIAGNOSTIC CAPACITY

I. Christova, I. Trifonova, E. Panayotova, T. Gladnishka

NRL “Vector-borne pathogens”, NCIPD

Yellow fever virus (YFV) originated in Africa and spread in slave trade somewhere around 1650, originally on the island of Barbados and the Caribbean. Later large epidemics were reported in Panama when digging the Panama Canal and among the American troops in Cuba at the end of the 19th century, which led to targeted studies by Dr. Walter Reed, who established the relationship with *Aedes aegypti*. In Africa, yellow fever periodically causes epidemics. Despite the

рика жълтата треска периодично причинява епидемии. Въпреки широкото разпространение на *Aedes aegypti* в Азия, там жълтата треска никога не е регистрирана. Периодично се появяват епидемични взривове в Бразилия – средно през 3 до 7 години – като следствие от циклични епизоотии в приматите, за които се съди по смъртността сред маймуните. Понастоящем в Бразилия и съседните ѝ страни от Южна Америка се отчита най-голямата от 50 години насам епидемия от жълтата треска. Заболяването протича тежко при немалък процент от случаите (15–25%) и при тях леталитетът е до 50%. Две отделни геногрупи са вирусите, причиняващи жълтата треска, с множество линии във всяка от тях. В средата на 90-те години на миналия век настъпва много голяма промяна в генотип 1 с появата на т. нар. modern-lineage, която бързо измества предишните линии и на практика след 1996 г. се изолират само вируси от тази линия в Америка. Ваксината срещу жълтата треска е жив атенюиран вирус, която е една от най-ефикасните и безопасни ваксини, произвеждани някога. В Националната референтна лаборатория към НЦЗПБ доказваме вирусна РНК в ранния стадий с RT-PCR в кръвта на болния, а при изявена вече симптоматика откриваме специфични IgM и IgG антитела с имунофлуоресцентен тест. Клинично е трудно да се диагностицира заболяването, особено в ранния неусложнен стадий, когато лесно може да се обърка с хепатит, малария, денга, лептоспироза и дори отравяне.

АНАЛИЗ НА ПАРАЗИТНАТА ЗАБОЛЯЕМОСТ В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2017 Г.

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

Отдел „Паразитология и тропическа медицина“
Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗ-ПБ), София

Състоянието на паразитните болести в нашата страна се анализира всяка година поради продължителното хронично протичане на много от тях, засягането на различни органи и системи и честото инвазиране на децата от организирани детски колективи. Цел на настоящия доклад е представяне на екстензивността и заболяемостта при паразитозите през 2017 г. Като материали са използвани данните от годишните отчети на паразитологичните структури от РЗИ, ЛЗ, МУ и НЦЗПБ. Общо през 2017 г. са изследвани 627362 лица, от които 1,25% са диагностицирани като положителни за различни паразитози. От хелминтозоозите с най-голямо медико-социално значение за България са ехинококозата и трихинелозата. През 2017 г. са регистрирани 218 случая на ехинококоза (заболяемост – 3,06‰) и 6 епидемични взрива на трихинелоза в няколко области на страната с над 50 заболели лица. При гео-хелминтозоите не се наблюдава особена динамика в броя на регистрираните случаи. Съобщени са 706 лица с аскаридоза и 109 с трихоцефалоза, която се установява предимно в различни по своя характер социални заведения за деца и възрастни. При контактните паразитози ентеробиозата запазва своето място на най-масова паразитоза в страната, особено в организирани детски колективи. От опортюнистичните паразитни болести за токсоплазмоза и бластоцистоза се изследват най-много suspectни пациенти, но бавно се увеличават и установените с криптоспоририоза. Вносна малария през годината е диагностицирана при 8 души, като 5 от тях са български граждани и 3 са чужденци. За снижаване на заболяемостта от паразитози е необходимо запазване и укрепване на мрежата за надзор и контрол и особено подготовка и квалификация на специалисти по медицинска паразитология.

Ключови думи: паразитози, екстензивност, зоозитози

widespread of *Aedes aegypti* in Asia, yellow fever has never been registered. Periodic outbreaks occur in Brazil – in average 3–7 years – as a consequence of cyclic epizootics in primates detected by monkey mortality. The largest yellow fever epidemic is currently reported in Brazil and its neighbors in South America. The disease is severe in a large percentage of cases (15–25%) and the lethality in severe cases is up to 50%. Two distinct genotypes of viruses with multiple lineages in each of them cause yellow fever. In mid-1990s, a very large change in genotype 1 occurred, followed by emergence of the so-called “modern-lineage” that quickly shifts the previous lineages, and in practice since 1996 only viruses from this lineage in America are isolated. Yellow fever vaccine is a live attenuated virus, which is one of the most efficacious and safe vaccines ever produced. In the National Reference Laboratory at NCIPD, we detect viral RNA at early stage with RT-PCR in blood sample from patients, and in case of already manifested symptoms, we detect specific IgM and IgG antibodies by immunofluorescence test. It is clinically difficult to diagnose the disease, especially in the early uncomplicated stage, when it can easily be confused with hepatitis, malaria, dengue, leptospirosis and even poisoning.

ANALYSIS OF THE PARASITIC MORBIDITY IN BULGARIA IN 2017

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

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

The state of parasitic diseases in our country is carried out annually due to prolonged chronic course of many of them, the involvement of various organs and systems and the frequent invasion of children by organized children's groups. The purpose of this report was to present prevalence and incidence of parasitic diseases in 2017. Annual reports from parasitological structures in private diagnostic laboratories, Regional Health Inspections (RHI), Medical Universities (MU) and NCIPD were used as materials. In 2017 were tested a total of 627 362 persons, of whom 1.25% were diagnosed as positive for various parasitic diseases. From **helminthozoonoses** with the greatest medical and social importance for Bulgaria are echinococcosis and trichinellosis. In 2017 there were registered 218 cases of hydatid disease (morbidity – 3.06‰) and 6 outbreaks of trichinellosis in several areas of the country with more than 50 diseased persons. In **soil transmitted** parasitoses there was no particular dynamics in the number of registered cases. With ascariasis were reported 706 persons and 109 with trichuriasis, which was established in recent years mainly in institutions for children deprived of parental care and adults with mental disorders. With regard to the **communicable diseases** enterobiosis retained its place of the most common parasitic disease in the country, especially in organized children's collectives. From **opportunistic parasitic diseases** most suspect patients were examined for toxoplasmosis and blastocytosis, but diagnosed with cryptosporidiosis were also slowly increased. During the year with imported **malaria** were diagnosed 8 people, 5 of whom Bulgarian citizens and 3 were foreigners. In order to reduce the parasitic morbidity, it is necessary to preserve and strengthen the surveillance and control network and especially the training and qualification of specialists in medical parasitology.

Key words: parasitoses, prevalence, zoonoses

МИКРОБИОМЕН ПРОФИЛ НА КРЪВТА ПРИ ЛИЦА С ХРОНИЧНИ ИЛИ ЛАТЕНТНИ ИНФЕКЦИИ

С. Панайотов¹, Г. Филевски², М. Екуестре³,
М. Амикосанте⁴, Е. Николова⁵, Р. Калфин⁶

1. Национален център по заразни и паразитни болести – София 1504
2. Първа градска болница – София 1000
3. Централен институт по здравеопазване – Рим, Италия
4. Римски университет „Тор Вергата“ – Рим, Италия
5. Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН, София 1313
6. Институт по невробиология – БАН, София 1313

Множеството хронични заболявания с неизяснена етиология вероятно се дължат на отклонения в нормалния микробиом от този на здрави лица. Латентните инфекции и хронични заболявания могат да се обострят в състояние на стрес, отслабване на имунитета и стареене на организма. В повечето случаи те се доказват имунологично, но микробиологично не се потвърждават. Усилията са насочени към търсене на условия за културелно реанимиране (resuscitation) на латентните бактерии.

Цел на нашето изследване бе да разработим подход за изследване на кръвния микробиом при хронични заболявания и латентни инфекции.

Материали и методи: Бяха изследвани 7 видимо здрави лица, но с доказани хронични заболявания – хронична хипертония, Fe-зависима анемия, хроничен ставен ревматизъм, дефицит на витамин B12, полиноза и прахова алергия, субакутен тиреоидит, предиабет. Изследвахме по 9 мл венозна кръв, стерилно взета с Вакутейнер K₃EDTA. Три милилитра кръв бяха културелно реанимирани в течна среда BHI за 72 часа. ДНК бе изолирана от култивираната и некултивирана кръв. Приложихме таргетно секвениране за маркери 16S rPHK и ITS2 със система IlluminaMiSeq. Получените секвенци бяха таксономично определени с базите данни SILVA и Unite.

Резултати: Сред култивираните и некултивираните проби идентифицирахме голямо биоразнообразие от OTU (Operational Taxonomic Unit – оперативна таксономична единица) отнасящи се към 6 типа (phylum) и 15 бактериални разреда (ordo), като преобладаваха родове от тип *Proteobacteria*. Сред некултивираните проби *Proteobacteria* съставляваха 97%, а *Firmicutes* 2%, докато сред култивираните проби *Proteobacteria* съставляваха 69%, *Firmicutes* 18%, *Actinobacteria* 12% и *Bacteroidetes* 1%. Сред доказаните гъбички преобладават типове (phylum) *Ascomycota* и *Basidiomycota*.

Заклучение: Успешно бе приложен метод за тотално реанимиране на латентни микробни видове в кръвта на лица с предполагаема инфекция. Доказахме, че в кръвта на предполагаемо здрави лица циркулират множество микробни видове.

Ключови думи: биоразнообразие, кръвен микробиом, хронични и латентни инфекции

Благодарности: Проектът е финансиран от Фонд „НИ“ с договор ДН-01–4/16.12.2016

THE BLOOD MICROBIOME IN PATIENTS WITH CHRONIC OR LATENT INFECTION

S. Panaiotov¹, G. Filevski², M. Equestre³,
M. Amicosante⁴, E. Nikolova⁵, R. Kalfin⁶

1. Natl. Ctr. of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia -1504, Bulgaria
2. Town's Hospital, Sofia -1000, Bulgaria
3. Istituto Superiore di Sanità, Rome 00161, Italy
4. University of Rome 'Tor Vergata', Rome, Italy
5. Inst. of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology, Bulgarian Academy of Sci., Sofia -1113, Bulgaria,
6. Inst. of Neurobiology, Bulgarian Academy of Sci., Sofia -1113, Bulgaria

The many chronic illnesses with unclear aetiology are possibly due to deviations in the normal microbiome from that of healthy individuals. Latent infections and chronic diseases can be exacerbated in a state of stress, immune deficiency or aging. In most cases, they are immunologically proven but microbiologically not confirmed. Efforts are directed at experimenting conditions for cultural resuscitation of latent bacteria.

Our aim was to develop an approach to study the blood microbiome of individuals with chronic and latent infections.

Materials and Methods: We examined seven individuals in good-looking health, but with proven chronic diseases. The patients were with chronic hypertension, Fe-dependent anemia, acute articular rheumatism, vitamin B12 deficiency, pollen and dust allergy, subacute thyroiditis, pre-diabetes. We examined 9 ml of venous sterile blood using K3-EDTA Vacutainer system. Three milliliters of blood were culture resuscitated in BHI broth for 72 hours. DNA was isolated from cultured and uncultivated blood. We applied targeted NGS sequencing for 16S rRNA gene and ITS2 markers applying Illumina MiSeq. The resulting sequences were taxonomically defined with the SILVA and Unite databases.

Results: Among the cultured and non-cultured samples, we identified a large biodiversity of OTUs (Operational Taxonomic Unit) similarity with 15 bacterial orders belonging to 6 phyla, predominantly *Proteobacteria*. Among the non-cultured samples, *Proteobacteria* constituted 97% and *Firmicutes* 2%, whereas among the cultured samples *Proteobacteria* consisted 69%, *Firmicutes* 18%, *Actinobacteria* 12%, and *Bacteroidetes* 1%. Among the proven fungi, the phyla *Ascomycota* and *Basidiomycota* predominate.

Conclusion: We successfully applied a method for total resuscitation of latent microbial species in the blood of individuals with suspected infection(s). We have demonstrated that a significant number of microbial species are circulating in the blood of presumably healthy individuals.

Key words: biodiversity, blood microbiome, chronic and latent infections

Acknowledgments: This project is funded by the NSF of Bulgaria contract №: ДН-01–4/16.12.2016

Зооантропонози с епидемичен риск

ГЕОГРАФСКО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ И ДИНАМИКА
НА КИСТНАТА ЕХИНОКОКОЗА В БЪЛГАРИЯ
ЗА ПЕРИОДА 2006 – 2016 Г.

*Р. Харизанов¹, И. Райнова¹, И. Кафтанджиев¹, Н. Цветкова¹,
Р. Борисова¹, А. Иванова¹, М. Виденова¹, Е. Кънева¹*

¹. Национален Център по Заразни и Паразитни Болести,
Отдел „Паразитология и тропическа медицина“

Цел. С настоящата работа представяме някои особености в географското разпространение на кистната ехинококоза в страната, свързани с разпространението на основния резервоар (кучета), степента на развитие на животновъдството, етническата структура на населението изложено на риск и динамиката на заболяемостта в последните единадесет години.

Материали/методи. Използвани са данни от годишните анализи на паразитната заболяемост в страната, изготвени в НЦЗПБ, данни на Изпълнителна агенция по горите за годишните таксаци на скитащи кучета, данни на НСИ за животновъдството (овцевъдство) по региони.

Резултати. Средната годишна заболяемост от кистна ехинококоза за проучвания период е 4.63 на 100 000 (от 6.28 на 100 000 за 2006 г. до 3.78 на 100 000 за 2016 г.). С най-висока средна заболяемост е обл. Сливен (15.18 на 100 000), следвана от областите Кърджали (9.9 на 100 000), Шумен (8.35 на 100 000) и Търговище (8.14 на 100 000). Тези области попадат в рамките на два региона на страната (Югоизточен и Североизточен), в които се отглеждат над 36 % от овцете в България и са населени с разнородни етнически групи. Данните от годишните таксаци показват намаляване на броя на скитащи кучета в страната от 31 435 за 2011 г. до 26 890 за 2017 г.

Заклучение. Независимо че България е с най-висока заболяемост сред страните членки на ЕС, данните от нашето проучване показват трайна тенденция на намаляване на регистрираната годишна заболяемост. Най-засегнатите области в страната са в региони с добре развито овцевъдство и етническа разнородност на населението в тях. Счита се, че в областта на хуманната медицина, липсват особени проблеми по отношение на диагностиката, лечението, надзора и контрола на заболяването. Внимание изисква ветеринаро-медицинския контрол по отношение на крайния гостоприемник (кучето) и основния междинен такъв (овцете). Мерките за ограничаване на заболяемостта при хората са свързани основно с провеждане на скринингови изследвания сред рисковите контингенти (ехографски и имунологичен скрининг) и засилване на превантивната дейност от страна на РЗИ и медиите.

Ключови думи: кистна ехинококоза; заболяемост; географско разпространение

GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION AND DYNAMICS
OF CYSTIC ECHINOCOCCOSIS IN BULGARIA
FOR THE PERIOD 2006 – 2016

*R. Harizanov¹, I. Raynova¹, I. Kaftandjiev¹, N. Tsvetkova¹,
R. Borissova¹, A. Ivanova¹, M. Videnova¹, E. Kaneva¹*

¹. National Center for Infectious and Parasitic Diseases,
Department of Parasitology and Tropical Medicine

Aim of this study is to present some patterns in the geographic distribution of cystic echinococcosis in the country in relation to the distribution of the main reservoir hosts (dogs), the rate of livestock development (sheep breeding), the ethnic composition of the population at risk, and the incidence in the last eleven years.

Materials and methods. We used data from the annual analyzes of the parasitic morbidity in the country, prepared at NCIPD, data of the Executive Forest Agency on annual population estimation of the free – ranging dogs, data from the National Statistical Institute on the Livestock (Sheep) breeding by region.

Results. The average annual incidence of cystic echinococcosis for the study period is 4.63 per 100,000 (from 6.28 per 100,000 in 2006 to 3.78 per 100,000 in 2016). The highest average incidence is around the district of Sliven (15.18 per 100 000), followed by the districts of Kardzhali (9.9 per 100 000), Shumen (8.35 per 100 000) and Targovishte (8.14 per 100 000). These areas fall within two regions of the country (southeast and northeastern), where over 36% of sheep are bred in Bulgaria and are inhabited by heterogeneous ethnic groups. Data from the annual estimates display a decrease in the number of wandering dogs in the country from 31 435 in 2011 to 26 890 in 2017.

Conclusion. Although Bulgaria has highest incidence among the EU member states, data from our survey display a sustained trend of decreasing the registered annual morbidity. The most affected areas in the country are in regions with well – developed sheep breeding and ethnic heterogeneity of the population in them. We believe that the medical care is not related to the transmission of the disease among humans. Attention requires the veterinary and medical control of the final host (dog) and the main intermediate (sheep). Measures to reduce the incidence among people are related to screening of the population at risk (ultrasound and immunological screening), and to reinforcement of the preventive actions by RHIs and the media.

Keywords: cystic echinococcosis; incidence; geographical distribution

НОВИ СЛУЧАИ НА АВТОХТОННА БРУЦЕЛОЗА В СТРАНАТА

Р. Ненова¹, И. Томова¹, Д. Калева²,
В. Василев³, Т. Кантарджиев¹

1. Националната референтна лаборатория „Особено опасни бактериални инфекции“ (НРЛ ООБИ), НЦЗПБ
2. Регионална Здравна Инспекция (РЗИ) – гр. Сливен
3. Официален ветеринарен лекар на общ. Сливен

Бруцелозата е зооантропоноза с тежки здравни и социално-икономически последици. Инфекцията е отново появила се в България през последните десет години (2005–2015). При хора са регистрирани един взрив от епидемично свързани вносни случаи и два автохтонни взрива. Разкрити са и множество огнища на инфекцията при животни в районите със заболели хора.

През 2017 г. по данни на Областна дирекция по безопасност на храните (ОДБХ) гр. Сливен при изследвания по гържарска профилактична програма за заболяването по дребни преживни животни са открити 24 положителни за Бруцелоза кози и овце в 9 стопанства на територията на областта. От РЗИ – Сливен е проведено епидемиологично проучване на общо 61 лица контактни на болни животни. Серумни проби от тях са изследвани в НРЛ ООБИ към НЦЗПБ, гр. София. Специфични анти-*Brucella* антитела са доказани при 3 лица без изявена клинична симптоматика. Използвани са: скрининг тест с Бенгалско розово; Реакция степенна аглутинация и *Brucella* сартмст (Vircell, Испания.)

Своевременно са приложени съответни санитарно – ветеринарни мерки с цел ликвидиране на инфекцията в засегнатите стопанства. До края на 2017 г. не са открити други инфектирани лица.

Ключови думи: бруцелоза, епизоотия, серологична диагностика

СЕРОЕПИДЕМИОЛОГИЧНО И МОЛЕКУЛЯРНО- БИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА *COXIELLA BURNETII* В ЛАБОРАТОРНИ ПРОБИ НА ПАЦИЕНТИ С КАРДИОЛОГИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ

Петя Генова-Калу¹, Стефка Иванова¹,
Аделина Павлова¹, Елина Трендафилова², Даниела Пенчева³

1. Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, Отдел „Вирусология“;
2. Национална Кардиологична Болница – София; ³Бул Био – НЦЗПБ

Интродукция: Ку-треската е зооантропоноза с глобално разпространение. Особено внимание заслужава персистиращата инфекция с *C. burnetii*, която може да се развие след остра форма или да започне като първично хронично заболяване. Ку-рикетсиозните ендокардити са най-честата клинична манифестация, като особено рискови са пациентите с клапни увреждания и други кардиологични усложнения. Поради разнообразния спектър на клинични прояви и неспецифичния характер на симптомите, адекватната диагностика на Ку-треската има решаващо значение за навременното лечение и предотвратяване на хронифицирането ѝ.

Цел: Да се извърши сероепидемиологично и молекулярно-биологично проучване на *Coxiella burnetii* в лабораторни проби на пациенти с карди-

NEW CASES OF AUTOCHTHONOUS BRUCELLOSIS IN THE COUNTRY

R. Nenova¹, I. Tomova¹, D. Kaleva²,
V. Vasilev³, T. Kantardjiev¹

1. NRL High Medical Risk Infections (NRL HMRI), NCIPD
2. Regional Health Inspectorate (RHI) – Sliven
3. Official veterinary expert, Sliven district

Brucellosis is a zoonotic infection with serious health and socio-economic consequences. The disease has re-emerged in Bulgaria over the past ten years (2005–2015). An outbreak of epidemically linked import cases and two autochthonous outbreaks have been reported in humans. Several epizootic foci in areas with infected humans have also been revealed.

In 2017 data from the Regional Directorate of Food Safety (RDFS) in Sliven obtained during testing animals in the frame of the State program for disease prophylaxis among small ruminants showed that twenty-four goats and sheep from 9 farms in the region were positive for brucellosis. Epidemiological study conducted by RHI – Sliven has revealed a total of 61 persons in risk. Serum samples from them have been tested for brucellosis at the NRL HMRI, NCIPD. Three asymptomatic for the time persons were found positive for specific anti-*Brucella* antibodies. Bengal rose plate test (BRPT); serum agglutination test (SAT) and *Brucella*capt (Vircell, Spain) were used. Timely and appropriate veterinary measures have been implemented in order to eradicate the infection in affected holdings. By the end of 2017, no more infected persons were found.

Key words: brucellosis, epizootic, serological diagnosis

SEROEPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGY STUDY OF *COXIELLA BURNETII* IN LABORATORY SAMPLES OF PATIENTS WITH CARDIAC COMPLICATIONS

Petia Genova-Kalou¹, Stefka Ivanova¹,
Adelina Pavlova¹, Elina Trendafilova², Daniela Pencheva³

1. National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Department of Virology;
2. National Cardiology Hospital- Sofia;
3. Bul Bio – NCIPD

Introduction: Q-fever is zoonosis with a global spread. Particular attention should be paid to the persistent infection with *C. burnetii*, which can develop after acute form or begin as a primary chronic disease. Q rickettsial endocarditis is the most common clinical manifestation, such as particular high-risk are patients with valvular lesions and other cardiac complications. Due to the diverse spectrum of clinical manifestations and nonspecific nature of the symptoms, adequate diagnosis of Q-fever was crucial for prompt treatment and prevention of chronicity.

Aim: To perform a seroepidemiological and molecular biology study of *Coxiella burnetii* in laboratory samples of patients with cardiac complications by a combination/set of modern laboratory methods (immunoenzymes and PCR techniques).

ологични усложнения чрез комбинация/набор от съвременни лабораторни методи (имуноензимни и PCR техники).

Материали и методи: В периода 2014 – 2017 г. са изследвани 79 клинични проби (серуми) от амбулаторни и хоспитализирани, в различни клиници на страната пациенти с различни кардиологични усложнения. Средната възраст на изследваните пациенти беше $48,65 \pm 12,12$ год. Използвани бяха серологични (ELISA за доказване на специфични IgM/IgG ph. II и IgG ph. I антитела спрямо *Coxiella burnetii*) и молекулярни (стандартен конвенционален PCR за *sodB* региона и за плазмида QpH1 на *C. burnetii*) методи.

Резултати: От изследваните 79 серумни проби, първично реактивни IgM ph. II антитела спрямо *Coxiella burnetii* бяха доказани в 14 (17,72 %) проби. Защитни *C. burnetii* IgG ph. II антитела, свидетелство за прекарана инфекция, бяха открити в 19 (26,39 %) проби. *C. burnetii* IgG ph. I антитела бяха диагностицирани при 6 (7,59%) пациенти с диагноза инфекциозен ендокардит. Всички серумни проби бяха тествани за доказване на *C. burnetii* инфекциозна ДНК. Положителен PCR сигнал (*sodB* регион) беше получен при 11 от тестваните проби (13,92 %), които имаха респективно позитивни анти-*C. burnetii* IgM ph. II антитела и анти-*C. burnetii* IgG ph. II резултат, а при 7 (8,86%) пациента беше доказан консервативен участък от ДНК на плазмида QpH1 на *C. burnetii* (маркер за остротата на протичане на ку-инфекцията).

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

Ключови думи: *Coxiella burnetii*, кардиологични усложнения, серология, стандартен PCR метод

Materials and methods: In the period 2014–2017, were examined 79 clinical samples (serum) from ambulatory and hospitalized in different hospitals of the country patients with various cardiac complications. The mean age of the patients studied was 48.65 ± 12.12 years. Serological (ELISA for proving specific IgM/IgG ph. II and IgG ph. I antibodies to *Coxiella burnetii*) and molecular (standard PCR technique for *sodB* region and *C. burnetii* plasmid QpH1) methods were used.

Results: Of the 79 serum samples tested, primary reactive IgM ph. II antibodies against *Coxiellaburnetii* were demonstrated in 14 (17,72%) samples. Protective *C. burnetii* IgG ph. II antibodies, evidence of past infection, were detected in 19 (26,39%) samples. *C. burnetii* IgG ph. I antibodies were diagnosed in 6 (7,59%) patients with a diagnosis of infective endocarditis. All serum samples were tested for the detection of *C. burnetii* infectious DNA. A positive PCR signal (*sodB* region) was obtained in 11 of the test samples (13,92%), respectively, having positive anti-*C. burnetii* IgM ph. II antibodies and anti-*C. burnetii* IgG ph. II result, and at 7 (8,86%) patients had a proven conserved region of DNA of the plasmid QpH1 of *C. burnetii* (a marker for the severity of the course of the infection of Q-fever).

Conclusions: The study shows the involvement of *Coxiella burnetii* in the development of various cardiac complications. As a result of the experience gained in the NRL „Rickettsiae and cell cultures“, including a set of methods to improve early laboratory diagnosis of *C. burnetii*, allowing taking proper treatment in patients with cardiac complications.

Key words: *Coxiella burnetii*, cardiac complications, serology, standard PCR method

– 1 –

РЕТРОСПЕКТИВЕН АНАЛИЗ НА ЧЕСТОТАТА И ФЕНОТИПНОТО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА МАКРОЛИДНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ ПРИ ИЗОЛИРАНИ ОТ АМБУЛАТОРНИ ПАЦИЕНТИ *STREPTOCOCCUS GR A* И *GR B* ЗА ПЕРИОД 2014–2017 Г.

Б. Павлова, И. Гергова

Отдел Микробиология, МДЛ Цибалаб ЕООД,

Цел: Да се проследят честотата и фенотипното разпределение на резистентността към макролиди при изолирани от амбулаторни пациенти *Streptococcus gr A* и *gr B* за периода 2014–2017 г.

Материали и методи: Изследвани са 4669 изолата *S. pyogenes* и 5765 изолата *S. agalactiae* (2014–2017 г.). Фенотипът макролидна резистентност е определен при 477 изолата *S. pyogenes* и 513 *S. agalactiae*.

Изолатите са идентифицирани конвенционално и/или апаратно -VITEK MS.

Чувствителността към Erythromycin и Clindamycin е определена на част от изолатите (2014–2015 г.) с дисково-дифузионен метод, а на останалите с VITEK 2 и интерпретацията е извършена съобразно критериите на CLSI (2014–2015) и EUCAST (2016–2017).

Резултати: Определената резистентност за *S. pyogenes* към макролиди е:

2014 г. – 8.84% (67/758); 2015 г. – 8.59 % (109/1269); 2016 г. – 17.59% (257/1461) и 2017 г. – 22.86% (270/1181).

При изолираните *S. agalactiae* се установи:

2014 г. – 24.43% (267/1093); 2015 г. – 22.33 % (272/1218); 2016 г. – 35.79% (548/1531) и 2017 г. – 31.10% (598/1923).

Разпределението по фенотипове на 477 резистентни изолата *S. pyogenes* е:

M phenotype (Efflux) – 54.93%; MLS Constitutive – 13.84% и MLS Inducible – 34.38%,

докато при 513 изолата *S. agalactiae* е:

M phenotype (Efflux) – 23.64%; MLS Constitutive – 46.47% и MLS Inducible – 29.89%.

Заключение: Резистентността към макролиди при β -хемолитичните стрептококи гр А и В е висока и нараства с бързи темпове. Установява се съществено различие между честотата на фенотиповете резистентност при двете групи стрептококи, като по отношение на стрептококи гр В е необходимо допълнително натрупване на данни и подробен анализ.

Тревожните данни налагат преосмисляне на масовата употреба на макролиди в амбулаторната мрежа. Световния опит показва, че намаляване на макролидната резистентност е постижима за кратки срокове при адекватна рестрикция.

Ключови думи: β -Streptococcus, MLS,

– 1 –

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THE FREQUENCY AND PHENOTYPIC DISTRIBUTION OF MACROLIDE RESISTANCE FOR *STREPTOCOCCUS GR A* AND *GR B* ISOLATES FROM OUTPATIENT FOR THE PERIOD 2014–2017

B. Pavlova, I. Gergova

Microbiology Department, MDL Cibalab Ltd.

Goal:

To study the frequency and phenotypic distribution of macrolide resistance in *Streptococcus gr A* and *gr B* isolates from outpatients for the period 2014–2017

Materials and methods : 4669 *S. pyogenes* isolates and 5765 *S. agalactiae* isolates (2014–2017) were investigated. The phenotype of macrolide resistance was determined in 492 *S. pyogenes* and 513 *S. agalactiae* isolates.

Isolates are identified conventionally and/or by instrument -VITEK MS.

The sensitivity to Erythromycin and Clindamycin was determined on a part of the isolates (2014–2015) using the disk diffusion method and for the rest – VITEK 2 and the interpretation is performed according to the CLSI (2014–2015) and EUCAST (2016–2017).

Results: Resistance identified for *S. pyogenes* to macrolides is:

2014–8.84% (67/758); 2015–8.59% (109/1269); 2016–17.59% (257/1461) and 2017–22.86% (270/1181).

For isolated *S. agalactiae* was established:

2014–24.43% (267/1093); 2015–22.33 % (272/1218); 2016–35.7 9% (548/1531) and 2017–31.10 % (598/1923).

The phenotypic distribution of 492 resistant *S. pyogenes* is:

M phenotype (Efflux) – 53.25%; MLS Constitutive – 13.41% and MLS Inducible – 33.33%,

whereas for 513 isolates *S. agalactiae* is:

M phenotype (Efflux) – 23.64%; MLS Constitutive – 46.47% and MLS Inducible – 29.89%.

Conclusions: Resistance to macrolides of β -hemolytic streptococci gr A and B is high and increases rapidly. There is a significant difference between the frequency of phenotypic resistance for the two groups streptococci. Therefore additional accumulation of data and detailed analysis for resistant streptococci gr. B is needed.

This alarming data is the reason to reconsider the mass usage of macrolides for treatment of outpatient.

The World-wide knowledge shows that a reduction in macrolide resistance is achievable for short periods of time through adequate restriction.

Key words: β -Streptococcus, MLS,

АНТИБИОТИЧНА ПОЛИТИКА“ И СТУДЕНТСКО ОБУЧЕНИЕ. АНКЕТА ПРИ СТУДЕНТИТЕ ОТ МЕДИЦИНСКИ КОЛЕЖ „Й. ФИЛАРЕТОВА“

S. Петрова¹, Цв. Цакова¹, В. Иванова¹, М. Момчилова¹, Д. Димитрова¹, Е. Иванова¹, Е. Къолеян^{1,2}

1. Медицински колеж „Йорданка Филаретова“ – МУ – София
2. Медицински институт – МВР

Цел на настоящето проучване е да анализира наскоро проведената Анкета за антибиотиците при студенти от Медицински колеж „Й. Филаретова“ по отношение на знанията им и съдържанието на учебните програми.

Материали/ методи. Съставен бе анкетен формуляр с 10 въпроса и 3 отговора (multiple choice). Анкетата се проведе по случай Европейския ден на антибиотика – 18 ноември 2017 г. – доброволно и анонимно.

Резултати. От подготвените 350 формуляра, бяха попълнени 297: медицински лаборанти – 72, рентгенови лаборанти – 37, инспектори обществено здравеопазване – 25, зъботехници – 30, медицинска козметика – 9, помощник – фармацевти – 91 (84.86% активност). Много добри отговори бяха дадени на въпросите: за показанията за прилагане на антибиотиците – при бактериални инфекции – 86.86%; че основната причина за нарастване на резистентността е неправилното им и излишно предписване – 73.4%; че целта на антибиотичната политика е пациентът да получи най-подходящия антибиотик – 64.4%; че последица от антибиотичната резистентност е неуспех на лечението – 73.06%, и че е необходимо да се вземе материал за микробиологично изследване преди прилагането на антибиотик – 90.23%. От друга страна, незадоволителни бяха отговорите по отношение на епидемиологията на резистентността.

Изводи. Болшинството от студентите изразиха съпричастност към проблемите, свързани с антибиотичната резистентност и необходимостта от усъвършенстване на антибиотичната политика. Специалностите с повече часове обучение по микробиология и фармакология показаха по-високи резултати. Необходим е мултидисциплинарен подход и увеличаване на часовете по антибиотици, вкл. с лекции по антибиотична политика, с цел отличната подготовка на бъдещите здравни специалисти.

Ключови думи: антибиотична резистентност, antimicrobial stewardship, студентско обучение

“ANTIBIOTIC POLICY” AND UNDERGRADUATE EDUCATION. INQUIRY AMONG STUDENTS FROM THE MEDICAL COLLEGE “Y PHILARETOVA”

S. Petrova¹, Ts. Tzakova¹, V. Ivanova¹, M. Momchilova¹, D. Dimitrova¹, E. Ivanova¹, E. Keuleyan^{1,2}

1. Medical College „YordankaPhilaretova” – Medical University – Sofia
2. Medical Institute – Ministry of the Interior

The aim of the current work is to analyze the inquiry about antibiotics among students from the Medical College “Y Philaretova” regarding their knowledge as well as the teaching programs.

Materials/ methods. A questionnaire consisting of 10 questions with 3 answers (multiple choice questions) was designed. Inquiry took place on the occasion of the European Antibiotic day -18 November 2017 – voluntarily and anonymously.

Results. From the prepared 350 forms, 297 were filled in: medical technicians – 72, X-ray technicians – 37, inspectors public health – 25, dental technicians – 30, medical cosmetics – 9, assistant-pharmacists – 91 (84.86% of activity). Very good answers were given to the questions: for the indications for the usage of antibiotics – bacterial infections – 86.86%; that the main reason for the increase of resistance is their inappropriate and excessive prescribing – 73.4%; that the aim of antibiotic policy is the patient to receive the most appropriate antibiotic 64.4%; that the antimicrobial resistance results in failure of therapy – 73.06%, and it is required to obtain specimen for microbiological investigation before the antibiotic usage – 90.23%. On the other hand, the answers about the epidemiology of resistance were unsatisfying.

Conclusions. Majority of students have expressed empathy with the problems connected to the antimicrobial resistance and to the necessity of improvement of antibiotic policies. Specialties with more hours of education on microbiology and pharmacology demonstrated higher results. A multidisciplinary approach is required, as well as more hours on antibiotics, incl. lectures on Antibiotic policy, aiming at the perfect training of future health specialists.

Key words: antibiotic resistance, antimicrobial stewardship, student education

ВИДОВА ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКОТИЧНИ ПРЕПАРАТИ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ ОТ РОД CANDIDA

Д. Георгиева, Х. Хиткова, П. Христова, В. Едрева, К. Драгоев, Т. Балгаранова, М. Срежкова

Катедра по микробиология, вирусология и медицинска генетика, МУ – Плевен

Въведение. Прецизната видова идентификация и антимикотичната чувствителност на представителите на род *Candida* е ключов момент в избора на подходящ препарат за лечение.

Цел. Да се идентифицират до вид клинични изолати от род *Candida* и да се определи тяхната чувствителност към антимикотични препарати.

SPECIES IDENTIFICATION AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIFUNGAL AGENTS OF CLINICAL ISOLATES FROM GENUS CANDIDA

D. Georgieva, H. Hitkova, P. Hristova, V. Edreva, K. Dragoev, T. Balgaranova, M. Sredkova

Department of microbiology, virology and medical genetics, Medical University – Pleven

Introduction. The precise species identification and susceptibility to antifungal agents of the members of genus *Candida* is a key point in the choice of a suitable drug for treatment.

Aim. To identify to species clinical isolates of genus *Candida* and to determine their susceptibility to antifungal agents.

Материали и методи. Обект на настоящото проучване е група от 68 *Candidasp.*, с ненадежна предварителна идентификация. Разпрегелението на изолатите по видове клинични материали е следното: 22 – от урини, 14 – от БАЛ и храчки, 7 – от раневи секрети, 6 – от хемокултури, 6 – от устни кухини, 4 – от гърлени секрети, 3 – от фецеси и 6 – от други проби. За изолиране на гъбичките са използвани Сабуро агар и CHROM Agar Candida (BD). Видовата идентификация е извършена с MLT Candida test 21 (Erba Lachema). MICs на 9 антимикотици (amphotericin B, 5-fluorocytosin, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, anidulafungin, micafungin, caspofungin) са определени с Micronaut – AM (Merlin) и интерпретирани по EUCAST, 2018 г.

Резултати. Около 2/3 от гъбичките са идентифицирани като *C. albicans* и *C. glabrata*, като двата вида заемат еднакъв относителен дял – по 33,82% (по 23 изолата). Следват *C. tropicalis* – 8,82% (6 изолата), *C. krusei* – 5,88% (4 изолата), *C. parapsilosis* – 4,41% (3 изолата) и гр. *C. albicans* е идентифицирана в над 50% при материали от дихателна система, хемокултури и раневи секрети, докато *C. glabrata* доминира при изолати от урини (81,82%). Пет *C. albicans* (21,74%) са резистентни към всички **азоли**. Резистентни към fluconazol са 10 *C. glabrata*, а останалите 13 са с интермедиерна чувствителност. Резистентност към fluconazol е установена при единичните изолати на *C. guilliermondii*, *C. norvegensis*, *C. lipolytica* и *C. lambica*. При non-albicans видовете стойностите на MICs за micafungin и anidulafungin показват, че всички *C. glabrata* са чувствителни на тези препарати. Резистентност към anidulafungin е налице при *C. krusei* и *C. tropicalis*. Всички *C. albicans* и non-albicans са чувствителни на amphotericin B.

Заклучение. Ниският относителен дял на *C. albicans* (33,82%), в сравнение non-albicans видовете (66,18%) е свързан с високата честота на вида *C. glabrata* при изолати от урини.

Ключови думи: *C. albicans*, non-albicans, антимикотични препарати

– 4 –

АНАЛИЗ НА СТРУКТУРАТА И АНТИМИКРОБНАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА МИКРООРГАНИЗМИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ПАЦИЕНТИ С ХЕМАТОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Мая Борисова, Дора Александрова, Дафина Илин,

„СБАЛХЗ“ ЕАД, София

Цел: Анализирането на етиологичната структура и придобитата резистентност към антимикробни средства дава информация за разпространението на проблемни щамове и определя насоките в антибиотичната политика.

Материали и методи: Изследвани са 302 щамове с автоматизирана система bioMerieux VITEK 2: 85 щамове Грам-отрицателни бактерии (28.15%) и 217 щамове Грам-положителни (71.85%).

Резултати: 90 щамове са изолирани от дихателни пътища: 35 *E. faecium*, 11 *P. aeruginosa*, 11 *Enterobacter*, 10 *E. faecalis* и гр.

62 щамове са изолирани от уринарен тракт: 20 *E. faecium*, 20 *E. coli*, 9 *E. faecalis* и гр.

48 щамове са изолирани от хемокултури: 22 *S. epidermidis*, 10 *E. faecium*, 9 *S. haemolyticus* и гр.

Метицилиновата резистентност достига 56.17% при коагулаза-негативните стафилококи и 34.78% за *S. aureus*.

От 90 щамове ентерококи (ГДП, уринарен тракт, хемокултури, рани) високо ниво на резистентност към гентамицин са показали 25 щамове,

Materials and methods. An object of this study is a group of 68 *Candida spp.* with unreliable preliminary identification. The distribution of isolates is following: 22 – from urine samples, 14 – from BAL and sputums, 7 – from wound secretions, 6 – from blood cultures, 6 – from oral cavities, 4 – from throat swabs, 3 – from stools and 6 – from other samples. Sabouraud agar and CHROM Agar Candida (BD) are used for fungal isolation. Species identification is performed with MLT Candida test 21 (Erba Lachema). MICs of 9 antimicrobials (amphotericin B, 5-fluorocytosin, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, anidulafungin, micafungin, caspofungin) are determined with Micronaut – AM (Merlin) and interpreted according to EUCAST, 2018.

Results. About 2/3 of yeasts are identified as *C. albicans* and *C. glabrata*, both in the same relative ratio – 33.82% (23 isolates). These are followed by *C. tropicalis* – 8.82% (6 isolates), *C. krusei* – 5.88% (4 isolates), *C. parapsilosis* – 4.41% (3 isolates), and others. *C. albicans* is identified in more than 50% from respiratory tract samples, blood cultures and wound secretions, whereas *C. glabrata* is dominant in urine isolates (81.82%). Five *C. albicans* (21.74%) are resistant to all azoles. Resistant to fluconazole are 10 strains *C. glabrata*, whereas the remaining 13 show intermediate susceptibility. Fluconazole resistance is found in the single isolates of *C. guilliermondii*, *C. norvegensis*, *C. lipolytica* and *C. lambica*. In non-albicans species, MIC values for micafungin and anidulafungin show that all *C. glabrata* are susceptible to these agents. Resistance to anidulafungin is determined in *C. krusei* and *C. tropicalis*. All *C. albicans* and non-albicans are susceptible to amphotericin B.

Conclusion. The low relative ratio of *C. albicans* (33.82%) compared to non-albicans species (66.18%) is associated with the high incidence of *C. glabrata* in urine isolates.

Key words: *C. albicans*, non-albicans, antifungal agents

– 4 –

ANALYSIS OF STRUCTURE AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL DISEASES

Maya Borisova, Dora Alexandrova, Dafina Ilin

Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

Objective: the analysis of the etiological structure and the acquired resistance to antimicrobials provides information on the spread of problematic strains and determines the guidelines in the antibiotic policy.

Materials and methods: 302 strains were tested with bioMerieux VITEK 2 automated system: 85 strains Gram-negative (28.15%) and 217 strains Gram-positive bacteria (71.85%).

Results: 90 respiratory tract strains were isolated: 35 *E. faecium*, 11 *P. aeruginosa*, 11 *Enterobacter*, 10 *E. faecalis* etc.

62 urinary tract strains were isolated: 20 *E. faecium*, 19 *E. coli*, 9 *E. faecalis* etc.

48 strains were isolated from hemocultures: 22 *S. Epidermidis*, 10 *E. faecium*, 9 *S. Haemolyticus* etc.

Methicillin resistance reaches 56.17% for coagulase negative staphylococci and 34.78% for *S. aureus*.

From 90 enterococci strains (URT, urinary tract, hemocultures and wounds) 25 showed high rates of resistance to gentamicin, 17 to glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) – all *E. faecium*.

към гликопептиди (ванкомицин и мейкопланин) 17 щаме – всички от вида *E. faecium*.

От изолираните 37 щаме от група KES 54,05% са продуценти на ESBL. По-ниска е резистентността в групата към пиперацилин/тазобактам (32,43%) и към цефоперазон/сулбактам (18,92%).

В групата НФГБ за *P. aeruginosa* и *A. baumannii* най-висока резистентност е към цефтазидим (72%), към цефепим и меропенем (68%), а най-ниска към хинолоните (левофлоксацин) – 36%.

Изводи: Преглед фенотипната резистентност към метицилин при стафилококи и гликопептидната резистентност при ентерококи и с оглед на продуциращите широкоспектрна бета-лактамаза преставаители от сем. *Enterobacteriaceae* е препоръчително оптимизиране на антибиотичната терапия основно посредством използване комбинации от антибиотици и чрез намаляване употребата на някои групи антибиотици.

Ключови думи: хематологични заболявания, антибиотична резистентност, MRSA, VRE, ESBL

– 5 –

ИНФЕКЦИИ НА КРЪВТА

Ц. Господинова, М. Лесева, Е. Терзиева,
Ц. Чалашканов, Е. Замфирова

УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, Лаборатория по Микробиология

РЕЗЮМЕ

Цел: Инфекциите на кръвта имат водеща роля в заболяемостта и смъртността при пациенти в спешната медицина, особено от интензивните отделения. Често се налага своевременно започване на емпирична антимикробна терапия, чието адекватното назначаване изисква добро познаване на локалната етиология на инфекциите на кръвта. Настоящото проучване характеризира актуалния статус и тенденциите за промени в етиологичната структура на бактериемииите и антимикробната резистентност на техните причинители в УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“.

Материали и методи: Проучването е ретроспективно, за период 38 месеца (01.01.2014г. – 30.06.2017г.) и включва всички изследвани хемокултури от пациенти на клиничните звена на УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“. Култивирането на хемокултурите е извършено с апарат Bactec 9120 (BD); идентификацията и тестването на антимикробната чувствителност на изолираните микроорганизми – чрез автоматична система Vitek 2 Compact. Механизмите на резистентност на изолатите се проучваха с препоръчаните от EUCAST скринингови и фенотипни потвърдителни методи.

Резултати: От изследваните общо 18520 хемокултури за периода на проучването са се позитивирали 15.2%. Най-чести изолати са CoNS (51.0%), като 81.0% от тях са MR. На второ място по честота е *Acinetobacter baumannii* (9.2%), като 90.4% от изолатите са карбапенем резистентни. Третият от водещите видове по честота на изолиране е *Klebsiella pneumoniae* (5.6%), от които 71% са ESBL(+), а 23.2% са карбапенем резистентни. Наблюдава се тенденция към нарастване броя на позитивните хемокултури с *Candida spp.* – от 1,8% през 2014г на 4.3% през 2015г; 5,6% за 2016г. и 1,9% за първото полугодие на 2017г.

Заклучение: Доброто познаване на актуалния статус на етиологията на инфекциите на кръвта, на тенденциите в разпространението на мултирезистентните изолати и проучването на механизмите на резистентност са от ключово значение за успешна емпирична и дефинитивна антимикробна терапия на тези животозастрашаващи инфекции в спешната медицина.

Ключови думи: хемокултури, бактериемия.

Of the 37 KES group strains 54.05% are ESBL producers. The resistance in the group to piperacillin/tazobactam is 32.43% and to cefoperazone/sulbactam is 18.92%.

In the NFGB group for *P. aeruginosa* and *A. baumannii* the highest resistance is to ceftazidime (72%), cefepime and meropenem (68%) and the lowest to quinolones (levofloxacin) – 36%.

Conclusions: with regard to the phenotypic resistance to methicillin in staphylococci and the glycopeptide resistance in enterococci and in view of the broad-spectrum β -lactamase-producing members of the *Enterobacteriaceae* family it is recommendable to optimize the antibiotic therapy mostly via combined use of antibiotics and via reduced application of certain antibiotics.

Key words: hematological diseases, antibiotic resistance, MRSA, VRE, ESBL

– 5 –

BLOODSTREAM INFECTIONS

Ts. Gospodinova, M. Leseva, E Terzieva,
Ts Chalashkanov, E. Zamphirova

UMHATEM “N. I. PIROGOV”, Laboratory of Microbiology

ABSTRACT

Aim: Bloodstream infections (BSI) have a leading role in morbidity and mortality in emergency medicine patients, especially in intensive care units. It is often necessary to start empiric antimicrobial treatment and its adequate choice requires good knowledge of the local BSI etiology. The present study characterizes the current status and trends for change in etiological pattern of BSI and in the antimicrobial resistance of the blood borne pathogens in UMHATEM “N. I. Pirogov”.

Materials and methods: This is a retrospective study for a period of 38 months (01.01.2014 – 30.06.2017) and includes all the blood cultures from patients of the clinical units in UMHATEM “N. I. Pirogov”. BACTEC (Becton Dickinson) device for blood cultures was used. Identification and antimicrobial susceptibility tests of the microbial isolates were performed using the automated system Vitek 2 Compact, Bio-Merieux. The mechanisms of resistance were studied using the screening and confirmative phenotypic methods recommended by EUCAST.

Results: For the study period were done as many as 18520 blood cultures and 2815 (15.2%) of them became positive. The most common isolates were coagulase-negative staphylococci (CoNS) (51.0%) and 81.0% of them were methicillin-resistant. Second in frequency was *Acinetobacter baumannii*(9.2%) and 90.4% of them were carbapenem-resistant (CR). Third in frequency of isolation was *Klebsiella pneumoniae* (5.6%); 71% of them were ESBL-producers and 23.2% were CR. A trend for increase in number of the positive blood cultures with *Candida spp.* was observed: from 1,8% in 2014 to 4.3% in 2015; 5,6% – in 2016 and 1,9% for the first half of 2017.

Conclusion: The good knowledge of the current status of BSI etiology, the trends of MDR isolates spread and study of the mechanisms of resistance are key for successful empiric and definitive antimicrobial treatment of these life-threatening infections in the emergency medicine.

Key words: blood cultures, bacteraemia

РАЗРАБОТВАНЕ, ВЪВЕЖДАНЕ И ОЦЕНКА НА ЕФЕКТИВНОСТТА НА НОВ БЪРЗО MLVA8 МЕТОД ЗА ГЕНОТИПИЗИРАНЕ НА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUBSP. PNEUMONIAE*, *KLEBSIELLA QUASIPNEUMONIAE* И *KLEBSIELLA VARIICOLA*

Д. Дончев²; И. Н. Иванов¹, В. Добринов¹, К. Иванова¹;

1. Национален център по заразни и паразитни болести
2. Университетска Болница „Лозенец“

Увог: Нарастващата антибиотична резистентност на *Klebsiella pneumoniae* в комбинация с бързото разпространение в болничните звена налагат необходимост от бързо и надеждно типизиране на щамове. Към днешна дата масово се използват два метода: MLST и PFGE, които са скъпи и трудоемки.

Цел: Да се оптимизира и приложи нов метод на базата на Multi-locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA8) за бързо, надеждно генотипизиране на *K. pneumoniae* и оценка на възможностите му за диференциране на наскоро придобилите клинично значение *K. quasipneumoniae* и *K. variicola*.

Материали/ Методи: MLVA се основава на избор и амплификация на няколко вариабилни локуси в генома. Осем такива локуса бяха подбрани по литературни данни. Чрез биоинформатичен анализ на геномните локуси при три референтни щамове на *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* и *K. variicola* бяха конструирани оригинални праймери, така че да бъдат съвместими в две мултиплексни PCR. Праймерите бяха тествани in-silico върху всички щамове, публикувани в генбанката NCBI. За визуализиране на резултатите PCR продуктите се разделяха директно без допълнителна обработка на капиларна електрофореза.

Резултати: Осемте двойки праймери бяха успешно групирани в две мултиплексни PCR, чрез които се получиха недвусмислени резултати при всеки от локусите (без припокриване в размера). Изпитването на MLVA8 спрямо 12 щамове с предварително доказан секвенционен тип (ST) по метода MLST, показаха 100% корелация на методите. Последващото изпитване върху 100 клинични изолата показа отлични показатели по отношение на дискриминативната способност и типабилност на метода.

Дискусия: Така оптимизираният метод се извършва в рамките на четири часа и се очаква да типизира освен *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae*, *K. Variicola*, така и *K. pneumoniae ssp. rhinoscleromatis*, с изключение на *K. pneumoniae ssp. ozaanae*. Разработеният метод ще подобри детекцията и ограничаването на клонове с висок епидемичен потенциал.

Ключови думи: MLVA, *K. pneumoniae*, генотипизиране

DEVELOPMENT, INTRODUCTION AND EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF A NEW RAPID METHOD MLVA8 FOR GENOTYPING OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUBSP. PNEUMONIAE*, *KLEBSIELLA QUASIPNEUMONIAE* И *KLEBSIELLA VARIICOLA*

D. Donchev²; I. N. Ivanov¹, V. Dobrinov¹, K. Ivanova¹;

1. National Center for Infectious and Parasitic diseases
2. University Hospital „Lozenets“

Prelude: The accumulating antibiotic resistance in addition to rapidly spreading of *Klebsiella pneumoniae* among patients and hospital units imposes the need of a rapid and reliable method for genotyping. Nowadays two methods are being used in general: MLST and PFGE, which are expensive and labor-intensive.

Goal: To optimize and apply a new method based on Multi-locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) for rapid and reliable genotyping of *K. pneumoniae* and to evaluate its capacity to differentiate the newly found *K. quasipneumoniae* and *K. variicola* which are of emerging medical significance.

Material/Methods: MLVA lies on the basis of a carefully chosen and amplified variable loci in the genome. Eight such loci were selected via scientific research. Bioinformatical analysis of the genomic loci among three reference strains of *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* and *K. variicola* was performed and new pairs of primers were freshly designed, so that they could be compatible into two multiplex PCRs. The primers were then tested in-silico on all strains, published in the GenBank NCBI. The PCR products were then visualized using capillary electrophoresis without any preparation.

Results: The eight pairs of primers were successfully grouped into two multiplex PCRs, which provided unambiguous results for every locus without overlaps in length size. Twelve strains with defined sequence type (ST) via MLST method were tested using MLVA8 and the results show 100% correlation between both methods. The next test on 100 clinical strains resulted in excellence in terms of discriminatory capability and typeability.

Discussion: The so optimized method is performed in total of four hours and should genotype besides *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae*, *K. Variicola*, even so *K. pneumoniae ssp. rhinoscleromatis*, except *K. pneumoniae ssp. ozaanae*. The method should improve the detection and restriction of strains with high epidemic potential.

Key words: MLVA; *K. pneumoniae*; genotyping

**МИКРОБИОЛОГИЧНО ПРОСЛЕДЯВАНЕ
НА ЕФЕКТА ОТ ИНХАЛАТОРНО ПРИЛОЖЕНИЕ
НА GENTAMICIN ПРИ ВЕНТИЛАТОР-
АСОЦИИРАНА ПНЕВМОНИЯ, ПРИЧИНЕНА
ОТ MDR – *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.
ПЪРВОНАЧАЛНИ ДАННИ.**

И. Гергова¹, В. Димов², Н. Петров², Е. Одисеева²

1. Катедра Военна епидемиология и хигиена – Военномедицинска академия, София
2. Катедра Анастезиология, реанимация и интензивно лечение – Военномедицинска академия, София

РЕЗЮМЕ

Въведение: Вентилатор-асоцирана пневмония (ВАП) е едно от основните клинично значими усложнения при критично болни пациенти в клиниките за интензивно лечение. MDR – *K. pneumoniae* е чест причинител на ВАП. Високо дозата системна антимикробна терапия е съпътствана от сериозни странични ефекти. Актуални клинични проучвания върху инхалаторното антибиотично лечение показват обнадеждаващи резултати, като специфичните условия за извършване на инхалаторната терапия са в процес на оптимизиране.

Цел: Да се проследи ефекта от инхалаторното приложение на gentamicin при ВАП, причинена от MDR – *K. pneumoniae*.

Материали/методи: Разглеждат се три клинични случая на ВАП, причинени от MDR – *K. pneumoniae* (carbapenem-resistant, ESBLs; fluoroquinolone-resistant), третирани инхалаторно с gentamicin. Микробиологично проследяване: ежедневно изследване на материали от трахео-бронхиално гърво – полуколичествена оценка, идентификация и определяне на антимикробна чувствителност на всички изолати (Vitek 2, bioMerieux; MicroScanWalkAway 96 plus, BeckmanCoulter); интерпретация и доказване на фенотипове на резистентност при изолатите, съобразно критериите на EUCAST.

Резултати: Установена е ерадикация на *K. pneumoniae* в рамките на 3–5 дни, съпътствано от клинично подобрение и редукция на рентгеновите находки.

Заклучение: Първоначалните данни показват добра ефективност от инхалаторно приложение на gentamicin при ВАП, причинена от MDR-*K. pneumoniae*. Ключова роля за оптимизиране на терапевтичните схеми и оценяване на ефекта от прилагането на инхалаторна антимикробна терапия има микробиологичното проследяване на изолираните причинители.

Ключови думи: вентилатор-асоцирана пневмония (ВАП), multi-drug resistance (MDR) – *K. pneumoniae*, инхалаторна антибиотична терапия с гентамицин

**MICROBIOLOGICAL MONITORING
OF THE EFFECT OF INHALED GENTAMICIN
IN VENTILATOR-ASSOCIATED PNEUMONIA
CAUSED BY MDR – *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.
PRELIMINARY DATA.**

I. Gergova¹, V. Dimov², N. Petrov², E. Odisseeva²

1. Department of Military Epidemiology and Hygiene – MilitaryMedicalAcademy, Sofia
2. Department of Anaesthesiology and Critical Care – MilitaryMedicalAcademy, Sofia

ABSTRACT:

Introduction: Ventilator-associated pneumonia (VAP) is one of the major clinically significant complications in critically ill patients in the intensive care units. MDR – *K. pneumoniae* is a frequent cause of VAP. Usage of broad-spectrum antibiotics in high dosage, for the treatment of MDRP-VAP, may lead to serious side effects that endanger patient's life. Recent clinical trials for inhaled antibiotic therapy have shown encouraging results for MDRP-VAP treatment. The specific conditions are still not clear and are going to be optimized.

Aim: Monitoring the effect of inhaled gentamicin administration in VAP caused by MDR – *K. pneumoniae*.

Materials/Methods: Three clinical cases of VAP, caused by MDR – *K. pneumoniae* (carbapenem-resistant, ESBLs, fluoroquinolone-resistant) treated with inhaled gentamicin were examined. Microbiological investigation: endotracheal aspirate samples were daily examined – semiquantitative evaluation, identification and antimicrobial sensitivity of all isolates (Vitek 2, bioMerieux; MicroScanWalkAway 96 plus, BeckmanCoulter); phenotypes of resistance in isolates were interpreted and demonstrated according to EUCAST criteria.

Results: *K. pneumoniae* eradication was detected within 3–5 days. It was accompanied by clinical improvement and reduction of X-ray findings.

Conclusion: The initial data have shown good efficacy from inhaled gentamicin administration in VAP caused by MDR – *K. pneumoniae*. The microbiological monitoring of isolated causative agents is a key point for therapeutic regimen optimisation and assessment of inhaled antimicrobial therapy effect.

Key words: Ventilator-associated pneumonia (VAP), multi-drug resistance (MDR) *K. pneumoniae*, inhalational antibiotic therapy with gentamicin

**ЕТИОЛОГИЧНА СТРУКТУРА И IN VITRO
ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИМИКРОБНИ
СРЕДСТВА НА МИКРОБНИ ИЗОЛАТИ ПРИ
БАКТЕРИЕМИИ В КЛИНИКИ ЗА ИНТЕНЗИВНО
ЛЕЧЕНИЕ В МБАЛ-СОФИЯ, ВМА, 2016–2017Г.**

И. Гергова¹, В. Димов², Е. Одисеева², Н. Петров², В. Мутафчийски³

1. Катедра Военна епидемиология и хигиена – Военномедицинска академия, София
2. Катедра Анестезиология, реанимация и интензивно лечение – Военномедицинска академия, София
3. Клиника Ендоскопска, ендокринна хирургия и колопроктология – Военномедицинска академия, София

РЕЗЮМЕ

Цел: Да бъде определена етиологичната структура и основните фенотипове на резистентност сред най-честите причинители на бактериемии при пациенти, хоспитализирани в клиники за интензивно лечение на МБАЛ-София, ВМА, 2016–2017г.

Материали/методи: Изследвани са общо 1156 сета хемокултури, при наличие на съответни клинични индикации. Култивирането на пробите е извършвано в автоматизирани системи BACTEC 9050 (Becton Dickinson) и BactALERT 3D (SelectLink); положителните хемокултури са оценявани чрез микроскопия по Грам и субкултивирани по конвенционални методи. При идентификацията и определянето на антимикробната чувствителност са прилагани конвенционални и/или апаратни методи (Vitek 2, bioMerieux; MicroScan WalkAway 96 plus, Beckman Coulter), като интерпретацията и доказването на фенотипове на резистентност при изолатите е съобразно критериите на EUCAST.

Резултати: От 287 микробни изолата, 212 (73.9%) са оценени като етиологично значими. Грам-положителните бактерии (55.7%) доминират над Грам-отрицателните (40.1%) и микроскопичните гъбички от род *Candida* (4.2%). Определена е етиологичната структура на най-често изолираните бактерии: коагулаза-негативни стафилококи: 23.6%; *K. pneumoniae*: 16.5%; *Enterococcus* spp.: 15.1%; *S. aureus*: 13.7%; *E. coli*: 8.0%; *A. baumannii*: 7.5%; *P. aeruginosa*: 5.2%. Установена е динамика в етиологична структура, с подчертано нарастване на изолираните *Enterococcus* spp, *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *Candida* spp. Изолираните бактерии са предимно множествено резистентни.

Заклучение: Описаната етиологична структура е сходна с данните, представяни от европейски страни. Мониторингът на видовия състав, честотата и антимикробната чувствителност на етиологично значимите причинители на бактериемии е в основата за актуализиране на действащите схеми за емпирична терапия на локално ниво.

Ключови думи: етиологична структура, хемокултури, множествено-резистентни бактерии.

**ETIOLOGICAL STRUCTURE AND IN VITRO
SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS
OF MICROBIAL ISOLATES FROM BLOODSTREAM
INFECTIONS IN INTENSIVE CARE UNITS,
MULTIPROFILE HOSPITAL-SOFIA, MILITARY
MEDICAL ACADEMY, 2016–2017**

I. Gergova¹, V. Dimov², E. Odisseeva², N. Petrov², V. Mutafchiyski³

1. Department of Military Epidemiology and Hygiene – Military Medical Academy, Sofia
2. Department of Anesthesiology and Critical Care – Military Medical Academy, Sofia
3. Clinic of endoscopic, Endocrine surgery and Coloproctology – Military Medical Academy, Sofia

ABSTRACT

Aim: Determining etiological structure and main phenotypes of resistance among the most common causes of bacteremia in patients, who are hospitalized in the intensive care units during 2016–2017 in Military Medical Academy-Sofia.

Material/methods: Haemoculture samples were taken from patients with relevant clinical indications. A total of 1156 sample sets of hemocultures were tested. All identical isolates from a patient were excluded from the analysis. Cultivation of the samples were performed in automatic systems – BACTEC 9050 (Becton Dickinson) и BactALERT 3D (SelectLink). The positive haemocultures were evaluated with Gram's Stain Test and were subcultivated with conventional methods. Identification and determination of antimicrobial susceptibility was performed with conventional and/or automated (Vitek 2, bioMerieux, MicroScan, WalkAway 96 plus, Beckman, Coulter) methods. Phenotypes of resistance in isolates were interpreted and demonstrated according to EUCAST criteria.

Results: Among the 287 isolated microbial agents, 212 (73.9%) were assessed as clinically significant. Predominance of Gram-positive bacteria (55.7%) over Gram-negative bacteria (40.1%) and microscopic fungi with medical importance – genus *Candida* (4.2%) was established. The etiological structure was analyzed and the main agents were determined: Coagulase Negative Staphylococcus: 23.6%; *K. pneumoniae*: 16.5%; *Enterococcus* spp.: 15.1%; *S. aureus*: 13.7%; *E. coli*: 8.0%; *A. baumannii*: 7.5%; *P. aeruginosa*: 5.2%. It was established dynamics in the etiological structure with a marked increase in the isolated *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *Candida* spp. Isolated bacterial strains were predominantly multidrug resistant.

Conclusion: The described etiological structure is similar to the data presented by other European countries. The monitoring of species composition, frequency and antimicrobial susceptibility of etiological significant bacteremia caused agents is the basis for updating current empirical antibiotic therapy at a local level.

Keywords: Etiological structure, Haemocultures, Multi-drug resistant bacteria

ОЦЕНКА НА БЪРЗИЯ POLYMIxin NP ТЕСТ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА КОЛИСТИН-РЕЗИСТЕНТНИ ENTEROBACTERIACEAE: ПРЕДВАРИТЕЛНИ РЕЗУЛТАТИ

К. Р. Иванова¹, И. Н. Иванов¹, В. Добринов¹, С. Събчева²,
Е. Добрева¹, М. Недялков, Р. Христова, Б. Тодорова², Т.
Кантарджиев¹

1. Национален център по заразни и паразитни болести
2. Специализирана болница за активно лечение на онкоболни

Увод: Повишената употреба на колистин в хуманната медицина и наскоро откритата плазмидно-медирана резистентност към полимиксини, подчертават необходимостта от надеждни методи за тестване на антимикробната чувствителност към тези препарати. Фенотипните методи за установяване на полимиксиновата резистентност като дисково-дифузионният и градиентно-дифузионите методи не се препоръчват и за „златен стандарт“ се счита определянето на МПК чрез разреждане в бульон, който е тругоемък и скъп.

Цел: Да се оцени новия бърз Polymixin NP тест за определяне на колистинова резистентност при сем. *Enterobacteriaceae*, спрямо референтния метод.

Методи и материали: Чрез Polymixin NP теста бяха изпитани общо 40 щамата от различни ентеробактериални видове. Наборът от тестови изолати включваше 20 чувствителни на колистин и 20 резистентни. Към втората група се отнасяха 10 изолата, принадлежащи към родове, известни с вродената си резистентност към този антибиотик (*Serratia*, *Morganella*, *Proteus*, *Hafnia*, *Providencia*). Останалите колистин-резистентни изолати бяха от видовете *K. pneumoniae* и *E. coli*. Бульон-дифузионният метод бе приложен върху всички изолати, включени в проучването и изпълнен, съгласно препоръките на EUCAST.

Резултати: Чрез Polymixin NP теста бяха идентифицирани коректно всички изолати, определени като резистентни чрез референтния метод, включително и такива показали ниски или гранични МПК на колистин.

Дискусия: Polymixin NP е бърз и лесен за изпълнение и интерпретация и може да бъде проведен във всяка лаборатория. Методът демонстрира висока чувствителност и специфичност за детекция на колистин-резистентни *Enterobacteriaceae*, и въвеждането на тази относително нова методика в лабораторната практика ще улесни и съкрати процедурата за разпознаването на колистин-резистентни изолати, които представляват все по-честа находка в страната.

Ключови думи: колистин-резистентни; Polymixin NP, *Enterobacteriaceae*

ПРЕГЛЕД ВЪРХУ АКТИВНОСТТА НА АНТИБИОТИЧНИТЕ СУБСТАНЦИИ

Даниела Пенчева

Бул Био-НЦЗПБ

Цел: Проучването е извършено в периода от 2003 до 2017 година. Целта е сравняване активността на антибиотични субстанции, определена с микробиологичен стандартизиран метод спрямо тази, която е декларирана от производителя.

EVALUATION OF THE RAPID POLYMIxin NP TEST FOR COLISTIN-RESISTANCE DETECTION IN ENTEROBACTERIACEAE: PRELIMINARY RESULTS

K. R. Ivanova¹, I. N. Ivanov¹, V. Dobrinov¹, S. Sabtcheva², E.
Dobrev¹, M. Nedyalkov¹, R. Hrsistova¹, B. Todorova², T. Kantardjiev¹

1. National Center of Infectious and Parasitic Diseases
2. National Oncology Center

Introduction: The increasing use of colistin in human medicine and the recently discovered plasmid-mediated polymixin resistance emphasize the need for reliable methods for susceptibility testing of these antimicrobials. The phenotypic methods such as disc diffusion and gradient diffusion are not recommended, and as a “gold standard” is considered the broth dilution method, which is time-consuming and expensive.

Aim: To evaluate the new rapid Polymixin NP test for detection of colistin-resistance in *Enterobacteriaceae*, in comparison with the reference method.

Material and methods: Using the Polymixin NP test a total of 40 various enterobacterial species were tested. The collection included 20 colistin-susceptible and 20 colistin-resistant isolates. Out of the 20 colistin-resistant isolates, ten belonged to a genus, known to be intrinsically resistant to this antibiotic (*Serratia*, *Morganella*, *Proteus*, *Hafnia*, *Providencia*). The rest of the colistin-resistant isolates were *K. pneumoniae* and *E. coli*. All the isolates included in our study were tested with the reference broth micro-dilution method, according to the EUCAST guideline.

Results: The Polymixin NP test identified correctly all of the isolates, defined as resistant with the reference method, including those with low and border-line MICs.

Discussion: Polymixin NP test is rapid and easy to be performed and interpreted and can be used in every laboratory. The method demonstrates high sensitivity and specificity for detection of colistin-resistant *Enterobacteriaceae*. The implementation of this new technique in the laboratory practice will facilitate and shorten the detection of colistin-resistance that is increasingly emerging in Bulgaria.

– 10 – OVERVIEW OF THE ACTIVITY OF ANTIBIOTIC SUBSTANCES

Daniela Pencheva

Bul Bio- NCIPD

Purpose: The survey was conducted between 2003 and 2017. The aim is to compare the activity of antibiotic substances determined by a microbiological standardized method against that declared by the manufacturer.

Materials / Methods: Antibiotic substances in powdered state are used as well as those purchased from the pharmacy network in the form of ampoules

Материали/методи: Използвани са антибиотични субстанции във вид на сухо вещество, както и такива закупени от аптечната мрежа под формата на ампули/флакони за парантерално приложение. За целите на проучването се прилага микробиологично потвърждаване или определяне активността на антибиотичните субстанции. Използва се Дисково Дифузионния Метод спрямо зоните, определени за качествен контрол на съответния вид антибиотик в CLSI.

Резултати: Проведено е микробиологично изпитване върху 42 вида антибиотични субстанции. Анализирани са общо 205 партиди, от които при 38 е установено значително отклонение от цитираната в аналитичния сертификат на производителя активност. Основните несъответствия са установени при следните субстанции: ампицилин, ампицилин/сулбактам, азтреонам, амикацин, доксициклин, гентамицин, меропенем, сулфаметоксазол, тобрамицин и ванкомицин. В повечето случаи производителите са цитирали като метод за определяне съдържанието на антибиотика – HPLC. Прилагайки обаче данните за активност на антибиотика, посочени в аналитичния сертификат, при напояване на дискове с натоварване съответстващо на изискванията на CLSI, зоните на подтискане върху контролни щамове не отговарят на референтните норми.

Заклучение: Имайки пред вид, че основното предназначение на антибиотиците е да се прилагат при лечение на бактериални инфекции, ефективността им е от съществено значение за резултата от прилаганата терапия. Установените различия между сертифицирана активност и установена при микробиологично изпитване е сигнал за липсата на гарантирана ефективност на някои от предлаганите в аптечната мрежа антибиотици, прилагани при утвърдена доза, поради занижената им активност/съдържание.

Ключови думи: антибиотични субстанции, активност, микробиологично определяне.

/ vials for parenteral application. For the purpose of the study, microbiological confirmation or determination of antibiotic activity is administered. The Disc Diffusion Method is used against the areas defined for quality control of the respective type of antibiotic in CLSI.

Results: A microbiological study was conducted on 42 types of antibiotic substances. A total of 205 lots were analyzed, of which at 38 was found a significant deviation from the activity quoted in the analytical certificate of the manufacturer. The main inconsistencies were found in the following substances: ampicillin, ampicillin / sulbactam, aztreonam, amikacin, doxycycline, gentamicin, meropenem, sulfamethoxazole, tobramycin and vancomycin. In most cases, manufacturers have quoted as a method for determining the antibiotic content – HPLC. However, using the antibiotic activity data specified in the analytical certificate for irrigation of CLSI compliant discs, the zones of inhibition on control strains do not meet the reference standards.

Conclusion: Given that the main purpose of antibiotics is to be used in the treatment of bacterial infections, their effectiveness is essential for the result of applied therapy. The established differences between certified activity and the microbiological test is a sign of the lack of guaranteed effectiveness of some of the antibiotics offered in the pharmacy network administered at an approved dose because of their reduced activity / content.

Key words: antibiotic substances, activity, microbiological determination.

– 11 –

ПРОБЛЕМЪТ С РЕЗИСТЕНТНОСТТА КЪМ ИНСЕКТИЦИДИ – АКТУАЛНОСТ И ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА

Буковска С. и Н. Миткова

Национален център по заразни и паразитни болести

Съгласно изискванията на Европейското законодателство, редица широко прилагани в дезинсекцията активни вещества в последните няколко години поетапно отпадат от списъка на разрешените за употреба активни субстанции.

Пиретроидите са сред най-широко употребяваните в практиката инсектициди, поради това че са ефективни, евтини и сравнително безопасни от други химични групи. Към тях обаче има редица данни за проява на устойчивост у насекомите и в същото време индустрията не предлага на пазара нови алтернативи.

На пазара в България за борба с насекомите с медицинско значение има продукти основно на базата на пиретроиди, което не дава възможност за ротация на активни вещества с различен механизъм на действие.

Като се има предвид тесния кръг от активни субстанции и видове формулации чрез които те се предлагат на пазара, препоръчително е по-целесъобразно използване на наличните продукти и прилагане на нехимични методи, там където е възможно.

Ключови думи: резистентност, законодателство, пиретроиди

– 11 –

THE PROBLEM OF RESISTANCE TO INSECTICIDES – ACTUALITY AND CHALLENGES

Bukovska S., N. Mitkova

National Center of Infectious and Parasitic Diseases

According to the requirements of the European Commission, a number of widely applied insecticides in the last few years are phased out of the list of approved active substances.

Pyrethroids are among the most widely used insecticides because they are effective, cheap and relatively safer than other chemical groups.

However, there are a number of data on insect resistance and, at the same time, the industry does not offer new alternatives on the market.

On the market in Bulgaria for the control of insects of medical importance there are products based mainly on pyrethroids, which does not allow the rotation of active substances with different mechanism of action.

Given the narrow range of active substances and formulations is recommended proper and careful use of the existing products and use of non-chemical methods wherever possible.

Key words: resistance, European Commission, pyrethroids

ИЗОЛИРАНЕ НА ВАНКОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНИ ЕНТЕРОКОКИ ОТ ФЕКАЛНИ ПРОБИ ЧРЕЗ СЕЛЕКТИВНИ ХРОМОГЕННИ АГАРОВИ ХРАНИТЕЛНИ СРЕДИ И СЕЛЕКТИВЕН ЖЛЪЧКА-ЕСКУЛИН БУЛЪОН

П. Христова¹, Х. Хиткова¹, Г. Тодорова²,
В. Тодоров², Я. Митков³, Д. Георгиева¹,
В. Едрева¹, К. Драгоев¹, М. Срежкова¹

1. Катедра по Микробиология, Вирусология и Медицинска Генетика, Медицински университет – Плевен
2. Катедра по Нейрология, Хематология и Гастроентерология, Медицински университет – Плевен
3. Кръжок по микробиология, Медицински университет – Плевен

Целта на нашето проучване е да сравним възможностите на три хромогенни хранителни среди и жлъчка ескулин бульон с 6µg/mL ванкомицин (BEAV) за изолоране на ванкомицин-резистентните ентерококи (VRE) от фекални проби.

Материали и методи: За 8-месечен период бяха изследвани 159 ректални секрета от 97 пациента, подложени на хемодиализа в Университетската болница, Плевен. Пробите се посяваха върху три хромогенни хранителни среди: Brilliance VRE Agar, chromID™ VRE Agar, HiCrome™ VRE Agar, и в BEAV бульон. Посевките се инкубираха при 37°C и проследяваха за растеж на 24 и 48 ч. Съннителните колонии се определяха като ентерококи чрез оцветяване по Грам, каталазна проба и *PYR-тест*, и се идентифицираха до вид чрез RapIDSTREPPanel и VITEK 2 compact system. Минималните потискащи концентрации (МПК) на ванкомицин се определяха чрез E-тест.

Резултати: VR *E. faecium* се изолираха от фекалните проби на 5 (5.1%) от изследваните пациенти. Четири щамове VR *E. faecium* се изолираха от хромогенните хранителни среди и инокулираните BEAV бульони, и един щам се изолира само от бульона. МПК на ванкомицин при всички изолати беше над 256µg/mL. Допълнително от инокулираните BEAV бульони се изолораха 23 ентерококови щамове с VanC фенотип (15 *E. gallinarum* и 8 *E. casseliflavus*). Установен беше отчетлив резултат за растеж на VR *E. faecium* след 24 ч. инкубиране при използване на Brilliance VRE Agar и chromID™ VRE Agar. Детекцията на VR *E. faecium* с HiCrome™ VRE Agar беше затруднена поради растежа на Грам-орицателни бактерии, вариации в цвета на колонията и от растежа на ентерококови видове с VanC фенотип.

Заклучение: Комбинацията от Brilliance VRE Agar или chromID™ VRE Agar с BEAV бульон е най-подходяща за изолоране на VRE от фекални проби.

Ключови думи: ванкомицин-резистентните ентерококи, селективни среди

DETECTION OF VANCOMYVIN-RESISTANT ENTEROCOCCI IN FECAL SAMPLES BY SELECTIVE CHROMOGENIC AGAR MEDIA AND SELECTIVE BILE ESCULIN AZID BROTH

P. Hristova¹, H. Hitkova¹, G. Todorova²,
V. Todorov², Y. Mitkov³, D. Georgieva¹,
V. Edreva¹, K. Dragoev¹, M. Sredkova¹

1. Department of Microbiology, Virology and Medical Genetics, Medical University – Pleven
2. Department of Nephrology, Haematology and Gastroenterology, Medical University – Pleven
3. Study microbiology group, Medical University – Pleven

The aim of our study is to compare opportunities of three chromogenic agar media and bile esculin azid broth with 6µg/mL vancomycin (BEAV) for recovery of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in fecal samples.

Materials and Methods: For a two-month period a total of 159 fecal swabs were collected from 97 patients undergoing hemodialysis in University hospital, Pleven. The swabs were directly inoculated onto three chromogenic media: Brilliance VRE Agar, chromID™ VRE Agar, HiCrome™ VRE Agar, along with into BEAV broth. Cultures were incubated at 37°C and were examined for growth after 24 and 48 h. Suspect colonies were determined as enterococci by Gram stain, catalase reaction and PYR-test, and were identified to the species level using the RapID STREP Panel and VITEK 2 compact system. Vancomycin minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by E-test.

Results: VR *E. faecium* were detected in fecal samples from 5 (5.1%) patients. Four VR *E. faecium* strains were isolated by the three chromogenic media used and by inoculated BEAV broths, and one strain was isolated only by the broth. Vancomycin MICs exceeded 256µg/mL for all *E. faecium* isolates. Additionally, enterococcal strains with VanC phenotype (15 *E. gallinarum* and 8 *E. casseliflavus*) were isolated from the inoculated BEAV broths. A clear growth result of VR *E. faecium* was detected on Brilliance VRE Agar and chromID™ VRE Agar after 24 h incubation. The detection of VR *E. faecium* on HiCrome™ VRE Agar was compromised by the growth of Gram-negative bacteria, variations in the colour of the colonies and growing of enterococci strains with VanC phenotype.

Conclusion: Combination of either Brilliance VRE Agar or chromID™ VRE Agar with BEAV broth is the most appropriate for isolation of VRE from fecal samples.

Key words: vancomycin-resistant enterococci, selective media

СЕРОТИПОВО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА *S. PNEUMONIAE* СРЕД ПАЦИЕНТИ С ПНЕВМОКОКОВ МЕНИНГИТ В ПЛОВДИВСКА ОБЛАСТ

Й. Калчев^{1,2}, В. Кирина^{1,2}, Л. Сечанова³, М. Мурджева^{1,2}

1. Катедра по Микробиология и Имунология, Фармацевтичен факултет, Медицински Университет – Пловдив;
2. Лаборатория по Микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив;
3. Катедра по Медицинска Микробиология, Медицински факултет, Медицински Университет – София;

Цел. Да се проучи серотиповото разпределение на *S. pneumoniae* сред пациентите с пневмококов менингит в Пловдивски регион.

Материал и Методи. В петгодишно ретроспективно проучване (2013–2017 г.) се анализираха изолираните от цереброспинална течност пневмококи от пациенти с клинични данни за остър менингит, постъпили за лечение в УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД – Пловдив. За изолирането и идентификацията на бактериите се използваха рутинни микробиологични методи (директна микроскопия и култивиране), латекс-аглутинационни тестове, а също така и мултиплексен PCR (FilmArray). Серотипизирането на пневмококите беше извършено от проф. д-р Л. Сечанова от Катедрата по медицинска микробиология в МУ-София.

Резултати. От изследваните 927 ликвора за проучения период доказахме пневмококи в 22,1 % от всички изолати (n=25). Средната възраст на пациентите беше 49,2 г., във възрастовия интервал 1 – 85 г., като мъжете съставляваха 56 % (n=14), докато жените бяха 44 % (n=11). На 15 от всички изолати се извърши серотипизиране, като най-често се установяваше серотип 3 – в 26,7 % (n=4), следван от серотип 19 A – 13,3 % (n=2). Доказа се по един изолат от неваксиналните пневмококови щамове 18 A/B, 6 A, 9 N. Определиха се и по един от ваксиналните щамове – 9 V, 6 B, 18 C и 19 F при пациенти на възраст над 74 г. и дете на 2 месеца.

Заклучение. *S. pneumoniae* е водещият патоген на бактериален менингит в Пловдивски регион. От доказаните неваксинални серотипове серотип 3 преобладава, следван от 19 A. Мониторингът на серотиповото разпространение на пневмококвите инфекции е от съществено значение, за да се оцени ролята на серотипове, невключени в прилаганата в Република България противопневмокова ваксина (PCV-10), за възникването на пневмококов менингит.

Ключови думи: бактериален менингит, пневмококови серотипове, неваксинални пневмококови щамове

ДИАГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ НА REAL-TIME PCR ЗА *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*

А. Иванова, Н. Цветкова, И. Райнова,
Р. Борисова, М. Виденова, Р. Харизанов, И. Кафтанджиев

Отдел Паразитология и тропическа медицина, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София

Pneumocystis spp. са едноклетъчни еукариотни организми, които се срещат в белите дробове на много бозайници. *P. jirovecii* е причини-

S. PNEUMONIAE SEROTYPE DISTRIBUTION AMONG PATIENTS WITH PNEUMOCOCCAL MENINGITIS IN PLOVDIV REGION

Y. Kalchev^{1,2}, V. Kirina^{1,2}, L. Setchanova³, M. Murdjeva^{1,2}

1. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Plovdiv;
2. Laboratories of Microbiology and Virology, St. George University Hospital-Plovdiv;
3. Department of Medical Microbiology, Medical Faculty, Medical University of Sofia

Aim. To study serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* among patients with pneumococcal meningitis in Plovdiv region.

Material and Methods. A five-year (2013–2017) retrospective survey on *S. pneumoniae* recovered from cerebrospinal fluid in patients with acute meningitis, admitted at the University Hospital “St George” –Plovdiv. Routine microbiological methods (direct microscopy and culturing), latex agglutination test, as well as multiplex PCR (FilmArray) were used for the detection and identification of the bacteria.

Results. *S. pneumoniae* were detected in 22,1 % (n=25) out of all 972 cerebrospinal fluid samples. The mean age of patients was 49,2 years in the age range of 1 – 85 years. Male patients were 56 % (n=14), whereas females – 44 % (n=11). We managed to identify the serotype of 15 out of 25 pneumococci as serotype 3 being the most common 26,7 % (n=4), followed by serotype 19 A 13,3 % (n=2). Non-vaccinal serotypes have been determined such as 18 A/B, 6 A, 9 N. We also found some vaccinal serotypes such as 9 V, 6 B, 18 C и 19 F in several patients above 74 years old and a child aged 2 months.

Conclusion. *S. pneumoniae* was the leading pathogen of bacterial meningitis in Plovdiv region. Non-vaccinal serotypes have been determined as serotype 3 being the most common, followed by serotype 19 A. It is important to monitor the serotype distribution of *S. pneumoniae*. This will be helpful to evaluate the role of serotypes not included in the pneumococcal conjugated vaccine (PCV-10), recommended in Bulgaria, for the development of pneumococcal meningitis.

Key words: bacterial meningitis, pneumococcal serotypes, non-vaccinal pneumococcal strains

DIAGNOSTIC EVALUATION OF REAL-TIME PCR FOR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*

A. Ivanova, N. Tsvetkova, I. Rainova, R. Borisova, M. Videnova, R. Harizanov, I. Kaftandjiev

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

Pneumocystis spp. are unicellular eukaryotic organisms which are found in the lungs of many mammals. *P. jirovecii* is the causative agent of *Pneumo-*

тел на пневмоцистна пневмония (пневмоцистоза), протичаща много тежко при хора с компрометиран имунитет. При имунокомпетентни лица инфекцията, причинена от този патоген, може да протече и като асимптомно носителство, което подпомага разпространението му в популацията.

Специфичната диагноза се основава на идентифицирането на трофозоити и/или цисти на *P. jirovecii* в бронхопулмонални секрети, получени като материал от индуцирана храчка или бронхоалвеоларен лаваж. В ситуации, в които тези две техники не могат да бъдат използвани, може да се наложи прилагане на трансbronхиална или отворена белодробна биопсия.

Цел: Целта на настоящото проучване е да се определят и сравнят чувствителността и специфичността на два широко прилагани лабораторни метода – микроскопско изследване на оцветени по Романовски-Гимза натрипки и real-time PCR за детекция на ДНК на *P. jirovecii*.

Материали/методи: В Националната референтна лаборатория „Диагностика на паразитозите – местни и тропически“, НЦЗПБ са изследвани проби (трахеален аспират и/или индуцирана храчка) на пациенти суспектни за заболяването пневмоцистна пневмония. Пробите са изследвани паралелно чрез микроскопски (препарати, оцветени по Романовски-Гимза) и молекулярно-биологичен (real-time PCR) анализ.

Резултати: Морфопаразитологичните изследвания на оцветени препарати не показаха наличие на трофозоити/цисти на *P. jirovecii*. От същите проби беше изолирана ДНК за провеждане на последваща real-time PCR. Съвпадение с резултатите от микроскопския анализ беше установено при 70% от тях, но при останалите 30% real-time PCR анализът показва наличие на ДНК на търсения патоген.

Заклучение: Молекулярно-биологичните техники за анализ дават допълнителни възможности при диагностиката на различни заболявания. Нашето проучване показва, че real-time PCR методът увеличава откриваемостта на *P. jirovecii* с 30%, като позволява и количествено определяне на патогенния товар.

Ключови думи: *Pneumocystis jirovecii*, real-time PCR, светлинна микроскопия

cystis pneumonia (pneumocystosis), which in immunocompromised persons occurs very severe. In immunocompetent individuals, the infection caused by this pathogen may also occur as an asymptomatic carriage that contributes its spread in the population.

The specific diagnosis is based on the identification of trophozoites and/or cysts of *P. jirovecii* in bronchopulmonary specimens as induced sputum material or bronchoalveolar lavage. In cases where these two techniques cannot be used, transbronchial or open pulmonary biopsy are required.

Aim: The aim of the present study was to identify and compare the sensitivity and specificity of two widely applied laboratory methods – microscopic examination of Romanovsky-Giemsa stained smears and real-time PCR for detection of *P. jirovecii* DNA.

Materials/Methods: Samples (tracheal aspirate and/or induced sputum) from patients with suspected *Pneumocystis pneumonia* were analyzed in the National Reference Laboratory for Diagnosis of Parasitic Diseases at the NCIPD. Samples were examined simultaneously by microscopic (Romanovsky-Giemsa staining) and biomolecular (real-time PCR) analysis.

Results: Microscopic examination of stained smears did not identify the presence of trophozoites/cysts of *P. jirovecii*. DNA was isolated from the same samples and used for subsequent real-time PCR. Confirmation of results obtained by microscopic analysis was found in 70% of them, but in the remaining 30%, real-time PCR analysis showed the presence of DNA from the searched pathogen.

Conclusion: Biomolecular techniques provide additional opportunities for diagnosis of various diseases. Our study indicates that the real-time PCR method has increased the detectability of *P. jirovecii* by 30%, allowing also quantitation of pathogenic load.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, real-time PCR, light microscopy

– 15 –

РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА НЕТУБЕРКУЛОЗНИ МИКОБАКТЕРИИ В СОФИЯ-ГРАД ЗА ПЕРИОД ОТ ЕДНА ГОДИНА

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

Национален център по заразни и паразитни болести

Увод: Нетуберкулозните микобактерии (НТМ) са широко разпространени в околната среда. В световен мащаб се увеличава честотата на тяхната изолация. Те предизвикват белодробна болест, но също така лимфаденити, както и заболявания на кожата и меките тъкани. НТМ изискват продължителна терапия с комбинация от препарати.

Цел на нашата работа е да направим епидемиологична оценка на изолираните НТМ щамове в лабораторията на НРЛ по туберкулоза, 2017г.

Материали и методи: През 2017г. в НРЛ по ТБ, НЦЗПБ са идентифицирани щамове НТМ от 85 пациента, чрез изпълнението на тестовете Geno Type Mycobacterium CM/AS (Hain LifeScience)

Резултати: В НРЛ по туберкулоза, бяха идентифицирани щамове НТМ от 85 пациента. Жените бяха 33 на брой със средна възраст 56 години, а мъжете 52 на брой, средна възраст 53 години.

– 15 –

NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IDENTIFIED IN A METROPOLITAN AREA OF SOFIA CITY FOR ONE YEAR PERIOD

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

National Reference Laboratory of tuberculosis
National Center of Infectious and Parasitic Diseases,

Introduction: Non-tuberculous Mycobacteria (NTM) are widespread in the environment. The frequency, of their isolation is increases worldwide. The most common disease is a lung infection but also lymphadenitis, skin and soft tissues infections. NTM require prolonged therapy with a combination of drugs.

Purpose of the study: is to make an epidemiological assessment of the isolated NTM strains in the NRL of tuberculosis, NCIPD in 2017.

Materials and Methods: In 2017 were isolated NTM strains from 85 patients. The identification was performed using Geno Type Mycobacterium CM/AS (Hain LifeScience)

Results: In NRL of TB were isolated, 85 NTM strains. Females were 33 in number with an average age of 56 years and the men were 52, the average age was 53 years.

Of the investigated clinical materials, only one is extrapulmonary. Other positive for NTM materials are isolated from: sputum 76% (65/85), BAL 12%

От изследваните клинични материали само един беше извънбелогробен. От белогробните преобладават храчките – 76% (65/85), БАЛ – 12% (10/85), СПВ – 8% (7/85), плеврален пунктат и гърлен секрет по 1% (1/85).

Изолирахме *M. avium* 16% (14/85), *M. intracellulare* 15% (13/85), *M. goodii* 22% (19/85), *M. kansasii* 5% (4/85), други бавно растящи НТМ представляват 4% (3/85). Бързорастящите НТМ са 20% (17/85) от които 9% (8/85) са *M. fortuitum*, *M. chelonae* – 8% (7/85) и *M. abscessus* – 2% (2/85). Щамовете определени само до род са 15% (13/85).

Заклучение: Представителите от групата на *M. avium* complex (MAC) са най-често изолираният патоген – 32% (27/85), следвани от бързорастящите НТМ. Тези данни съответстват на епидемиологичната структура на НТМ за респираторни материали в гържите от Европейския регион. Съотношението между видовете в MAC при нас е почти изравнено, докато в европейски мащаб преобладават представителите на *M. avium*.

Благодарности: Това проучване бе проведено благодарение на безвъзмездно предоставените консумативи, реактиви и тестове по програми, финансирани от Глобалния фонд за борба със СПИН, туберкулоза и малария: BUL-607-G02-T, BUL-809-G03-T.

Ключови думи: НТМ, *M. avium*, *M. intracellulare*

– 16 –

КОМБИНИРАНАТА НЕСПЕЦИФИЧНО СТИМУЛИРАНА СЕКРЕЦИЯ НА IL-1, IL-17 И IL-22 РАЗГРАНИЧАВА ЛИЦА С РАЗЛИЧЕН ОТГОВОР КЪМ МТВ ИНФЕКЦИЯ: ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ

Яна Тодорова¹, Радослава Емилова¹, Владимир Миланов²,
Мария Замфирова³, Мария Тюфекчиева³, Тонка Върлева³, Мария
Николова¹

1. Национална референтна лаборатория по Имунология, Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. Клиника по фтизиатрия, Многопрофилна болница за активно лечение на белогробни болести „Света София“, София
3. Програма „Подобряване на устойчивостта на Националната програма по туберкулоза“, Министерство на здравеопазването, София

Увод: Туберкулозата (ТВ) е сред водещите причини за смъртност в световен мащаб. Около една трета от световното население е инфектирано с *M. tuberculosis* (MTB). Широко използваните за диагностика на МТВ инфекцията интерферон-гама базирани тестове (QFT, T-spot) не прогнозируют нейното развитие и необходимостта от специфична терапия. Механизмите на протективен МТВ-специфичен имунен отговор не са изяснени, но данните насочват към няколко ключови ефекторни и регулаторни цитокина, с вероятна патогенетична роля при МТВ инфекция. Цел: Да се характеризира стимулираната продукция на IL-1, IL-17, IL-22 и TNF α при лица с различна ефективност на имунния отговор срещу МТВ.

Материал и методи: Изследвани са 48 проби от: А. QFT(-) клинично здрави лица, в интензивен контакт с МТВ; Б. QFT(+) клинично здрави лица, в интензивен контакт с МТВ и с риск от прогресия; В. QFT(+) лица с активна ТВ инфекция, в сравнение с Г. QFT(-) здрави контроли. Продукцията на IL-1, IL-17, IL-22 и TNF α в периферна кръв е определена след 18 ч. стимулация с фитоHEMAГЛУТИНИН, чрез ELISA (Affymetrix, eBioscience).

Резултати: Стимулираната секреция на IL-1 е значимо по-висока след интензивен контакт с МТВ (групи А, Б и В), съответно: (mean,

(10/85), gastric washings 8% (7/85), pleural punctate and throat swab 1% (1/85).

We isolated *M. avium* 16% (14/85), *M. intracellulare* 15% (13/85), *M. goodii* 22% (19/85), *M. kansasii* 5% (4/85), other slow growing NTM were – 4% (3/85). Rapid growing NTM were 20% (17/85): *M. fortuitum* – 9% (8/85), *M. chelonae* – 8% (7/85) and *M. abscessus* – 2% (2/85). Strains identified only to the genus were 15% (13/85).

Conclusion: *M. avium* complex (MAC) is the most commonly isolated pathogen 32% (27/85), followed by rapid growing NTM. These data reproduce the distribution for respiratory samples of NTM in EU countries. In our results difference from the global was the relationship within MAC species. The isolated *M. avium* and *M. intracellulare* were almost equal, while on a European, the *M. avium* representatives are predominant.

Acknowledgement: This study was possible thanks to the consumables and reagents provided to National Reference Laboratory of Tuberculosis, NCIPD by The Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria: BUL-607-G02-T, BUL-809-G03-T

Keywords: NTM, *M. avium*, *M. intracellulare*

– 16 –

COMBINED NONSPECIFIC STIMULATED SECRETION IL-1, IL-17 AND IL-22 DISTINGUISHES BETWEEN SUBJECTS WITH DIFFERENT RESPONSE TO MTB INFECTION: A PILOT STUDY

Yana Todorova¹, Radoslava Emilova¹, Vladimir Milanov², Mariya
Zamfirova³, Maria Tyufekchieva³, Tonka Varleva³, Maria Nikolova¹

1. National Reference Laboratory of Immunology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia,
2. Clinic of Phthiisiatry, Multiprofile Hospital for Active Treatment of Lung Diseases “St. Sofia”, Sofia
3. Programme „Improving the sustainability of the National Tuberculosis Programme“, Ministry of Health“, Sofia, Bulgaria

Introduction: Tuberculosis (TB) remains one of the leading causes for death worldwide. About one third of the world’s population is infected with *M. tuberculosis* (MTB). The widely used interferon gamma-based assays (QFT, T-SPOT) for diagnosis of MTB infection, do not predict its development and the need of specific therapy. The mechanisms of protective MTB-specific immune responses have not been clarified, but recent data point out several key effector and regulatory cytokines with possible role in the pathogenesis of MTB infection.

Aim: To characterize stimulated production of IL-1, IL-17, IL-22 and TNF- α in subjects with different efficacy of immune response to MTB.

Materials and methods: A total of 48 samples were tested from: A. QFT (-) clinically healthy persons in intensive contact with MTB; B. QFT (+) clinically healthy persons in intensive contact with MTB, with risk of progression; C. QFT (+) patients with active TB, in comparison with D. QFT (-) healthy controls. The production of IL-1, IL-17, IL-22 and TNF- α in peripheral blood was determined after 18 h stimulation with phytoHEMAГЛУТИНИН by ELISA (Affymetrix, eBioscience).

Results: The stimulated IL-1 production increases significantly after intense contact with MTB (groups A, B and C), (mean, pg/ml): 69.3, 49.3 and 44.9 respectively as compared to 25.2 in group D ($p < 0.05$). IL-17 secretion is significantly increased (during intense contact with MTB, in individuals without

pg/ml) 69.3, 49.3 и 44.9 спрямо 25.2 в група Г ($p < 0.05$). Продукцията на IL-17 при лица в интензивен контакт с МТВ и без клинично проявена инфекция (А, Б) е значимо по-висока (mean, pg/ml) 204 и 190.3, в сравнение със здрави контроли (Г) - 70.6 и групата с активна ТВ (В) - 58.8, ($p < 0.05$). Продукцията на IL-22 при лица в интензивен контакт с МТВ и без клинично проявена инфекция (А, Б) е сравнима с тази при здрави контроли (Г) и намалява значимо в условия на активна ТВ (В): (mean, pg/ml) 1072 и 719.2 спрямо 1027 ($p > 0.05$) и 272.1 ($p < 0.05$). Продукцията на TNF- α варира от 28.07 до 1278 pg/ml в изследваните проби, без значими разлики между групите. В група Б установихме две подгрупи по нива на специфично стимулиран IFN- γ (> 5 IU/ml и < 5 IU/ml). Ниската продукция на IFN- γ бе свързана със значимо по-ниски нива на IL-17 и IL-22 ($p < 0.05$) и, вероятно, риск от активиране на МТВ инфекцията.

Заклучение: Комбинираният неспецифично стимулиран IL-1/IL-17/IL-22 профил може да подпомогне дефинирането и прогнозирането на МТВ-специфичен отговор с различна ефективност.

Ключови думи: Цитокини, МТВ инфекция, IGRA-тест

– 17 –

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ
ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ СЕРОТИПОВЕТЕ
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE,
КОЛОНИЗИРАЩИ НАЗОФАРИНКСА НА ДЕЦА,
ВАКСИНИРАНИ С PCV10**

*М. Малчева, И. Симеоновски, В. Левтерова,
Н. Бранкова, И. Филипова, Т. Кантарджиев*

Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ)

Увод: Пневмококова назофарингеална колонизация е относително преобладаваща сред децата през първите няколко години от живота и намалява с възрастта. Основа на типизирането при *S. pneumoniae* е полизахаридната капсула, като през последните десетилетия е изучен генния кластер *cps*, където са гените, участващи в биосинтезата на капсулния полизахарид. Най-важният сред тези гени е *wzy*, а той има множество алотипове, определящи конкретния серотип.

Цел: Целта на настоящото изследване е да се установят серотиповете *S. pneumoniae* колонизиращи здрави деца и деца с респираторни инфекции, ваксинирани с PCV10. Да бъдат проучени молекулярно-генетичните методи за типизиране на различни клинични материали и да бъде характеризирано разпределението на ваксиналните и неваксиналните серотипове при децата.

Материали и методи: Назофарингеални секрети на 190 ваксинирани деца бяха събрани след информираното съгласие на родителите. Пробите бяха взети чрез стерилни тампони и съхранявани в транспортна среда. Извършен беше микробиологичен анализ чрез посевка на кръвен агар и от 54 проби бяха изолирани чисти култури. От всеки тампон беше изолирана ДНК за директно типизиране чрез real-time PCR, а от всяка култура беше изолирана ДНК за типизиране чрез конвенционален PCR. В проучванията се използва конвенционален PCR с 39 двойки праймери за анализ на серотипа и праймери за видовата идентификация *cpsA* и real-time PCR с 23 двойки праймери.

Резултати: При посевка на назофарингеалните секрети 54 броя (28,42%) бяха културелно положителни за *S. pneumoniae*, а при директно изолираната ДНК от секрет – 85 броя (44,74%) от пробите бяха положителни за пневмококи след скрининг с гени *cpsA* и *lytA*. Общо положителни

clinical signs infection (A, B) (mean, pg/ml) 204 and 190.3, as compared to healthy controls (D), 70.6 and the group with active TB, (C), 58.8, ($p < 0.05$). Stimulated IL-22 production in subjects from groups A and B is comparable to healthy controls (D) and decreased significantly in patients with active TB (C) (mean, pg/ml) :1072, 719.2 vs. 1027 ($p > 0.05$) and vs. 272.1 ($p < 0.05$). Production of TNF- α varies from 28.07 to 1278 pg/ml in the test samples without significant differences between groups. In group C, two subgroups were defined according to the level of MTB-stimulated IFN- γ (> 5 IU/ml, and < 5 IU/ml). Low IFN- γ production was associated with significantly lower levels of IL-17 and IL-22 ($p < 0.05$) and, possibly, increased risk of activation of MTB infection.

Conclusion: The combined non-specifically stimulated IL-1/IL-17/IL-22 profile may contribute to the definition and prognosis of MTB-specific immune response with different efficacy.

Key words: cytokines, MTB infection, IGRA-test

– 17 –

**MOLECULAR-BIOLOGICAL STUDIES
ON STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
SEROTYPES COLONIZING
THE NASOPHARYNX OF CHILDREN
VACCINATED WITH PCV10**

*M. Malcheva, I. Simeonovski, V. Levterova,
N. Brankova, I. Philipova, T. Kantardjiev*

National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)

Introduction: Pneumococcal nasopharyngeal colonization is relatively predominant among children during the first few years of life and decreases with age. The basis for the typing of *S. pneumoniae* is the polysaccharide capsule, and the gene cluster *cps*, where the genes involved in the biosynthesis of the capsular polysaccharide, have been studied over the last decades. The most important of these genes is *wzy*, and it has many allotypes defining the particular serotype.

Objective: Pneumococcal nasopharyngeal colonization is relatively prevalent among children in the first few years of life and decreases with age. The aim of the present study is to establish serotypes of *S. pneumoniae* colonizing healthy children and children with respiratory infections vaccinated with PCV10. To investigate molecular-genetic methods for typing different clinical materials and to characterize the distribution of vaccine and non-vaccine serotypes in children.

Materials and Methods: Nasopharyngeal secretions of 190 vaccinated children were collected with an informed consent of from the parents. Samples were taken via a sterile swab and stored in a transport media. A microbiological analysis was performed by culture in blood agar and 54 pure cultures were isolated. Direct DNA typing was done from each swab by real-time PCR, and DNA was isolated from each culture for typing by conventional PCR. The studies used a conventional PCR with 39 pairs of primers grouped in 13 serotype multiplex serotype and primers for *cpsA* and *lytA* and real-time PCR with 23 pairs of primers.

Results: From all of the nasopharyngeal secretions 54 (28.42%) were culture positive for *S. pneumoniae*, and in the case of directly isolated DNA, 85 samples (44.74%) were positive for *S. pneumoniae* on *cpsA* genes and *lytA*. The total positive DNA samples were 139 (73.16%), of which 137 were sero-

те ДНК проби бяха 139 (73,16%), от тях 137 бяха типизирани, а 2 проби (1,29%) бяха нетипизирани за наличните праймери. Разпределението на положителните проби по серотипове/серогрупи е съответно: серотип 3 (16,13%); серогрупа 6 A/B/C/D (11,61%); серогрупа 24 A/B/F (10,32%); серотип 4 (8,39%); серотип 19A (7,74%); серогрупа 12F/A/B/44/46 (5,16%); серогрупа 18A/B/C/F (5,16%); серогрупа 15B/C (3,87%); серотип 23F (3,87%); серогрупа 10F/C (3,23%); серогрупа 11A/D (3,23%); серогрупа 9A/V (3,23%); серогрупа 9N/L (2,58%); серотип 19F (2,58%); серотип 23B (2,58%); серогрупа 35F/47F (2,58%); серогрупа 15 A/F (1,29%); серотип 23A (1,29%); серотип 2 (0,65%); серотип 10A (0,65%); серотип 21 (0,65%); серотип 10B (0,65%); серотип 17F (0,65%); серотип 39F (0,65%);

Заклучение: Изследваните назофарингеални секрети бяха типизирани чрез конвенционален PCR и real-time PCR. Беше установено разпределението на 24 вида серотипа/серогрупи при здрави деца и деца с инфекция на горните дихателни пътища, ваксинирани с PCV10. Не беше установена зависимост на серотиповете *S. pneumoniae* при здрави и болни деца. Разпространението на ваксинални серотипове от PCV10 в пробите беше установено съответно за серотип 4, 23F и 19F общо 15% от положителните проби. След типизирането на проби от серогрупи 6A/B/C/D, 9A/V и 18A/B/C/F в изследването, те не бяха диференцирани като ваксинални или неваксинални серотипове – 20% от положителните проби. Установен беше висок процент на носителството на неваксинални серогрупи/серотипове – 65% от всички проби, положителни за *S. pneumoniae*.

Ключови думи: пневмококово носителство, PCR, PCV10

– 18 –

ОЦЕНКА НА ВЪЗМОЖНОСТИТЕ НА ИНДИВИДУАЛНИТЕ ДАННИ, НАЛИЧНИ В НАЦИОНАЛНАТА РЕФЕРЕНТНА ЛАБОРАТОРИЯ ПО „МОЛЕКУЛЯРНА МИКРОБИОЛОГИЯ”, ЗА ПОДОБРЯВАНЕ НА НАДЗОРА НА КОКЛЮШВ БЪЛГАРИЯ

Савина Стойцова¹, Иво Георгиев¹, Надя Бранкова²,
Надежда Владимировна¹, Антоанета Минкова¹,
Виктория Левтерова², Анна Курчатова¹

1. Отдел „Епидемиология“, Национален център по заразни и паразитни болести, България
2. Национална референтна лаборатория по „Молекулярна микробиология“, Национален център по заразни и паразитни болести, България

ВЪВЕДЕНИЕ

Надзорът на коклюшв България се основава на агрегирани данни по области. На национално ниво не се получава рутинна информация за имунизации, дата на начало на симптомите и адрес по местожителство. Националната референтна лаборатория по „Молекулярна микробиология“ (НРЛММ) в Националния център по заразни и паразитни болести провежда лабораторна диагностика (PCR) на *B. pertussis*. Пробите се изпращат от цялата страна до НРЛММ заедно индивидуални данни. Изследвахме пълнотата на данните, налични в НРЛММ, за да оценим доколко могат да подобрят възможността на национално ниво за анализ на ваксиналния статус на случаите и за навременно разпознаване на времево-пространствено свързани случаи (възможни взривове).

Материали и методи. Създадена е криптирана база данни с наличните в НРЛММ демографски, клинични, имунизационни и лабораторни данни за симптоматичните пациенти, чиито проби са изследвани за *B. pertussis* през 2017 г. Данните са комбинирани за получаване на про-

typed and 2 samples (1.29%) were nontypable for the primers available. The distribution of positive serotype/serogroup samples is: serotype 3 (16.13%); serogroup 6 A/B/C/D (11.61%); serogroup 24 A/B/F (10.32%); serotype 4 (8.39%); serotype 19A (7.74%); serogroup 12F/A/B/44/46 (5.16%); serogroup 18A/B/C/F (5.16%); serogroup 15B/C (3.87%); serotype 23F (3.87%); serogroup 10F/C (3.23%); serogroup 11A/D (3.23%); serogroup 9A/V (3.23%); serogroup 9N/L (2.58%); serotype 19F (2.58%); serotype 23B (2.58%); serogroup 35F/47F (2.58%); serogroup 15 A/F (1.29%); serotype 23A (1.29%); serotype 2 (0.65%); serotype 10A (0.65%); serotype 21 (0.65%); serotype 10B (0.65%); serotype 17F (0.65%); serotype 39F (0.65%);

Conclusion: The nasopharyngeal secretions tested were serotyped by conventional PCR and real-time PCR, the distribution of 24 serotypes/serogroups in healthy children and children with upper respiratory tract infection vaccinated with PCV10 was established. There was no correlation between *S. pneumoniae* serotypes in healthy and sick children. The prevalence of vaccine serotypes from PCV10 in the samples was found for serotype 4, 23F and 19F, respectively, in total of 15% of the positive samples. Following the serogroups 6 A/B/C/D, 9A/V and 18A/B/C/F serogroups, they were not differentiated as vaccine or non-vaccinated serotypes – 20% of the positive samples. A high percentage of non-vaccine serotypes/ serogroups have been found – 65% of all *S. pneumoniae* positive specimens.

Keywords: pneumococcal carriage, PCR, PCV10

– 18 –

EVALUATION OF THE POTENTIAL OF CASE-BASED DATA FROM THE NATIONAL REFERENCE LABORATORY OF MOLECULAR MICROBIOLOGY TO COMPLEMENT PERTUSSIS SURVEILLANCE IN BULGARIA

Savina Stoitsova¹, Ivo Georgiev¹, Nadia Brankova²,
Nadezhda Vladimirova¹, Antoaneta Minkova¹,
Viktoria Levterova², Anna Kurchatova¹

1. Department of Epidemiology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Bulgaria
2. National Reference Laboratory for Molecular Biology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Bulgaria

INTRODUCTION

In Bulgaria, pertussis surveillance is based on aggregate reporting by region. No information on vaccination status, date of onset or city/address of residence is received through routine surveillance at the national level. The National Reference Laboratory of Molecular Microbiology (NRLMM) at the National Centre of Infectious and Parasitic Diseases provides laboratory diagnosis (PCR) of *Bordetella pertussis*. Samples arrive at NRLMM from the whole country, together with some case-based information. This study aims to evaluate the completeness of the information, available at NRLMM, in order to assess its potential to improve the capacity to analyze case vaccination status and detect spatio-temporal disease clusters (possible outbreaks) in a timely manner at the national level.

Materials and methods. We created an encrypted database including demographic, clinical, immunization, and laboratory result information on all symptomatic suspect cases, whose samples were sent to NRLMM in 2017 with a request for a *B. Pertussis* test. We derived date of onset, city and latitude/longitude of residence, and vaccination status, and calculated completeness of these variables.

менливите „дата на начало на симптомите“, „град“ и „географски координати“ на адреса по местожителството, и „наличие на имунизация срещу *B. pertussis*“. Изчислена е пълнотата на тези променливи.

Резултати. Обобщени са предварителните резултати от 144 пациента (проби, получени до 09.08.2017 г.), 43 (30%) от които са с положителни резултати за *B. pertussis* (PCR+). Данни за наличие/липса на имунизация има при 114 (79%) от всички пациенти и 27 (63%) от PCR+ пациенти. Дата на начало на симптомите е получена при 111 (77%) от всички и 29 (67%) от PCR+ пациенти. „Град на местоживеене“ е наличен при 128 (89%) от всички и 37 (86%) от PCR+ пациенти. Географски координати са получени при 74 (51%) от всички и 16 (37%) от PCR+ пациенти.

Заклучение. Индивидуалните данни налични в НРАММ предоставят възможност за допълване на епидемиологичния надзор на *B. pertussis*. Увеличаването на пълнотата на информацията (особено тази за PCR+ пациенти), би могло значително да подобри епидемиологичната стойност на тази информация.

Ключови думи: коклюш, епидемиологичен надзор, България

– 19 –

МОНИТОРИНГ НА СПЕЦИФИЧНИ АНТИТОКСОПЛАЗМЕНИ АНТИТЕЛА ПРИ БРЕМЕННО ЖЕНИ

*Р. Борисова, Н. Цветкова, Р. Харизанов,
И. Кафтанджиев, А. Иванова, И. Райнова*

Отдел Паразитология и тропическа медицина, Национален център по заразни и паразитни болести (НЗЦПБ), София

Токсоплазмозата е протозооза, която при бременни жени може да засегне плода и да причини аборт или вродена инфекция у новороденото. Основните методи за диагностика на заболяването са имунологични и молекулярно-биологични. Необходимостта от лечение, терапевтичното поведение и броят на лечебните курсове са в тясна зависимост от получените серологични резултати.

Целта на настоящето проучване е да представим нашия опит и поведение в диагностиката на токсоплазмоза свързана с бременността.

Материали/методи: За периода 2014–2017 г. са обхванати 373 бременни жени. Методите, които сме използвали са имунологични – ELISA IgG, IgM, IgA, IgG avidity и молекулярно-биологични методи – PCR.

Резултати: Рутинната диагностика на токсоплазмозата се базира главно на серологично откриване на специфични антитоксоплазмени IgG, IgM и IgA антитела. Настоящото изследване има за цел да анализира данните за нивата на специфичните анти-*T. gondii* IgG, IgM, IgA имуноглобулини и на IgG авидитета при бременни жени, изследвани в Националната референтна лаборатория (НРЛ) „Диагностика на паразитозите“, НЗЦПБ, между 2014–2017 г. В проучването са включени 373 бременни жени на възраст 16–44 г. изследвани по програмата за майчино здравеопазване или по тяхно желание. Серумите са анализирани с PLATELIA™Toxo IgG, IgM и IgA, и IgG авидитет (BIO-RAD) китове. Установената честота на разпространение на различните видове анти-*T. gondii* имуноглобулинови класове е както следва: IgG (+), IgM (+) – 21.17 % (n = 79); IgG (+), IgM (+) IgA (+) – 6,70 % (n = 25) и нисък IgG авидитет – 32.25% (n = 20).

Заклучение: Измерванията на нивата на специфичните анти-*T. gondii* IgM, IgA антитела и на IgG авидитета предоставят необходима клинична информация за оценка на първичната инфекция с *T. gondii*, и съответно определят подходящото терапевтично поведение или контролно наблюдение за всеки отделен случай.

Ключови думи: токсоплазмоза, имунологична диагностика

Results. Preliminary results from 144 patients (samples submitted until 09/08/2017) are summarized here. 43 (30%) were PCR+ for *B. pertussis*. Information about vaccination status (any dose received) was available for 114 (79%) of all patients and for 27 (63%) of the PCR+ patients. Date of onset could be derived for 111 (77%) of all and 29 (67%) of PCR+ patients. City of residence was available for 128 (89%) of all and 37 (86%) of PCR+ patients. Latitude/longitude of address could be derived for 74 (51%) of all and 16 (37%) of PCR+ patients.

Conclusion. NRLMM collects valuable case-based information, which holds the potential to complement surveillance. Increasing variable completeness, especially for PCR+ patients, may significantly improve the epidemiological value of the available information.

Keywords: pertussis, epidemiological surveillance, Bulgaria

– 19 –

MONITORING OF SPECIFIC ANTI-TOXOPLASMIC ANTIBODIES IN PREGNANT WOMEN

*R. Borisova, N. Tsvetkova, R. Harizanov,
I. Kaftandjiev, A. Ivanova, I. Rainova*

Toxoplasmosis is a protozoan disease which, in pregnant women, can affect the fetus and to cause abortion or congenital infection in the newborn. The basic methods for diagnosis of the disease are immunological and biomolecular. The need from therapy and the therapeutic approach are closely related to the serological results.

Aim of this study is to present our experience and approaches in the diagnosis and treatment of pregnancy-related toxoplasmosis.

Materials and Methods: For the period 2014–2017, 373 pregnant women were covered. We used immunological methods, ELISA IgG, IgM, IgA, IgG avidity and biomolecular methods- (PCR).

Results: Routine diagnosis of toxoplasmosis relies mainly on detection of *Toxoplasma*- specific IgG, IgM and IgA in serum samples. The current study aimed to analyze the data on anti-*T. gondii* specific IgG, IgM, IgA immunoglobulins and IgG avidity levels in pregnant women examined in the National Reference Laboratory (NRL) for Diagnosis of Parasitic Diseases at NCIPD between 2014–2016. In the study included 301 pregnant women either with suspected toxoplasmosis or tested by their own, aged 16–44 years. Sera samples were analyzed with PLATELIA™Toxo IgG, IgM and IgA kits, and IgG Avidity (BIO-RAD) kit. The established frequency of distribution of different types of anti-*T. gondii* immunoglobulin classes was as follows: IgG (+), IgM (+) – 21.17 % (n = 79); IgG (+), IgM (+) IgA (+) – 6,70 % (n = 25) and low IgG avidity – 32.25% (n = 20).

Conclusion: The measurements of anti-*T. gondii* specific IgM, IgA and IgG avidity levels provide useful clinical information for primary *T. gondii* infection evaluation and respectively determine the appropriate therapeutic approach or monitoring on a case-by-case basis.

Keywords: toxoplasmosis, immunological diagnosis

БОЛЕСТНОСТ ОТ КИСТНА ЕХИНОКОКОЗА В ЮГОИЗТОЧНИЯ РОДОПСКИ РЕГИОН НА БЪЛГАРИЯ – РЕЗУЛТАТИ ОТ УЛТРАЗВУКОВО ПРОУЧВАНЕ

Марин Мухтаров¹, Искра Райнова²

- 1 Гастроентерологично отделение, Многопрофилна болница активно лечение „Кърджали“, Кърджали, България
- 2 Отдел „Паразитология и тропическа медицина“, Национален център по заразни паразитни болести, София, България

Цел: Кистната ехинококоза (КЕ) е сериозен проблем за общественото здравеопазване в България. Средната заболяемост от КЕ през 2004–2013 г. за югоизточния родопски регион (областите Кърджали, Смолян и Хасково) е 7,07‰ и е значително по-висока от тази за страната (4,98‰). Тези данни не разкриват реалната заболяемост. Целта на проучването е да установим разпространението на КЕ сред лица от 8 села от региона с данни за по-често регистриране на случаи с КЕ и при рискови групи.

Материал и методи: От януари до декември 2014 г. осъществихме популяционен ултразвуков скрининг на 1051 доброволци – 559 (53,19%) жени и 492 (46,81%) мъже на възраст от 1 до 88 г. На всички проведохме анкетно проучване, абдоминална ехография, а при 119 серологично изследване с ELISA. Типът на ехинококовата киста определихме по Ултразвуковата класификация на неформалната работна група по ехинококозата към СЗО (*WHO-IWGE*).

Резултати: При **29 (2,76%)** лица без клинични симптоми ехографски установихме лезии, които отговарят на Ултразвуковата класификация на *WHO-IWGE*. CL тип лезии са **23 (2,19%)**, а при **6** лица (**0,6%**) установихме кисти с патогномонична ехографска характеристика за КЕ. От тях, положителен резултат в ELISA получихме при тези с тип на кистите CE1 и CE2, докато тези с типове CE4 и CE5 бяха негативни. Установихме моментната ехографска болестност от КЕ – **0,6%** и моментната обща болестност от КЕ – **1,52%**.

Заклучение: Моментна ехографската болестност от 0,6% и резултатите от имунологичните изследвания, показват наличие на недиагностицирани случаи с КЕ, което потвърждава необходимостта от разширяване на скрининга.

Ключови думи: Кистна ехинококоза, ултразвуков скрининг, *ELISA*

PCR В ДИАГНОСТИКАТА НА ТОКСОКАРОЗАТА

Е. Кънева, Н. Цветкова, И. Райнова

Отдел „Паразитология и тропическа медицина“, НЦЗПБ, София

Токсокарозата е паразитно зоонозно заболяване, причинявано от миграция на нематодни ларви на *Toxocara canis* и *T. cati* в организма на човека. Основните методи за диагностика са серологичните (*ELISA* и като потвърдителен *W. blot*), които обаче не дават информация за вида на причинителя. Разграничаването на видовете на *Toxocara spp.* само по техните яйца е трудно, поради тяхната морфологична и генетичност.

Поради ограниченията на традиционните (морфологични) методи за точна видова идентификация на *Toxocara spp.* се прилагат различни

THE PREVALENCE OF CYSTIC ECHINOCOCCOSIS IN SOUTHEASTERN RHODOPE REGION OF BULGARIA – RESULTS FROM ULTRASOUND SURVEY

Marin Muhtarov¹, Iskra Rainova²

- 1 Gastroenterology Ward, Multi-Profile Hospital for Active Treatment “Kardzhali,” Kardzhali, Bulgaria
- 2 Department of Parasitology and Tropical Medicine, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

Aim: Cystic echinococcosis (CE) is a serious problem for the public healthcare in Bulgaria. The average incidence in 2004–2013, from CE in the Southeastern Rhodope region, including the districts of Kardzhali, Haskovo and Smolyan was 7.07/100,000 – significantly higher than the average incidence in Bulgaria (4.98/100,000). These data do not reveal the actual morbidity. The aim of the study is to determine the prevalence among individuals from 8 villages from the region with data for more CE cases and risk groups in the region.

Material and methods: From January till December 2014 population ultrasound based screening was performed in 1051 volunteers including 559 (53.19%) females and 492 (46.81%) males, aged from 1 to 88 years. All underwent a questionnaire survey, abdominal ultrasound (US) examination and ELISA was performed in 119 patients. The WHO-Infomal Working Group on Echinococcosis (*WHO-IWGE*) ultrasound classification of CE was used.

Results: we found US cystic lesions that meet WHO-classification in **29 (2.76%)** individuals without clinical symptoms. Type CL were **23 (2.19%)** while in **6** persons (**0.6%**) we found US pathognomonic cysts for CE. Of these, a positive results in ELISA was found in type CE1 and CE2 cysts, while type CE4 and CE5 cysts were negative. We found the US CE prevalence to be **0.6%**, while the total prevalence of CE (new and existing cases) was **1.52%**.

Conclusions: the CE prevalence of 0.6% and results of immunological studies, indicate the presence of undiagnosed CE cases in the Southeastern Rhodope region of Bulgaria demanding further screening investigations.

Key words: *Cystic echinococcosis, Ultrasound screening, ELISA*

PCR IN THE DIAGNOSIS OF TOXOCARIASIS

E. Kaneva, N. Tsvetkova, I. Rainova

Department of Parasitology and Tropical Medicine, NCIPD, Sofia

Toxocariasis is a zoonotic parasitic disease caused by the migration of *Toxocara canis* and *T. cati* nematode larvae in the human body. Serological methods (such as *ELISA* and confirmatory test *Western blot*) are the main diagnostic methods used in routine practice which however did not provide information on the type of the causative agent. Discrimination between *Toxocara* species on the basis of their egg's morphology is difficult because they are indistinguishable. Due to the limitation of traditional (morphological) methods for exact *Toxocara* species identification various DNA-based methods, in particular PCR techniques, are used because of their high sensitivity and specificity.

ДНК-базираны методи, в частност, PCR техники, поради тяхната висока чувствителност и специфичност.

Целта на настоящата разработка е апробиране на PCR метод за детекция на различни паразитни форми на *T. canis* – яйца, ларви и възрастни паразити. От зрелите форми, получени след обезпаразитяване на малки кученца, са получени яйца, част от които са ембрионирани 30 дни в 1% неутрален формалин за получаване на ларви от втори стадий. За екстракция на ДНК е използван търговски кит. Праймерите (Tcan/NC2 и Tcat/NC2) разпознават специфична секвенция в региона на вътрешния транскрибируем спейсър 2 (ITS2) на *Toxocara* spp. Продуктите на реакцията с големина ~380 bp (за *T. canis*) са сепарирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел, оцветен с етидиев бромид. Визуализирането е осъществено по UV светлина.

Получените резултати показват, че разработеният генетичен метод е специфичен за определяне на *T. canis* – яйца и ларви. Методът може да намери приложение за разграничаване на представителите на род *Toxocara* на видово ниво, както и за детекция на паразитни ларви, изолирани от човешки тъкани, което има важно значение за провеждането на подходящо лечение и ефективен контрол на заболяването.

Ключови думи: токсокароза, PCR, *Toxocara* spp., видова идентификация

– 22 –

ЧУМА И КОНТРОЛ НА НЕЙНИТЕ ВЕКТОРИ

N. Mitkova, S. Bukovska, R. Nenova, I. Tomova

Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗГБ)

Чумата е опасна зооантропоноза, разпространена в ендемични райони на Африка, Азия и Ю. Америка. Пореден голям взрив на заболяването наблюдаваме от месец август 2017 г. на остров Мадагаскар. До края на месец ноември болните са 2417. Особености на настоящия взрив са: преимуществено засягане на градски райони, включително столицата Антананариво и преобладаване на тежката белодробна чума (77%). Разнообразните пътища на предаване на инфекцията, включително и чрез вектори създават опасност от бързо и широко разпространение на инфекцията. За този процес реално могат да допринесат и съвременните транспортни комуникации. Това крие реална опасност от внос на инфекцията в райони и страни, в които тя не се среща.

Предвид важната роля на бълхите в епидемичната верига на чумата, от значение за прекъсването на трансмисията е провеждането на комплекс от мерки свързани с контрола върху числеността на насекомите. В тази връзка на доклада ще бъдат представени указанията за провеждане на дезинсекции в България съгласно нормативната база, както и разрешените за употреба биоциди и репеленти.

Ключови думи: чума, бълхи, репеленти

The purpose of the present study was the approbation of PCR method for detection of various *T. canis* forms – eggs, larvae and adult parasites. Eggs were extracted from mature forms obtained after deworming puppies. Some of the eggs were embryonated in 1% neutral formalin for 30 days to obtain second-stage larvae. A commercially available kit was used for DNA extraction. Primers (Tcan/NC2 and Tcat/NC2) recognize a specific sequence in the internal transcribed spacer 2 region (ITS2) of *Toxocara* spp. The ~380 bp amplification products (for *T. canis*) were separated by electrophoresis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Visualization was performed under UV light.

The obtained results indicate that the developed genetic method is specific for identification of *T. canis* – eggs and larvae. It can be used both for distinguishing species in the genus *Toxocara* and detection of parasitic larvae isolated from human tissues, which is important for proper treatment and effective control of the disease.

Key words: Toxocariasis, PCR, *Toxocara* spp., species identification

– 22 –

THE PLAGUE AND CONTROL ITS VECTORS

N. Mitkova, S. Bukovska, R. Nenova, I. Tomova

National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)

Plague is dangerous zoonotic in Africa, Asia and South America. Since August 2017 the next large outbreak of this disease has been observed on the island of Madagascar. Until the end of November 2417 human cases were reported.

The main features of the current outbreak are: predominantly affecting of urban areas including capital of Antananarivo, as well as prevalence of severe pneumonic cases (77 %).

Different routes of transmitting infection, including vectors pose a risk of rapid and large spread of the infection. The modern transport communications can also contribute to this process. This poses a real risk of importing the infection in regions and countries where the plague normally does not occur.

Given the important role of the fleas as vectors of plague it is relevant control measures against insect population density to be conducted. In regard to this, the Bulgarian guidelines for disinsection, as well as the authorized biocidal products and repellents will be present in this report.

Keywords: plague, fleas, repellents

СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ПРЕОБЛАДАВАЩИТЕ HIV-1 СУБТИПОВЕ И КОИНФЕКЦИИТЕ С HBV И HCV ПРИ ИНТРАВЕНОЗНИТЕ НАРКОМАНИ В БЪЛГАРИЯ (ПРЕДВАРИТЕЛЕН АНАЛИЗ)

Даниела Сиракова¹, Ренета Димитрова¹, ЛораНиколова¹,
Ася Костадинова¹, Анна Ганчева¹, Тенчо Тенев²,
Елица Голкочева-Маркова², Диляна Трандева-Банкова²,
Ивайло Еленков³, Нина Янчева³, Мариана Стойчева⁴,
Цеца Дойчинова⁵, Лилия Пекова⁶, Ивелина Тодорова⁷,
Ивайло Алексиев¹

1. Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България,
2. Национална референтна лаборатория „Хепатитни вируси“, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България,
3. Специализирана болница по заразни и паразитни болести, София, България,
4. Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Пловдив, България,
5. Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Плевен, България,
6. Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Стара Загора, България,
7. Университетска болница „Св. Марина“, Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Варна, България.

Цели: От създаването на лабораторията НРПЛ по HIV към НЦЗПБ – 1986 г. до 2017 г. Включително са регистрирани 495 лица, спадащи към групата на интравенозните наркомани (ИВН). Този брой съставлява 18% от всички, регистрирани HIV/СПИН пациенти в България. За цел си поставихме да установим генетичното разнообразие на HIV-1 и коинфекциите с HBV и/или HCV сред трансмисионната група на ИВН.

Материали и методи: За осъществяване на целта бяха анализирани 228 (46%) секвенци от 495 инфектирани с HIV-1 ИВН в България. Генотипният анализ бе извършен чрез секвениране на *pol* гена, като HIV-1 *pol* секвенциите бяха получени с TruGene и/или ViroSeq Genotyping Systems и последващо анализирани посредством COMET 2.2. Изследванията за вирусни хепатити са извършени по метода ELISA, като проба от всеки пациент е тествана за наличие на HBV и HCV маркери.

Резултати: Епидемиологичните данни показват превес на мъжете (85%) спрямо жените (15%) в изследваната група. Беше установено, че най-разпространеният субтип сред ИВН е CRF01_AE – 46%, следван от CRF02_AG – 34%, субтип B – 11% и други субтипа или неклассифицирани форми. Преобладаващите субтипове са с неравномерно географско разпространение. В област София доминира CRF01_AE – 71%, а преобладаващ субтип за област Пловдив е CRF02_AG с 96%. Значителна част от ИВН са коинфектирани с HBV и/или HCV като 258/285 (90,5%) имат HCV, а 43/265 (16,2%) са положителни за HBV. С тройна коинфекция са 36/246 (14,6%) от лицата.

Заклучение: Нашият анализ установи доминирането на три основни HIV-1 субтипа сред ИВН и тяхното неравномерно разпределение сред различните географски региони на страната, което показва поне две отделни локални епидемии. Получените резултати от НРПЛ по HIV показват необходимостта от подробно молекулярно-епидемиологично наблюдение на HIV-1 в България за по-детайлно разбиране на епидемията в страната.

Ключови думи: HIV, интравенозни наркомани (ИВН), субтип

COMPARATIVE ANALYSIS OF PREDOMINANT HIV-1 SUBTYPES AND COINFECTIONS WITH HBV AND HCV AT INTRAVENOUS DRUG USERS IN BULGARIA (PRELIMINARY ANALYSIS)

Daniela Sirakova¹, Reneta Dimitrova¹, Lora Nikolova¹,
Asya Kostadinova¹, Anna Gancheva¹, Tencho Tenev²,
Elica Golkocheva-Markova², Dilyana Trandeva-Bankova²,
Ivaylo Elenkov³, Nina Yancheva³, Maryana Stoycheva⁴,
Tsetsa Doychinova⁵, Lilia Pekova⁶, Ivelina Todorova⁷, Ivailo Alexiev¹

1. National Reference Confirmatory Laboratory of HIV, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria,
2. NRL Hepatitis viruses, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria,
3. Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria,
4. Department of Infectious Diseases, Medical University, Plovdiv, Bulgaria,
5. Department of Infectious Diseases, Medical University, Plevn, Bulgaria,
6. Clinic of Infectious diseases, University Hospital, Stara Zagora, Bulgaria,
7. University hospital St. Marina, Varna, Bulgaria.

Objectives: 495 intravenous drug users (IDUs) have been registered since the establishment of the National Reference Confirmatory Laboratory of HIV at the NCIPD – 1986 till 2017. This number represents 18% of all registered HIV/AIDS patients in Bulgaria. The aim of this study is to determinate the genetic diversity of HIV-1 and HBV and/or HCV coinfections among IDUs transmission group.

Materials and Methods: In this study we analyzed 228 (47%) of 495 HIV-1 infected IDU in Bulgaria to achieve our goal. Genotypic analysis was accomplished by sequencing the *pol* gene. HIV-1 *pol* sequences were being obtained with TruGene and/or ViroSeq Genotyping Systems and subsequent analysis by COMET 2.2. Viral hepatitis testing was accomplished by the ELISA method, with each patient was being tested for HBV and HCV markers.

Results: Epidemiological data shows male prevalence (85%) versus female (15%) in the study group. It was found that the most prevalent subtype among IDUs is CRF01_AE – 46%, followed by CRF02_AG – 34%, subtype B – 11%, and other subtypes or unclassified forms. The most frequent subtypes are unevenly geographically distributed. In Sofia region, CRF01_AE dominates – 71%, and the predominant subtype for Plovdiv region is CRF02_AG with 96%. A significant proportion of IDUs were coinfecting with HBV and/or HCV, as 258/285 (90.5%) possess HCV and 43/265 (16.2%) patients are positive for HBV. Triple coinfection was obtained in 36/246 (14.6%) of the persons.

Conclusions: Our analysis found the dominance of three major HIV-1 subtypes among IDUs and their uneven distribution across the different geographic regions of the country. It also reveals at least two distinct local epidemics. Accomplished resulted by the National Reference Confirmatory Laboratory of HIV indicated necessity detailed molecular epidemiological surveillance of HIV-1 in Bulgaria for better understanding of the epidemic in the country.

Keywords: HIV, intravenous drug users, subtype

ВИРУСОЛОГИЧЕН МОНИТОРИНГ НА HIV/СПИН ПРИ БРЕМЕННИ И НОВОРОДЕНИ ДЕЦА В БЪЛГАРИЯ (ПРЕДВАРИТЕЛЕН АНАЛИЗ)

Ася Костадинова¹, Ренета Димитрова¹, Лора Николова¹,
Даниела Сиракова¹, Анна Ганчева¹, Ивайло Еленков²,
Нина Янчева², Мариана Стойчева³, Цеца Дойчинова⁴,
Лилия Пекова⁵, Ивелина Тодорова⁶ и Ивайло Алексиев¹

1. Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България,
2. Специализирана болница по заразни и паразитни болести, София, България,
3. Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Пловдив, България,
4. Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Плевен, България,
5. Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Стара Загора, България,
6. Университетска болница „Св. Марина“, Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Варна, България.

Цели: До 2017 г. в България са били диагностицирани 2691 случаи с HIV, като броят на жените е 568, от тях 73 са били диагностицирани по време на бременността. Целта на нашето проучване е да се анализира трансмисията на HIV при бременните и техните новородени.

Материали и Методи: За епидемиологичния анализ са използвани данни на НРПЛ 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 вирусологичния мониторинг. HIV-1 секвенциите бяха анализирани с помощта на Интернет базирани инструменти REGAv3, COMET v2.2. и Stanford DB.

Резултати: От всички 137 майки с HIV, регистрирани до края на 2017 г., 14 нямат изследвания за вирусен товар (ВТ), 46 са били на проследяване за ВТ, а 36 са с ВТ < 40 к/мл. Повечето от майките с HIV са от областите София – 49, 17 от Пловдив, 10 от Варна, а 61 са от други региони на страната. Броят на новородените е 175, като 27 (15%) от тях са инфектирани с HIV-1. **Майките са били изследвани преди или по време на бременността и при 13 (9,5%) от тях се установяват резистентни мутации към PI, при 8 към NRTI и при 9 към NNRTI**, а при 9 от тях е установено наличие на резистентни мутации към повече от 1 клас АРТ медикаменти. Нашето проучване показва голямо генетично разнообразие от различни субтипове и рекомбинантни форми, като най-голямо разпространение в изследваната група имат не-B HIV-1 субтиповете, доминирани от CRF01_AE с 37.1%, следван от субтип B с 28.6%. Бяха установени още няколко други щамове: C, CRF02_AG, CRF05_DF, CRF14_BG и URFs.

Заклучения: Анализът показва голямо генетично разнообразие на HIV-1 сред изследваната група. Нашето проучване установи, че висок процент новородени са били инфектирани с HIV-1. Ранното диагностициране на всички бременни с HIV и навременно започване на АРТ терапия, би могло да намали риска от предаване на HIV инфекцията на техните новородени.

Ключови думи: HIV/СПИН, вертикална трансмисия, субтипове.

VIROLOGICAL MONITORING OF HIV/AIDS IN PREGNANT WOMEN AND NEWBORN CHILDREN IN BULGARIA (PRELIMINARY ANALYSIS)

Asya Kostadinova¹, Reneta Dimitrova¹, Lora Nikolova¹, Daniela Sirakova¹, Anna Gancheva¹, Ivaylo Elenkov², Nina Yancheva², Mariyana Stoycheva³, Tsetsa Doychinova⁴, Liliya Pekova⁵, Ivelina Todorova⁶ and Ivailo Alexiev¹

1. National Reference Conformatory Laboratory of HIV, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria.
2. Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria.
3. Department of Infectious Diseases, Medical University, Plovdiv, Bulgaria.
4. Department of Infectious Diseases, Medical University, Plevna, Bulgaria.
5. Clinic of Infectious Diseases, Univeristy Hospital, Stara Zagora, Bulgaria.
6. University Hospital St. Marina, Medical University, Clinic of Infectious Diseases, Varna, Bulgaria.

Objectives: In Bulgaria 2691 cases with HIV/AIDS were diagnosed until 2017, the number of women is 568, of which 73 were diagnosed during pregnancy. The aim of our study was to analyze transmission of HIV from pregnant women to their newborn infants in Bulgaria.

Materials and Methods: Epidemiological analysis was performed using the databases of the National Reference Conformatory Laboratory of HIV, NCIPD. Until 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 virological monitoring. HIV-1 sequences were analyzed using the Internet-based tools REGAv3, COMET v2.2. and Stanford DB.

Results: Of 137 mothers with HIV registered until 2017, 14 had no viral load tests (VL), 46 were on virological monitoring, and 36 have a result < 40c/ml. Most of the mothers with HIV are from Sofia – 49, 17 from Plovdiv, 10 from Varna and 61 from other regions of the country. The number of newborns is 175, 27 (15%) of them are infected with HIV-1. Mothers were tested before or during pregnancy, and 13 (9.5%) have resistance mutations to PI, 8 to NRTI and 9 to NNRTI, and 9 of them have resistance mutations to more than 1 class of ART medications. Our study revealed high genetic diversity of different subtypes and recombinant forms. Non-B HIV-1 subtypes have prevalence in the study group, dominated by CRF01_AE with 37.1%, followed by subtype B by 28.6%. Several other strains were found: subtype C, CRF02_AG, CRF05_DF, CRF14_BG and URFs.

Conclusions: Our analysis revealed high genetic diversity among studied population. Our study showed that a high percentage of infants were infected with HIV-1. Early detection of all pregnant women with HIV and timely initiation of antiretroviral therapy is needed to reduce the risk of HIV transmission to newborns.

Keywords: HIV/AIDS, mother to child transmission, subtypes.

**АНАЛИЗ НА ТОТАЛНАТА HIV-1 РЕЗИСТЕНТНОСТ
И КОИНФЕКЦИИТЕ С HBV И HCV
В ТРАНСМИСИОННАТА ГРУПА НА МЪЖЕТЕ,
КОИТО ПРАВЯТ СЕКС С МЪЖЕ (1986–2016)
(ПРЕДВАРИТЕЛЕН АНАЛИЗ)**

*ЛораНиколова¹, Ренета Димитрова¹,
Ася Костадинова¹, Даниела Сиракова¹,
Анна Ганчева¹, Тенчо Тенев², Елица Голкочева-Маркова²,
Диляна Трандева-Банкова², Ивайло Еленков³,
Нина Янчева³, Мариана Стойчева⁴, Цеца Дойчинова⁵,
Лилия Пекова⁶, Ивелина Тодорова⁷, Ивайло Алексиев¹*

1. Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България.
2. Национална референтна лаборатория „Хепатитни вируси“, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България.
3. Специализирана болница по заразни и паразитни болести, София, България.
4. Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Пловдив, България.
5. Катедра по инфекциозни болести, Медицински университет, Плевен, България.
6. Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Стара Загора, България
7. Университетска болница „Св. Марина“, Клиника по инфекциозни болести, Медицински университет, Варна, България.

Цел: До края на 2017 г. броят на регистрираните MSM с HIV-1 е 763, което е 28,4% от всички 2691 регистрирани случаи на HIV до този момент. 42 (1.6%) от регистрираните MSM са употребявали и инжекционни наркотици. Целта на проучването е да се анализира разпространението на тоталната лекарствена резистентност и коинфекции с HBV и HCV сред групата на MSM.

Материали и методи: За да се установи разпространението на тоталната лекарствена резистентност в групата на MSM бяха анализирани общо 260 HIV-1 *pol* секвенци, генерирани с TruGene и/или ViroSeq генотипизиращи системи. Тоталната лекарствена резистентност беше анализирана чрез интернет базиран алгоритъм на Stanford HIVdb v8.4. Изследванията за вирусни хепатити са извършени по метода ELISA.

Резултати: Анализът показва, че разпространението на тоталната резистентност сред изследваните MSM е 21.9%, от които 14.6% са резистентни към нуклеозидните инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTI), 1.9% са резистентни към нуклеозидните инхибитори на обратната транскриптаза (NRTI), а 2.3% са резистентни към протеазните инхибитори (PI). Двама от пациентите имат двойна резистентност към PI и NRTI (0.8%), петима пациенти (1.9%) имат двойна резистентност към NRTI и NNRTI, а един пациент има резистентност едновременно към трите класа медикаменти – 0.4%. 30.6% от пациентите, инфектирани с HIV-1, които са с положителен резултат за HBsAg, са MSM. 4.7% от положителните за anti-HCV лица са MSM. От лицата със смесена тройна инфекция – HIV-1, HBV и HCV 4% са MSM.

Заклучение: Нашите изследвания показаха значително ниво на тотална резистентност сред групата на MSM, като най-голям процент от пациентите имат резистентност към NNRTI. Установихме зна-

**ANALYSIS OF TOTAL HIV-1 RESISTANCE
AND HBV AND HCV COINFECTIONS
IN MEN WHO HAVE SEX WITH MEN
(1986–2016)
(PRELIMINARY ANALYSIS)**

*Lora Nikolova¹, Reneta Dimitrova¹,
Asya Kostadinova¹, Anna Gancheva¹, Daniela Sirakova¹,
Tencho Tenev², Elica Golkocheva-Markova²,
Diliana Trandeva-Bankova², Ivaylo Elenkov³,
Nina Yancheva³, Mariana Stoycheva⁴,
Tsetsa Doychinova⁵, Lilia Pekova⁶, Ivelina Todorova⁷, Ivailo Alexiev¹*

1. National Reference Confirmatory Laboratory of HIV, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria.
2. NRL Hepatitis viruses, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria.
3. Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria.
4. Department of Infectious Diseases, Medical University, Plovdiv, Bulgaria.
5. Department of Infectious Diseases, Medical University, Plevna, Bulgaria.
6. Clinic of Infectious diseases, University Hospital, Stara Zagora, Bulgaria.
7. University hospital St. Marina, Varna, Bulgaria.

Objectives: To the end of 2017 the number of MSM infected with HIV-1 has increased to 763, which is 28.4% of all 2691 registered cases of HIV until 2017. 42 (1.6%) of all registered MSM have also used intravenous drugs. The aim of this study was to analyze the prevalence of total drug resistance and coinfections with HBV and HCV among MSM.

Materials and Methods: For the aim of this study were analyzed 260 sequences from MSM. HIV-1 *pol* sequences were generated with TruGene and/or ViroSeq Genotyping Systems. The total resistance was determined using the Stanford HIVdb version 8.4. Viral hepatitis testing was performed by ELISA method.

Results: The total resistance was 21.9%, comprising 1.9% to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), 14.6% to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) and 2.3% to protease inhibitors (PI). Dual class resistance to PI and NRTI were identified in 2 (0.8%) patients, 5 patients (1.9%) have resistance to both classes ART medications – NRTI and NNRTI and one patient (0.4%) has triple resistance. 30.6% of the patients infected with HIV-1 and positive for HBsAg are MSM. 4.7% from all patients positive for anti-HCV are MSM. 4% from the patients with triple coinfection – HIV-1, HBV and HCV are MSM.

Conclusions: Our analysis showed a significant level of total resistance among MSM. Highest percent from the patients have resistance to NNRTI. We have identified a significant number of coinfecting MSM. Our study demonstrated that the detailed monitoring of resistance mutations and coinfections among MSM is of great importance to better consideration of antiretroviral therapy.

Keywords: HIV-1, MSM, Resistance

чителен брой на хепатитни коинфекции при МСМ. Нашето проучване показва необходимостта от детайлно наблюдение на резистентните мутации и коинфекциите при диагностицираните МСМ с HIV-1 в България за съобразяване на антиретровирусната терапия.

Ключови думи: HIV-1, МСМ, резистентност.

– 26 –

ЧЕСТОТА НА УРОГЕНИТАЛНИТЕ МИКОПЛАЗМИ ПРИ ЖЕНИ С РЕПРОДУКТИВНИ ПРОБЛЕМИ

С. Пачкова, Д. Гинчева, Е. Конова

МЦ Клиничен институт за репродуктивна медицина – Плевен

Цел: Да се установи честотата на изолиране на урогенитални микоплазми при жени с репродуктивни проблеми и тяхната връзка с нарушения в нормалната вагинална флора.

Материали и методи: За период от 9 месеца (м. май 2017 г. – м. януари 2018 г.) бяха изследвани 574 жени с репродуктивни проблеми. Всеки влагалищен секрет беше култивиран върху кръвен агар, среда на Сабуро и среда за *T. vaginalis*. Изготвяни бяха микроскопски препарати оцветени по Грам за доказване на BV, редуцирани лактобацили и наличие на левкоцити. Извършена беше полуколичествена оценка на изолираните микроорганизми. Урогениталните микоплазми бяха доказани в цервикален секрет с помощта RT-PCR.

Резултати: Установени бяха следните резултати: от всички изследвани жени 219 (38.2%) показаха положителен резултат за урогенитални микоплазми. С най-висока честота беше изолирана *U. parvum* (69.4%), следвана от *U. urealyticum* (3.7%), а останалите микоплазми – в по-нисък процент. От всички положителни за урогенитални микоплазми пациентки 32.7% бяха с нормална влагалищна флора, а 67.3% показаха отклонение.

Заклучение: В изследваните от нас жени с репродуктивни проблеми, *U. parvum* беше изолирана с най-висока честота. Доказано беше, че гениталните микоплазми се срещат по-често при жени с нарушена влагалищна флора.

Ключови думи: Урогенитални микоплазми, репродуктивни проблеми.

– 27 –

ПИЛОТНО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ОТКРИВАНЕ НА МУТАЦИИ, СВЪРЗАНИ С РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ МАКРОЛИДИ ПРИ *MYCOPLASMA GENITALIUM* В БЪЛГАРИЯ

И. Филипова, В. Левтерова, И. Симеоновски, Т. Кантарджиев

Национален център по заразни и паразитни болести, София

Цел: *Mycoplasma genitalium* е доказан причинител на сексуално предавани инфекции (СПИ) както при мъже, така и при жени. Съвременните проучвания сочат понижена ефективност на препоръчаното лечение с азитромицин поради появата на резистентност към макролиди. Целта на това изследване беше да се открият мутации, свързани с макролидната резистентност при положителни за *M. genitalium* пациенти в нашата страна.

Материали/методи: Националната референтна лаборатория за СПИ в НЦЗПБ предлага рутинно Real-time PCR диагностични тестове за *M.*

– 26 –

FREQUENCY OF UROGENITAL MYCOPLASMAS IN WOMEN WITH REPRODUCTIVE PROBLEMS

S. Pachkova, D. Gincheva, E. Konova

MC Clinical Institute for Reproductive Medicine-Pleven

Aim: To establish the frequency of isolation of urogenital mycoplasmas in women with reproductive problems and their association with disorders of normal vaginal flora.

Materials and methods: 574 women with reproductive problems were examined for a period of 9 months (May 2017 – January 2018). Each vaginal secretion was cultured on blood agar, Saburo's medium and *T. vaginalis* medium. Gram-stained were prepared to demonstrate BV, reduced lactobacilli and leukocytes. A semi-quantitative assessment of isolated microorganisms was performed. Urogenital mycoplasmas were demonstrated in cervical secretions by PCR-RT.

Results: The following results were found: Of all women examined 219 (38.2%) showed a positive result for urogenital mycoplasma. The highest frequency was *U. parvum* (69.4%), followed by *U. urealyticum* (3.7%) and the remaining mycoplasmas at a lower percentage. Of all urogenital mycoplasma-positive patients, 32.7% had normal vaginal flora and 67.3% showed deviation.

Conclusion: In women with reproductive problems, *U. parvum* was isolated at the highest frequency. It has been shown that genital mycoplasmas are more common in women with disordered vaginal flora.

Key words: urogenital mycoplasmas, reproductive problems.

– 27 –

PILOT STUDY FOR DETECTION OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH MACROLIDE RESISTANCE IN *MYCOPLASMA GENITALIUM* IN BULGARIA

I. Philipova, V. Levterova, I. Simeonovski, T. Kantardjiev

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

Goal: *Mycoplasma genitalium* is a proven cause of sexually transmitted infections (STIs) in both men and women. Current studies have shown reduced efficacy of recommended azithromycin treatment due to the occurrence of macrolide resistance. The purpose of this study was to find mutations associated with macrolide resistance in *M. genitalium*-positive patients in our country.

Materials / methods: The National Reference Laboratory for STIs at the NCIPD offers routinely real-time PCR diagnostic tests for *M. genitalium* from

genitalium от началото на 2017 г. Всички положителни за *M. genitalium* проби бяха анализирани ретроспективно за резистентност към макролиди чрез молекулярно-генетични методи. Изследвани бяха 23S рРНК последователности за наличие на мутации, свързани с резистентността към макролиди в локуси 2058 и 2059 чрез ДНК секвениране по метода на Sanger.

Резултати: За изследвания период, 5 (2,19%) от 228 пациенти бяха положителни за *M. genitalium*; съответно 0,9% от жените и 2,2% от мъжете. След анализ на получените 23S рРНК секвенции не бяха открити мутации, свързани с резистентност на макролиди, като във всички клинични проби бяха доказани div тип 23S рРНК последователности.

Заклучение: Въпреки че резултатите от това проучване не доказва наличие на мутации, асоциирани с макролидна резистентност, не би могло да се заключи, че в България липсва такава резистентност, тъй като това наблюдение най-вероятно се дължи на малкия брой положителни пациенти с *M. genitalium* в това пилотно проучване. За съжаление ефективното лечение е застрашено от широката употреба на азитромицин в клиничната практика и възможното развитие на резистентни *M. genitalium* по време на терапията. Независимо от отрицателните находки в това проучване е наложително диагностиката на *M. genitalium* да се допълва с тестване на резистентността към макролиди с оглед оптимизиране на индивидуалната терапия, както и за повишаване на надзора на антибиотичната резистентност при този патоген.

the beginning of 2017. All *M. genitalium*-positive samples were retrospectively analyzed for macrolide resistance by molecular methods. 23S rRNA sequences were tested for the presence of mutations associated with macrolide resistance in loci 2058 and 2059 by DNA sequencing by the Sanger method.

Results: For the study period, 5 (2.19%) of 228 patients were positive for *M. genitalium*; 0.9% of women and 2.2% of men respectively. After analysis of the obtained 23S rRNA sequences, no mutations associated with macrolide resistance were detected, in that wild type 23S rRNA sequences being detected in all clinical specimens.

Conclusion: Although this study did not detect presence of mutations associated with macrolide resistance, it can not be concluded that there is no such prevalence in Bulgaria as this observation is probably due to the small number of *M. genitalium*-positive patients in this pilot study. Unfortunately, effective treatment is still threatened by the widespread use of azithromycin in clinical practice and the possible development of resistant *M. genitalium* during therapy. Despite the negative findings in this study, it is imperative that the diagnosis of *M. genitalium* be supplemented by testing the macrolide resistance in order to optimize individual therapy as well as for enhancing the surveillance of antibiotic resistance in this pathogen.

– 28 –

ЕЛИМИНАЦИЯ НА МОРБИЛИ И РУБЕОЛА В БЪЛГАРИЯ 2012–2016 Г.: РАЗВИТИЕ И ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА

Надежда Владимирова^{1,3}, Стефка Крумова^{1,3},
Анна Курчатова^{1,3}, Нина Гачева²

1. Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. Национален верификационен комитет към МЗ
3. Национален верификационен комитет към МЗ / техническа група

Въведение: Елиминацията на морбили и рубеола е от един от най-важните приоритети на имунизационните програми в Европейския регион и следователно, в България. Всяка година членовете на българския национален верификационен комитет (НВК) и експерти от техническата група към него, базирана в НЦЗПБ се срещат, за да оценят състоянието по елиминация на морбили и рубеола в страната въз основа на документацията, предоставена от регионите и данните налични на национално ниво.

Цел: Да представим заключенията по верификацията на напредъка на елиминацията на морбили и рубеола в България, направена от Европейската Регионална верификационна комисия за елиминация на морбили и рубеола (РВК) за периода 2012–2016 г. и да определим предизвикателствата към процеса въз основа на данни, извадени от Актуалния годишен статут (АГС).

Материали и методи: Прегледани са АГС за морбили и рубеола в България за 5-годишен период, както и епидемиологичната информация свързана с тях. Докладите на РВК, издадени от СЗО за 2010–2012, 2014 и 2015 г. и официалното писмо на СЗО за 2016 г. също са разгледани.

Резултати: Тези доклади включват информация за епидемиологията на морбили и рубеола, молекулярна епидемиология, анализ на изпълнение-

– 28 –

MEASLES AND RUBELLA ELIMINATION IN BULGARIA 2012–2016: PROGRESS AND CHALLENGES

Nadezhda Vladimirova^{1,3}, Stefka Krumova^{1,3}, Anna Kurchatova^{1,3}
Nina Gatcheva²

1. National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
2. National Verification Committee, Ministry of health
3. National Verification Committee, Ministry of health / technical group

Introduction: Eliminating measles and rubella is one of the top immunization priorities of the European Region and consequently in Bulgaria. Every year members of the Bulgarian National Verification Committee (NVC) and experts of the technical group based at NCIPD meet to evaluate the status of measles and rubella elimination in the country based on documentation submitted by each region and data available at national level.

Aim: to present the conclusions on verifying progress of measles and rubella elimination in Bulgaria made by the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC) for the period 2012–2016 and to define challenges to the process based on some data derived from the Annual status updates (ASU).

Materials and methods: ASU for measles and rubella in Bulgaria for 5 year period were reviewed as well as supporting epidemiological documentation. Reports of the RVC issued by WHO for 2010–2012, 2014 and 2015 and official letter of WHO for 2016 were reviewed too.

Results: These reports include information on measles and rubella epidemiology, molecular epidemiology, the analysis of immunization programme performance, the quality of surveillance, and changes that may have occurred since the last report submitted by the NVC on measles and rubella elimination status. It was found that measles and rubella surveillance sensitivity rate is unacceptable low. Immunization coverage with first and second doses of measles and

то на имунизационната програма, качеството на надзора и промените, които може да са възникнали след последния такъв доклад по състоянието на елиминация на морбили и рубеола, предоставен от НВК. Установено е, че чувствителността на надзора при морбили и рубеола е неприемливо ниска. Имунизационният обхват с първи и втори прием морбили – рубеола ваксина (МРВ) е над 95%. През 2016 г. обхватът с МРВ1 или МРВ2 е <90% в 15 от 28-те региона.

Заклучение: Елиминацията на морбили се поддържа в страната. За 2016 г. е прекъснато разпространението на рубеола за период от 12 месеца. РВК препоръчва да се поддържа прекъснатото разпространение на морбили и да се постигне прекъсване разпространението на рубеола. РВК приканва националните здравни власти да проведат целево ретроспективно проучване за синдрома на вродената рубеола и да подобрят нивото на вирусната детекция на рубеола. Подобряването на имунизационния обхват с първи и втори прием на ваксина срещу морбили и рубеола е друга препоръка на РВК.

Ключови думи: морбили, рубеола, елиминация

– 29 –

ДОКАЗВАНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ ВИРУСНИ МАРКЕРИ В ИЗСУШЕНИ КРЪВНИ ПЕТНА

Ст. Крумова, А. Павлова, С. Ангелова, Е. Голкочева-Маркова, П. Генова-Калу, И. Георгиева, С. Волева

Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗ-ПБ), София, България

РЕЗЮМЕ

Диагностичният подход за използване на изсушени кръвни петна намира все по-голямо приложение в медицината и вирусологията. Става предпочитана техника за неонатален скрининг и сероепидемиологични проучвания за **откриване на антитела срещу морбили, паротит, рубеола, хепатит В, полиовирус, параинфлуенца вирус и респираторен синцитиален вирус.**

Цел: Да се извърши сравнителен анализ на доказването на специфични вирусни маркери срещу ваксинапредотвратимите инфекции – морбили, паротит, рубеола и хепатит В в изсушени кръвни петна и серумни проби.

Материали/Методи: В настоящото изследване са включени 55 пациенти, от които съгласно изпълнението на научно изследвателски проект, финансиран от ФНИ, Договор №ДМ 03/1, 12.12.2016 г, са събрани два вида клиничен материал: 55 серумни проби и 55 изсушени кръвни петна. Използвани са серологични (индиректен ELISA тест) методи за доказване на специфични вирусни маркери – IgM/IgG антитела, HbsAg, anti-HBs и anti-HBc.

Резултати: Изследваните пациенти (n=55) са разделени в 11 възрастови групи, като най-голям е дялът на изследваните във възрастовите групи: 1–4 год. възраст и ≥50 год. възраст – 40/55 (72,73%) от София и Пловдив. При комбинирано имуноензимно тестване на IgM/IgG маркери за морбили, паротит и рубеола се отчета ≥80% съвпадение при двата вида клиничен материал. По отношение на хепатит В маркери, регистрираното съвпадение е ≥70%.

Заклучение: Изсушените кръвни петна предоставят възможност за **комплексни серологични проучвания** на различни инфекциозни агенти, дълъг период на използване и съхранение, особено при новородени и малки деца с приложение в полеви условия. Серум базираната технология остава основен подход при имуноензимната диагностика на вирусните инфекции.

Ключови думи: изсушени кръвни петна, ELISA, ваксинапредотвратими заболявания

rubella containing vaccine (MRCV) is below 95%. MRCV1 or MRCV2 coverage is <90% in 15 out of 28 regions for 2016.

Conclusion: Measles elimination has been sustained in the country. It is concluded that for 2016, rubella transmission is interrupted for the period of 12 months. The RVC commends to sustain the interruption of measles transmission and to achieve interruption of rubella transmission. RVC invites national health authorities to conducting a targeted retrospective survey of congenital rubella syndrome and to improve the rate of viral detection of rubella.

Improving immunization coverage with first and second dose of measles and rubella containing vaccines is another recommendation of RVC.

Key words: measles, rubella, elimination

– 29 –

DETECTION OF SPECIFIC VIRAL MARKERS IN DRIED BLOOD SPOTS

St. Krumova, A. Pavlova, S. Angelova, E. Golkocheva-Markova, P. Genova-Kalou, I. Georgieva, Silviya Voleva

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

ABSTRACT

Background: The diagnostic approach which use the dried blood spots is very applicable in medicine and virology. A technique for neonatal screening and sero-epidemiological investigations for antibodies against measles, mumps, rubella, hepatitis B, poliovirus, parainfluenza virus, and respiratory syncytial virus is preferred.

Aim: To perform a comparative analysis for detection of specific viral markers against vaccine-preventative diseases – measles, mumps, rubella and hepatitis B in dried blood spots and serum samples.

Materials and Methods: In present study, 55 patients were included, of which two types of clinical material were collected: 55 serum samples and 55 dried blood spots, according to a research project funded by the NSF, Contract №DM 03/1, 12.12.2016. Serological (indirect ELISA) methods for the detection of specific viral markers – IgM/IgG antibodies, HbsAg, anti-HBs and anti-HBc were used.

Results: The investigated patients (n = 55) were divided into 11 age groups, with the highest proportion of those studied in the age groups: 1–4 years old and ≥ 50 years of age – 40/55 (72.73%) from Sofia and Plovdiv. In combination immunoenzymatic testing of measles, mumps, and rubella IgM/IgG markers in ≥80% coincidence for both types of clinical materials were found. For hepatitis B markers, the registered coincidence was ≥70%.

Conclusion: The dried blood spots provide the opportunity for complex serological testing of various infectious agents, a long period of use and storage, especially in newborns and young children in regions in the country with not well developed logistics infrastructure. Serum-based technology remains a major approach to the immunoenzymatic diagnosis of viral infections.

Key words: dried blood spots, ELISA, vaccine-preventable diseases

САНИТАРНО-ПАРАЗИТОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА НАЛИЧИЕ НА ПАРАЗИТНИ ПРОТОЗОИ И ХЕЛМИНТИ В ПРОБИ ОТ СОФИЯ И ДРУГИ РАЙОНИ НА БЪЛГАРИЯ

М. Виденова, Н. Цветкова, Р. Борисова,
И. Райнова, Р. Харизанов, А. Иванова

Отдел Паразитология и тропическа медицина, Национален
център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София

В развитите страни провеждането на системни санитарно-паразитологични изследвания на почвите и водите са в основата на мониторинга и контрола при опазването на общественото здраве. Нарастващото използване на отпадни води в селското стопанство налага разширяване обхвата на санитарно-паразитологични изследвания в нови субстрати и условия, като не съществува общоприета система за събиране и обработка на проби в световен мащаб.

Цел на настоящото проучване е да се установи наличие на контаминиране с паразитни инвазионни стадии на почви, пясъци, открити водоизточници и утайки от пречиствателни станции.

Материали и методи. Изследвани са 180 проби от почви, пясъци, открити водоизточници и утайки от ПСОВ в Националната референтна лаборатория „Диагностика на паразитозите – местни и тропически“. Използвани са класически конвенционални (микроскопски) методи и съвременни (PCR) методи за диагностика.

Резултати. В изследваните проби от различни субстрати са установени 16 (9%) положителни, чрез микроскопски анализ – 5 положителни за нематодни ларви, 2 положителни за яйца на *Ancylostoma* spp., и 9 положителни проби за ооцисти на *Cryptosporidium* spp. С използване на PCR методите броят на положителните проби нараства на 22 (11%) – 4 положителни проби за ооцисти на *Toxoplasma gondii*, 1 положителна за ооцисти на *Cryptosporidium* spp., 1 положителна за яйца на *Toxocara canis*.

Заклучение. При проведеното санитарно-паразитологично изследване в 19 области на България на разнообразни субстрати – почва, пясък, води и утайки от ПСОВ е установена контаминираност както с протозойни, така и с хелминтни инвазионни стадии. Макар и ограничено като обем, нашето проучване показва по-висока чувствителност на PCR-анализа. В тази връзка можем да констатираме, че биомолекулярните методипозволяват видова идентификация с висока достоверност, включително и при екземпляри, негодни за морфологичен анализ.

Ключови думи: санитарна паразитология, субстрати, методи

SANITARY-PARASITOLOGICAL STUDIES FOR THE PRESENCE OF PARASITIC PROTOZOANS AND HELMINTHS IN SAMPLES FROM SOFIA AND OTHER REGIONS OF BULGARIA

M. Videnova, N. Tsvetkova, R. Borisova,
I. Raynova, R. Harizanov, A. Ivanova

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

In developed countries, systematic sanitary and parasitological studies of soil and water are the basis for prevention and control of public health. The increasing use of wastewater in agriculture calls for the extension of sanitary-parasitological research to new substrates and conditions, and there is no universally accepted system for collecting and processing samples worldwide.

Purpose of the present study is to find out the presence of contamination with parasite invasion stages of soils, sands, water and sludge from sewage treatment plants.

Materials and methods. 180 samples of soils, sands, open water sources and sludges from WWTP were surveyed in the National Reference Laboratory for Diagnosis of Parasitic Diseases at the NCIPD. Conventional (microscopic) methods and advanced (PCR) diagnostic methods were used.

Results. In the studied samples of different substrates with microscopic analysis were found 16 (9%) positive – 5 positive for nematode larvae, 2 positive for eggs of *Ancylostoma* spp. and 9 positive specimens for oocysts of *Cryptosporidium* spp. Using PCR methods, the number of positive samples increased to 22 (11%) – 4 positive for oocysts *Toxoplasma gondii*, 1 positive for oocysts of *Cryptosporidium* spp., 1 positive for *Toxocara canis* eggs.

Conclusion. Conducted sanitary-parasitological study in 19 regions of Bulgaria on various substrates – soil, sand, water and sludge from WWTP, established contamination with both protozoan and helminth invasion stages. Although limited in size, our study showed higher sensitivity of the PCR analysis. In this regard, we can conclude that biomolecular methods allow high-precision identification, including specimens unfit for morphological analysis.

Keywords: sanitary parasitology, substrates, methods

**ИНХИБИТОРНА И КОАГРЕГАЦИОННА
АКТИВНОСТ НА ЩАМОВЕ *LACTOBACILLUS
REUTERI* И *LACTOBACILLUS PARACASEI*
СРЕЩУ БАКТЕРИИ ПРИЧИНЯВАЩИ ЧРЕВНИ
ИНФЕКЦИИ**

Ралица Георгиева¹, Лилия Церовска²,
Любомира Йочева², Антония Дангулева-Чолакова¹,
Елена Караиванова¹, Галина Железова²

1. Лактина ООД, София
2. СУ“Св. Климент Охридски“, Медицински факултет, кампуса „Биология, медицинска генетика и микробиология“

Пробиотични препарати, базирани на лактобацили, се превърнаха в привлекателна алтернатива в съвременната медицинска практика. Чрез производството на антимикробни вещества, адхезия към лигавицата и коагрегацията с патогенни бактерии, лактобацилите подобряват баланса между вредната и полезна микрофлора в червата и спомагат за поддържането на здрава храносмилателна система.

Цел: Да се изследва инхибиторната и коагрегационна активност на пет щамове лактобацили върху тест микроорганизми, причинители на чревни инфекции.

Материали и методи: Изследването бе проведено с щамове *Lactobacillus reuteri* LLR-K67 и *L. paracasei* (LLC-4K, 115, J31, J35) от колекцията на „Лактина“ ООД и 6 референтни тест култури от колекцията на НБПМКК (*Escherichia coli* EPEC, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*). За оценка активността на лактобацилите са използвани стандартни *in vitro* методи на съвместното култивиране и коагрегация с тест микроорганизми.

Резултати: При съвместното култивиране, най-силно инхибиращо действие на лактобацилите бе наблюдавано върху популациите на *B. cereus* и *P. aeruginosa*, в повечето случаи водещо до пълна редукция на тест културата. При култивиране на лактобацилите с *E. coli* EPEC, *S. aureus* и *P. mirabilis* бе наблюдаван растеж, но статистически достоверно по-слаб в сравнение с контролата (без добавка на лактобацили). И срещу трите тест микроорганизма най-активен бе щам *L. reuteri* LLR-K67. Никакъв ефект не бе регистриран върху популацията на *K. pneumoniae*.

При изследване на коагрегационната активност, най-висока такава бе регистрирана с култура *S. aureus*, следвана от *P. aeruginosa*, а най-ниска – при *E. coli*. Щамовете *L. paracasei* LLC-115 и *L. reuteri* LLR-K67 показаха коагрегационна активност с повечето тест култури.

Заклучение: Получените резултати в условия *in vitro* показаха, че изследваните лактобацили в различна степен повлияват популациите на тест микроорганизми, което предполага тяхното различно участие във възстановяване и поддържане на здравословния баланс *in vivo*.

Ключови думи: лактобацили, коагрегация, съвместно култивиране

**INHIBITORY AND COAGGREGATION ACTIVITY
OF *LACTOBACILLUS REUTERI*
AND *LACTOBACILLUS PARACASEI* STRAINS
AGAINST BACTERIA CAUSING
INTESTINAL INFECTIONS**

Ralitsa Georgieva¹, Lilia Tserovska²,
Lyubomira Yocheva², Antonia Danguleva-Cholakova¹,
Elena Karaivanova¹, Galina Zhelezova²

1. Lactina Ltd, Sofia
2. Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Faculty of Medicine, Department of Biology, Medical Genetics and Microbiology

Lactobacillus based probiotic preparations have become an attractive option in modern medical practice. Through production of antimicrobial substances, adherence to the mucosa and coaggregation with pathogenic bacteria, lactobacilli enhance the balance between harmful and beneficial microflora in the gut and help maintaining a healthy digestive system.

Aim: To test the inhibitory and coaggregation activity of five *Lactobacillus* strains against some common causative agents of intestinal infections.

Materials and methods: *L. reuteri* LLR-K67 and *L. paracasei* strains (LLC-4K, 115, J31, J35) from the collection of Lactina Ltd. and six reference test cultures from the collection of NBIMCC (*Escherichia coli* EPEC, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*) were included in the study. Standard *in vitro* methods for evaluation antagonistic activity of lactobacilli through co-cultivation and their coaggregation capacity with the test bacteria were applied.

Results: During co-cultivation the populations of *B. cereus* and *P. aeruginosa* were most strongly affected by the predominant part of studied lactobacilli, which in many cases leads to complete test bacteria reduction. Lower but statistically significant growth reduction compared to the control (without lactobacilli) was obtained for *E. coli* EPEC, *S. aureus* and *P. mirabilis*. *L. reuteri* LLR-K67 was the most active strain against the three tested cultures. No effect on the growth of *K. pneumoniae* was registered.

Investigated lactobacilli showed highest coaggregation activity with *S. aureus*, followed by *P. aeruginosa*, and lowest with *E. coli* EPEC. The strains *L. paracasei* LLC-115 and *L. reuteri* LLR-K67 coaggregated with the highest number of test cultures.

Conclusion: *In vitro* obtained results showed that the studied lactobacilli have different potential to regulate the population of test microorganisms, which suggests that they will play distinctive roles in restoring and maintaining of a healthy microflora balance *in vivo*.

Key words: *Lactobacillus*, coaggregation, co-culturing

АНТИБИОТИЧНА РЕЗИСТЕНТНОСТ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *CAMPYLOBACTER* SPP. ПРИ ХОСПИТАЛИЗИРАНИ БОЛНИ С ДИАРИЕН СИНДРОМ

М. Павлова¹, В. Велев², Е. Добрева¹, И. Н. Иванов¹,
И. Томова², А. Мангъргов², М. Йонева³, Т. Кантарджиев¹

1. Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“, Медицински университет, София
3. Аджубадем Сити Клиник Болница Токуга

Campylobacter spp. са най-често изолираните бактериални причинители на остри диарии в света, особено при деца до 7 годишна възраст.

Материали и методи: За календарната 2017 г. са проучени 260 болни хоспитализирани с диарийен синдром. От тях 66 (25.38%) са положителни за *Campylobacter* spp. по имунохроматографски тест верифициран с посявка и Multiplex PCR. Чрез дисково-дифузионен метод клиничните изолати са изследвани за чувствителност срещу 5 антимикробни средства.

Резултати: От изолираните проби с *Campylobacter* 60 (91%) са *C. jejuni* 6 (9%) *C. coli*. Всички изолати на *C. jejuni/ coli* са чувствителни на Азитромицин (AZI), както и всички изолати на *C. coli* са чувствителни на Кларитромицин (CLA) и Еритромицин (ER). Три (5%) изолата на *C. jejuni* са резистентни на CLA и 7 (11.6%) на ER. На Ципрофлоксацин (CIP) са резистентни 35 (58.3%) от изолатите на *C. jejuni* 2 (33.3%) на *C. coli*; При Тетрациклин (TE) резистентността е съответно 23 (38.3%) за *C. jejuni* 1 (16.6%) за *C. coli*. При *C. jejuni* имаше 3 (5%) мултирезистентни изолата към CIP-CL-ER-TE едновременно; също 3 (5%) към CL-ER-CIP и 7 (11.6%) към TE- ER. При *C. coli* имаше 1 (16.6%) изолат резистентен към TE- ER.

Заклучение: Наблюдава се повишена резистентност на *Campylobacter*spp. към най-често използваните в практиката антимикробни препарати. Особено притеснителна е високата резистентност по отношение на Ципрофлоксацин, както и все по-често срещаните се мултирезистентни клинични изолати.

Ключови думи: *Campylobacter*, резистентност, Ципрофлоксацин, Еритромицин

ДОКАЗВАНЕ НА ВИДОВЕ ОТ ОРАЛНАТА АНАЕРОБНА МИКРОФЛОРА ЧРЕЗ PCR.

В. Толчков¹, Л. Стефанов², Г. Христова², Т. Боярова².

1. Отдел микробиология, Национален център по заразни и паразитни болести – София
2. Факултет по дентална медицина, МУ- София

Анаеробни бактерии като *Porphyromons gingivalis*, *Prevotella intermedia* и *Treponema denticola* са свързани с редица заболявания на венците и устната кухина. Установена е и тяхна връзка с възникване на ставни и кардиологични заболявания. Култивирането им с класически микробиологични методи е трудноемоко и изисква скъпоструващо оборудване за работа с тях в анаеробна атмосфера.

Цел на настоящото изследване е оптимизация на удобен за изпълнение протокол с използване на конвенционална полимеразна верижна реакция (PCR).

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF CLINICAL ISOLATES *CAMPYLOBACTER* SPP. IN HOSPITALIZED PATIENTS WITH DIARRHEA

M. Pavlova¹, V. Velev², E. Dobрева¹, I. N. Ivanov¹, I. Tomova², A. Mangarov², M. Joneva³, T. Kantardjiev¹

1. National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
2. Hospital for Infectious and Parasitic Diseases, Medical University of Sofia
3. Acibadem City Clinic Hospital Tokuda

Campylobacter spp. are the most commonly isolated bacterial agents of acute diarrhea in the world, especially in children under 7 years of age.

Materials and methods: For the calendar year 2017, 260 patients were hospitalized with diarrhea syndrome. Of these, 66 (25.38%) are positive for *Campylobacter* spp. by immunochromatographic assay verified by culture and Multiplex PCR. By means of a disc-diffusion method, clinical isolates were tested for susceptibility against 5 antimicrobials agents.

Results: The isolates of *Campylobacter* 60 (91%) are *C. jejuni* and 6 (9%) *C. coli*. All *C. jejuni / coli* isolates are Azitromycin (AZI) sensitive, and all *C. coli* isolates are susceptible to Clarithromycin (CLA) and Erythromycin (ER). Three (5%) *C. jejuni* isolates are resistant to CLA and 7 (11.6%) to ER. Ciprofloxacin (CIP) is resistant to 35 (58.3%) of *C. jejuni* isolates and 2 (33.3%) of *C. coli*; For Tetracycline (TE) the resistance is 23 (38.3%) for *C. jejuni* and 1 (16.6%) for *C. coli*, respectively. In *C. jejuni* there were 3 (5%) multi-resistant isolates to CIP-CL-ER-TE simultaneously; also 3 (5%) to CL-ER-CIP and 7 (11.6%) to TEE-ER. In *C. coli* there was 1 (16.6%) TE-ER-resistant isolate.

Conclusion: Increased resistance to *Campylobacter* spp. to the most commonly used antimicrobial preparations. Particularly worrying is the high resistance to ciprofloxacin as well as the increasingly common multi-drug resistant isolates.

Key words: *Campylobacter*, resistance, Ciprofloxacin, Erythromycin

DETECTION OF SPECIES OF THE ORAL ANAEROBIC MICROFLORA USING PCR.

V. Tolchkov¹, L. Stefanov², G. Christova², T. Bolyarova².

1. Department of Microbiology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria
2. Faculty of Dental Medicine, Medical University of Sofia, Bulgaria

Anaerobic bacteria like *Porphyromons gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Treponema denticola* are related with many diseases of the gingivae and the oral cavity. They are included in the inflammatory process of the joints and cardiovascular diseases. Cultivation of these species is labor consuming and requests expensive equipment for working in anaerobic atmosphere.

Aim of the current investigation is to optimize useful protocol and easy to perform protocol using conventional polymerase chain reaction (PCR).

Materials and methods: Thirty five tooth pin samples from patients provided by the Faculty of Dental Medicine of Medical University of Sofia are in-

Материали и методи: Изследвани са общо 35 пациенти като е взет материал от междузъбното пространство със зъбен щифт. От него е изолирана ДНК с кит QiAmp DNA Minikit, Qiagen с използване на модифициран протокол за изолация на ДНК от тъкани, като впоследствие са амплифицирани с праймери, специфични съответно за всеки един от трите вида – *P. gingivalis*, *P. intermedia* и *T. denticola*. Ампликоните са визуализирани чрез електрофореза на агарозен гел, оцветен с етидиев бромид в TBE буфер. Размерите на продуктите на PCR са определени чрез сравняване с молекулен маркер и съпоставени с очакваните такива.

Резултати: От общо 30-те пациенти бяха доказани трите вида при 5 пациенти, *P. gingivalis* и *P. intermedia* при 5, *P. gingivalis* и *T. denticola* при 1, *P. intermedia* и *T. denticola* при 2, само *P. gingivalis* – 3, само *P. intermedia* – 3, и *T. denticola* при 3.

Заклучение: Методите за доказване при *P. gingivalis*, *P. intermedia* и *T. denticola* от зъбни щифтове с PCR са оптимизирани успешно.

Изследването е проведено във връзка с проект „Връзка между пародонтални заболявания и ревматоиден артрит.“, финансиран от МУ-София, грант 2017

Ключови думи: анаероби, орална микрофлора, PCR

– 34 –

ЕНТЕРОВИРУСНИ НЕВРОИНФЕКЦИИ – ЛАБОРАТОРНО ПРОУЧВАНЕ ЗА 4-ГОДИШЕН ПЕРИОД (2014– 2017 Г.)

V. Йончева, А. Стоянова, Л. Николаева-Гломб

НРЛ „Ентеровируси“, НЦЗПБ, София

Цел: Да се проучи циркулацията на ентеровируси за 4-годишния период от 2014 до 2017 г.

Материали/методи: За посочения период са изследвани 804 клинични проби: 288 фекални, 314 ликворни, 46 носогърлени смива и 156 серума от общо 408 пациента на различна възраст, хоспитализирани с диагноза при приемането: менингит, енцефалит, синдром на Гилен-Баре, мозъчен оток и менингоенцефалит. Фекалните, ликворните и носогърлените проби са изследвани чрез вирусна изолация в клетъчни култури и чрез RT-PCR, а серумните – чрез ELISA за IgM антигенов срещу ентеровируси.

Резултати: Изолирани са 16 ентеровирусни щамове: 9 щамове ECHO 6, 4 щамове ECHO 30, 1 щам ECHO13 и 2 щамове коксаки В вирус. 15 от щамовете са изолирани от фекални проби. 3 от щамовете ECHO 6 са изолирани както от фецеса, така и от ликвора на съответните пациенти. Чрез RT-PCR ентеровирусни последователности се доказват в около 10% от изследваните материали (57/630): в 38 от изследваните фекални проби (13% от всички фекални проби), в 18 от ликворите (5%) и в 1 от носогърлените смивове. 11,5% от изследваните серумни проби са положителни за IgM антигенов срещу ентеровируси.

Заклучение: Най-често изолираните ентеровирусни щамове за периода 2014–2017 г. са ECHO 6 и ECHO 30. През 2017 г. се наблюдава засилен циркулация на ентеровируси: 8 от 16-те щамове са изолирани тогава. Най-често щамовете се изолират от фецес. Молекулярно-биологичните методи все повече се утвърждават заради високата си чувствителност без да изместят класическия метод на вирусна изолация. За пълнота на етиологичната диагностика при съмнение за ентеровирусна невроинфекция е нужно ликворните проби да са придружени от 2 фекални проби, взети в последователни дни, както и серумните проби да се вземат поне една седмица след развитие на симптоматиката.

Ключови думи: ентеровируси, менингити, невроинфекции

investigated. DNA from the pins is isolated using QiAmp DNA Minikit, Qiagen using modified protocol for isolation of DNA from tissues. The DNA is amplified with specific primer pairs for the species *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *T. denticola* с използване на модифициран протокол за изолация на ДНК от тъкани, като впоследствие са амплифицирани с праймери, специфични съответно за всеки един от трите вида – *P. gingivalis*, *P. intermedia* и *T. denticola*. The amplicons are visualized on ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis in TBE buffer. The sizes of the PCR products are estimated with molecular ladder DNA marker and compared with expected.

Results: All of these 3 species in 30 patients are detected in 5 patients, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in 5, *P. gingivalis* and *T. denticola* in 1, *P. intermedia* and *T. denticola* in 2, only *P. gingivalis* in 3, only *P. intermedia* in 3, and only *T. denticola* in 3 patients.

Conclusion: Methods of detection of *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *T. denticola* from tooth pins are optimized successfully.

Investigation is done as a part of the project „Relation between periodontal diseases and rheumatoid arthritis“ funded by Sofia Medical University, Grant 2017

Key words: anaerobes, oral microflora, PCR

– 34 –

ENTEROVIRAL NEUROINFECTIONS – LABORATORY STUDY FOR A 4-YEAR PERIOD (2014–2017)

V. Iontcheva, A. Stoyanova, L. Nikolaeva-Glomb

NRL "Enteroviruses", NCIPD, Sofia

Aim: To study the circulation of human enteroviruses for the 4-year period from 2014 to 2017.

Materials/Methods: 804 clinical specimens were tested for the specified period: 288 stools, 314 CSFs, 46 nasopharyngeal swabs and 156 sera from a total of 408 patients of different age, hospitalized with diagnosis at admission: meningitis, encephalitis, Guillain-Barre syndrome, brain edema and meningoencephalitis. Stools, CSFs and swabs were tested by viral isolation in cell culture and by RT-PCR, and serum – by ELISA for anti-enterovirus IgM antibodies.

Results: Sixteen enterovirus strains were isolated: 9 strains ECHO6, 4 strains ECHO30, 1 strain ECHO13 and 2 strains Coxsackie B virus. Fifteen of the strains were isolated from stools. Three of the ECHO6 strains were isolated from both stool and CSF of the relevant patients. Enteroviral sequences were detected by RT-PCR in about 10% of the samples (57/648): in 38 of the stool samples tested (13% of all stools), in 18 CSFs (5%) and in 1 swab. 11,5% of tested sera were positive for anti-enterovirus IgM antibodies.

Conclusion: The most frequently isolated enteroviral strains for the period 2014–2017 were ECHO6 and ECHO30. In 2017, an increased circulation of Enteroviruses was observed: 8 of the 16 strains were isolated then. Most often the strains were isolated from stools. Molecular methods increasingly gain approval because of their high sensitivity but do not displace the classical method of virus isolation in cell culture. For making complete etiological diagnosis when enterovirus neuroinfection is suspected, CSF samples should be accompanied by two stool samples, taken on consecutive days, and serum samples taken at least a week after deployment of symptoms.

Key Words: enterovirus, meningitis, neuroinfection.

МОРФОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ЧРЕВНИ ПАРАЗИТИ ПРЕЗ 2017 Г.

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

НРЛ “Диагностика на паразитозите-местни и тропически”, НЦЗПБ, София

Чревните паразити, причиняващи заболявания при хората, се разделят на протозои и хелминти. В България с голямо медицинско значение от протозоите са *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp., а от хелминтите *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides* и *Taenia* spp.

Цел на проучването е анализ на данните за проведените морфологични изследвания в НРЛ “Диагностика на паразитозите-местни и тропически, Отдел “Паразитология и тропическа медицина”, НЦЗПБ.

Използвани са данни от журнал за регистриране на пациентите, изследвани за паразитози, в това число и за чревни протозои и хелминти, през 2017 г. Пробите [фецес (694), скоч лента (177) и макроскопски материали (10)] са изследвани с рутинни морфодиагностични методи, включително нативни (881), оцветителни (16), културелни (13) и обогатителен формалин-етероф (694). Общият брой на изследваните за чревни паразити е 799 лица. Най-голям брой пациенти са изследвани по клинични показания – 500 (62,57%), следвани от тези по профилактични показания – 270 (33,79%) и контролно изследваните – 29 (3,63%). С чревни паразити са диагностицирани 45 (5,63%) лица. През проучвания период са регистрирани протозоите *Blastocystis* spp., *G. duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* и хелминтите *E. vermicularis*, *Taenia* spp. и *A. lumbricoides*. Най-голям брой положителни лица са установени във възрастовия диапазон от 1–10 год. На 1 пациент с оплаквания от страна на стомашно-чревния тракт са извършени неколкостепенни изследвания с цел проследяване на ефекта от проведеното лечение. Цисти на *Blastocystis* sp. са изолирани в продължение на 6 месеца след първичното изследване.

Ключови думи: чревни паразити, лабораторна диагностика

MORPHOLOGICAL INVESTIGATIONS FOR INTESTINAL PARASITES CONDUCTED IN 2017

N. Tsvetkova, I. Raynova, R. Harizanov, I. Kaftandzhiev, R. Borisova, A. Ivanova, E. Kaneva, M. Videnova

NRL for Diagnosis of Parasitic Diseases, NCIPD, Sofia

Intestinal parasites that can cause disease in humans are divided into protozoan and helminths. In Bulgaria, protozoa *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp., and helminths *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, and *Taenia* spp. are of great medical significance.

Aim of the study: to analyze data from morphological investigations in the NRL for Diagnosis of Parasitic Diseases, NCIPD.

Data from the patient registration files investigated for parasitic infections in 2017, including intestinal protozoan and helminths infections, were collected. Samples [faecal (694), scotch tape anal swabs (177) and materials for macroscopic assessment (10)] were examined for intestinal parasites by routine morphodiagnostic methods including direct smear microscopy (881), permanent staining (16), culture (13), and formalin-ethyl ether sedimentation technique (694). A total of 799 individuals were tested for intestinal protozoa and helminths. The highest number of patients examined were on clinical indications – 500 (62.57%), followed by persons tested for prophylaxis purposes – 270 (33.79%) and 29 (3.63%) subjects monitored for the treatment outcome assessment. 45 (5.63%) persons were diagnosed with intestinal parasitoses. Protozoa *Blastocystis* spp., *G. duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* and helminths *E. vermicularis*, *Taenia* spp. and *A. lumbricoides* were detected. The largest number of positive persons were found in the age group ranged of ≤10 years. One patient with complaints from the gastrointestinal tract had repeated examinations for treatment effect monitoring. *Blastocystis* sp. cysts were isolated for 6 months post primary testing.

Key words: intestinal parasites, laboratory diagnostics

ЕПИДЕМИОЛОГИЧНО ТИПИЗИРАНЕ НА КЛИНИЧНИ ИЗОЛАТИ *ENTEROBACTER* SPP. ОТ УМБАЛ “СВЕТА МАРИНА”, ВАРНА

Д. Димитрова¹, Р. Марковска², Т. Стоева¹, П. Станкова², М. Божкова¹, И. Митов²

¹ Катедра по микробиология и вирусология, Медицински Университет – Варна; УМБАЛ “Света Марина” – Варна

² Катедра по медицинска микробиология, Медицински Университет – София

През последните десетилетия значението на видовете от род *Enterobacter* като причинители на инфекции нараства значително. В началото на 2017 г. СЗО включва представителите на семейство *Enterobacteriaceae*, резистентни на карбапенеми и III – та генерация цефалоспорици в приоритетния си списък от патогени (в Приоритет 1 – Критична група), срещу които е необходимо да се откриват и разработват нови антимикробни лекарствени средства. Представителите

MOLECULAR TYPING OF *ENTEROBACTER* SPP. CLINICAL ISOLATES FROM THE UNIVERSITY HOSPITAL “SAINT MARINA”, VARNА

D. Dimitrova¹, R. Markovska², T. Stoeva¹, P. Stankova², M. Bozhkova¹, I. Mitov²

¹ Department of Microbiology and Virology, Medical University, Varna; UHAT “Saint Marina”, Varna

² Department of Medical Microbiology, Medical University, Sofia

During the last decades the clinical significance of bacteria from genus *Enterobacter* as infectious agents constantly increases. In the beginning of 2017, WHO included several species from *Enterobacteriaceae*, resistant to carbapenems and 3rd generation cephalosporins, in a priority pathogen list for research, discovery and development of new antibiotic, in its critical priority 1 tier. Isolates from genus *Enterobacter* are among the most commonly isolated bacterial pathogens in the University Hospital “Saint Marina”, Varna.

на род *Enterobacter* са сред 5-те най-често изолирани бактериални патогени в УМБАЛ "Св. Марина", Варна.

Цел: Да се извърши епидемиологично типизиране на клинично значими изолати *Enterobacter* spp. и да се проучат механизмите на резистентност към бета-лактамни антибиотици.

Материали и методи: За периода март 2014 – януари 2017г. бяха изолирани общо 433 клинично значими изолата *Enterobacter* spp. от различни пациенти, хоспитализирани в интензивни и неинтензивни клиници на МБАЛ "Света Марина". От тези изолати на епидемиологично типизиране чрез ERIC-PCR и PCR за детекция на бета-лактамази бяха подложени общо 176 изолата. Резултати: ERIC PCR методът генерира разпознаваеми ERIC профили, съставени от 5 до 10 бенда за всеки един от тестваните изолати. Идентифицирани бяха 19 различни генотипа. Десет типа бяха представени от единични изолати. Три от генотиповете бяха представени от 78% от изолатите – ERIC тип А беше доминиращ, доказан в 48.9 % (n=86), следван от тип С (18.2 %, n=32) и тип V (10.8 %, n=19). Чрез Multiplex PCR установихме, че 146 изолата са позитивни за ESBL бета-лактамази от CTX-M групата. Секвенирането потвърди наличието на *bla*_{CTX-M-15} в 128 изолата (представители на 15 ERIC типа), *bla*_{CTX-M-3} в 19 (6 ERIC типа) и *bla*_{SHV-12} в 6 изолата (3 ERIC типа). При един от изолатите се установи едновременно продукция на CTX-M-15 и CTX-M-3 ESBLs (клон V).

Заклучение: Получените резултати показват клонално разпространение на клинично значими изолати *Enterobacter* spp., продуценти предимно на CTX-M-15 широкоспектърна бета-лактамаза.

Ключови думи: *Enterobacter* spp., ERIC PCR, ESBLs

Objectives: to investigate the molecular epidemiology of *Enterobacter* spp. clinical isolates collected from the University Hospital "Saint Marina", Varna and to study the resistance mechanisms to beta-lactam antibiotics.

Materials and methods: During the period March 2014 – January 2017 a total of 433 clinically significant isolates of *Enterobacter* spp., collected from patients, hospitalized in ICU and non-ICU of University Hospital "Saint Marina", Varna, were isolated. Of these, 176 isolates were genotyped by ERIC-PCR and were tested by PCR to detect the presence of beta-lactamase genes.

Results: ERIC PCR generated well defined ERIC profiles, consisting of 5 to 10 bands for all isolates included in this study. Nineteen different ERIC types were identified. Ten types were presented by single isolates. Seventy eight percent of the isolates exhibited 3 major ERIC types: type A was dominant, detected in 48.9 % (n=86), followed by type C (18.2 %, n=32) and type V (10.8 %, n=19). Multiplex PCR identified 146 isolates positive for CTX-M ESBLs. Sequencing confirmed the presence of CTX-M-15 ESBL in 128 isolates (representatives of 15 ERIC types), CTX-M-3 in 19 isolates (6 ERIC types) and SHV-12 ESBL in 6 isolates (3 ERIC types). Co-production of CTX-M-15 and CTX-M-3 enzymes was found in a single isolate (clone V).

Conclusions: Our results reveal clonal dissemination of clinically significant isolates of *Enterobacter* spp., producing predominantly CTX-M-15 ESBL.

Key words: *Enterobacter* spp., ERIC PCR, ESBLs

– 37 –

– 37 –

ОЦЕНКА НА МИКРОБНАТА КОНТАМИНАЦИЯ НА ВЪЗДУХА В ОПЕРАЦИОННИ ЗАЛИ

ASSESSMENT OF MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF AIR IN OPERATING ROOMS

Николова М.¹, З. Иванова², Н. Богданов³,
С. Йорданова¹, А. Галев², Д. Шаламанов⁴

Nikolova M.¹, Z. Ivanova², N. Bogdanov³,
S. Yordanova¹, A. Galev², D. Shalamanov⁴

1. Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. НПЦВЕХ-ВМА, София
3. ВМА – София
4. МУ- Плевен

1. National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
2. SCMEH, Military Medical Academy, Sofia
3. Military Medical Academy – Sofia
4. Medical University – Plevan

Микробната контаминация на въздуха в операционни зали може да доведе до завишен риск от възникване на постоперативни усложнения. Въздухът, като фактор за предаване на инфекции, подлежи на контрол, съгласно Наредба 3 от 08.05.2013 г. на Министерство на здравеопазването, с която се утвърждава медицински стандарт по превенция и контрол на вътреболничните инфекции (ВБИ). Като начален етап от предстоящи теренни проучвания, свързани с микробиологичния контрол на въздуха в рисковите болнични зена, се извърши оценка на бактериалната контаминация на въздуха в операционни зали във ВМА – МБАЛ, София. За целта са използвани два метода – седиментационен метод на Кох и автоматичен пробовземач ActiveCount. Представените резултатите обхващат периода 2017–2018 година и са анализирани в контекста на превенцията на ВБИ.

Ключови думи: операционни зали, контрол на въздуха

The microbiological contamination of the air in the operating rooms increases the risk for surgical site infections. The air quality requirements in operating theatres are regulated in Medical standard for prevention and control of nosocomial infections.

Our preliminary study represents the microbiological contamination of air in operating rooms at Military Medical Academy – Sofia. Bacterial isolation was estimated according to Koch's sedimentation method and by automatic device – ActiveCount. The results are for the period 2017–2018 and are analyzed in the context of the prevention of the healthcare-associated infections.

Keywords: operating rooms, air control

ДЕТЕКЦИЯ НА *LEPTOSPIRA* SPP. ДНК ЧРЕЗ NESTED PCR В ОРГАНИ ОТ МИШЕВИДНИ ГРИЗАЧИ

Е. Тасева, И. Христова, И. Трифонова, Е. Панайотова

Национален Център по Заразни и Паразитни болести, София
Национална референтна лаборатория по предавани с кърле-
жи инфекции, лептоспири и листериум

Въведение: Лептоспирозата е зооантропоноза с природна огнищност. Човек се заразява с лептоспири чрез животни-гостоприемници непосредствено или посредством някои елементи на външната среда. Циркулацията на лептоспирите в природата се поддържа от резервоарите и поддържащите гостоприемници. Най-голямо значение като гостоприемници в природните огнища имат представителите на разред гризачи.

Цел: за първи път в България да направим проучвания върху доказване на ДНК на *Leptospira* spp. в органи от гризачи с помощта на Nested PCR.

Материали и методи: Изследвани бяха 109 броя гризачи, събрани от 4 области в Южна България: Пловдив, Пазарджик, Смолян и Благоевград. Екземплярите принадлежаша към 8 вида гризачи. Приложен бе Nested PCR. Методът се основава на амплификацията на 331-бр фрагмент от *rrs* гените (16S р РНК) на лептоспирите. Установено е, че тестът е подходящ за детекция на ДНК на 20 серовара лептоспири и може да се открива наличност дори само на 10 бактерии. Като положителна контрола беше използвана пряно екстрахирана ДНК от 18 дневни култури на две серогрупи лептоспири: *Icterohaemorrhagiae* (серовар *copenhageni*) и *Pomona* (серовар *romana*).

Резултати: Общо при 31 от гризачите (28,44%) беше открито наличие на ДНК на *Leptospira* spp. Геномът на *Leptospira* spp. беше открит в 5 вида от изследваните гризачи: *Apodemus* spp., *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus* spp., *Sorex minutus*. Най-заразени бяха видовете: *Sorex minutus* (100%) и *Microtus* spp. (50%). При полевките от вида *Myodes glareolus* беше установено лептоспироносителство в 42,10 %. Най-висок процент заразени гризачи бе открит в област Пазарджик (25/84 – 29,8%).

Заклучение: С помощта на Nested PCR беше доказана ДНК на *Leptospira* spp. в проби от гризачи. Най-вероятно полевките от вида *Microtus* spp. са потенциален преносител на лептоспири, особено в градските зони. Установеният висок процент лептоспироносителство в област Пазарджик потвърждава активността на епизоотичния процес в това природно огнище, където в миналото са регистрирани епидемии от доброкачествени лептоспирози. Въведеният метод би подпомогнал по-бързото разясняване на епидемиологичните връзки при възникване на взрив от такава инфекция и за засилване на контрола на заболяването в определени нозогеографски ареали.

Ключови думи: лептоспироза, Nested PCR, мишевидни гризачи

DETECTION OF *LEPTOSPIRA* SPP. DNA BY NESTED PCR IN RODENT ORGANS

E. Taseva, I. Christova, I. Trifonova, E. Panayotova

National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia
National Reference laboratory of tick/vector-borne infections,
leptospirosis and listeriosis

Introduction: leptospirosis is zoonosis with natural focus. People are infected with leptospires by host animals either directly or by means of certain elements of the external environment. Circulation of leptospires in nature is maintained by reservoirs and supporting hosts. Most important of the hosts in the natural outbreaks are the rodents.

Objective: the aim of this study is for the first time in Bulgaria to do research on the DNA of *Leptospira* spp. in rodent organs by Nested PCR.

Materials and methods: 109 rodents were investigated, collected from 4 districts in Southern Bulgaria: Plovdiv, Pazardzhik, Smolyan and Blagoevgrad. The specimens belonged to eight species of rodents. Nested PCR was applied. The method is based on the amplification of the 331-bp fragment of the *rrs* genes (16S r RNA) of the leptospires. It was found that the test was suitable for DNA detection of 20 serotypes of leptospires and even 10 bacteria could be detected. Freshly extracted DNA from 18 day cultures of two serogroups leptospires: *Icterohaemorrhagiae* (serovar *copenhageni*) and *Pomona* (serovar *romana*) was used as a positive control.

Results: presence of *Leptospira* spp. DNA was found in 31 of the rodents (28.44%). The genome of *Leptospira* spp. was found in 5 species of rodents tested: *Apodemus* spp., *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus* spp., *Sorex minutus*. The most infected were species: *Sorex minutus* (100%) and *Microtus* spp. (50%). Among *Myodes glareolus*, leptospires were found in 42.10%. The highest percentage of infected rodents was found in Pazardzhik region (25/84–29.8%).

Conclusion: using Nested PCR, *Leptospira* spp. DNA was detected in rodent samples. Most likely *Microtus* spp. are a potential carrier of leptospires, especially in urban areas. The high rate of leptospires in rodents found in the Pazardzhik region confirms the activity of the epizootic process in this natural focus, where epidemics of benign leptospirosis have been recorded in the past. The introduced method would help to clarification of the epidemiological links more quickly in case of an outbreak of such an infection and to enhance the control of the disease in certain nosogeographic areas.

Key words: leptospirosis, Nested PCR, rodents

**КЛИМАТИЧНИТЕ ПРОМЕНИ,
КАТО ПРЕДПОСТАВКА ЗА УСКОРЯВАНЕ
НА СПОРОГОНИЯТА В МАЛАРИЙНИТЕ КОМАРИ
В БЪЛГАРИЯ ЗА ПЕРИОДА 2000 – 2015 Г.**

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

Национален център по заразни и паразитни заболявания,
Отдел „Паразитология и тропическа медицина“.

Цел на настоящата разработка е да анализира данните за промяна в климата на страната за периода 2000 – 2015 г. и да установи дали тези промени благоприятстват ускоряване на процеса на спорогония в маларийните комари, което от своя страна би довело до ускоряване на оборотите на маларийната инфекция и до по-ефективно разпространение на заболяването при евентуален малариен взрив.

Материали и методи. Използвани са данни на Националния институт по метеорология и хидрология към БАН: средни месечни многогодишни температури на въздуха за периода 2000–2015 г. за 28 области в България по данни от метеорологичните станции. За сравнение са използвани и данни за средните средни месечни многогодишни температури на въздуха за периода 1916–1975 г. за 28 области в България от дисертационния труд на професор д-р П. Петров „Експериментални, диагностични и епидемиологични проучвания на някои тропически и местни паразитози. Дис. г. м. н. София. 1979“. Времето необходимо за завършване на спорогония за различните маларийни причинители е изчислено по формулите на Мошковски. Данните са обработени със статистическа програма GraphPad Prism 6.

Резултати. Определени бяха средните месечни температури за двата периода – 1916–1975 и 2000–2015 г., за страната. По формулите на Мошковски беше изчислено времето за спорогония през различните летни месеци през двата периода за *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* и *Plasmodium malariae*. Установи се статистически значима разлика в средните месечни температури през 2000 – 2015 г. в сравнение с 1916–1975 г. (Paired t-test, $p=0.0026$). Установихме намаляване на времето необходимо за спорогония средно с 3 дни за *P. vivax* и *P. falciparum* и с 4 дни за *P. malariae*.

Заклучение. Някои промени в климата вече са факт. Ако тази тенденция продължи те могат да повлияят на потенциала за интензитета на разпространение не само на маларията, но и на всички векторно преносими заболявания, за които територията на страната е потенциално ендемична.

Ключови думи: спорогония, малария, температури.

**CLIMATE CHANGES AS A PREREQUISITE FOR
ACCELERATED SPOROGONY IN MALARIA
TRANSMITTING MOSQUITOES IN BULGARIA FOR
THE PERIOD 2000–2015**

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

National Center for Infectious and Parasitic Diseases, Department
of Parasitology and Tropical Medicine

Aim of this paper is to analyze the country's climate change data for the period 2000–2015 and to determine whether these changes favor acceleration of sporogony in malaria mosquitoes, which in turn would lead to an acceleration of the malaria infection rate in a case of an outbreak.

Materials and methods. We used data from the National Institute of Meteorology and Hydrology of the Bulgarian Academy of Sciences: average monthly multi-annual air temperatures for the period 2000–2015 for 28 districts in Bulgaria according to data from meteorological stations. For comparison we used data on the average monthly multi-annual air temperatures for the period 1916–1975 for 28 districts in Bulgaria of the dissertation work of Professor Dr. P. Petrov: “Experimental, diagnostic and epidemiological studies of some tropical and local parasitoses. Dis. dm. n. Sofia. 1979“. The time necessary to complete sporogony for various species plasmodia was calculated using the Moshkovski method. Data were processed using the GraphPad Prism 6 statistical program.

Results. The average monthly temperatures for the two periods – 1916–1975 and 2000–2015 – were set for the country. Calculated was the time needed for sporogony during different summer months in the two periods for *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae*. There was a statistically significant difference in mean monthly temperatures in the years 2000–2015 compared to 1916–1975 (Paired t-test, $p = 0.0026$). We found a reduction in the time necessary for sporogony on average by 3 days for *P. vivax* and *P. falciparum* and 4 days for *P. malariae*.

Conclusion. Some climate change is already a fact. If this trend continues, these changes can affect not only the potential for malaria transmission, but also of all vector-borne diseases for which the territory of the country is potentially endemic.

Key words: sporogony, malaria, temperatures.

**PCR ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ
ЗАРАЗНОСТТА НА КЪРЛЕЖИТЕ С *BORRELIA
BURGDORFERI*, СВАЛЕНИ ОТ ПАЦИЕНТИ
ПРЕЗ 2017ГОДИНА И СРАВНЕНИЕ
С ДАННИТЕ ОТ 2016ГОДИНА**

*Т. Гладнишка, И. Христова, И. Трифонова,
В. Иванова, Е. Панайотова, Е. Тасева*

НЦЗГПБ

Цел: Да се проучи заразеността на кърлежите с *Borrelia burgdorferi*, свалени от пациенти през 2017г. от различни региони на страната и сравнение с данните от 2016г.

Материали/методу: Събрани бяха общо 1895 броя кърлежи, свалени от пациенти от цялата страна. Определени бяха до вид с помощта на определителя на Померанцев. Проведохме nested PCR за доказване на два участъка от спейсърния регион между 5S и 23S на рНК на *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

Резултати: С помощта на определителя установихме, че 1080 броя (над 92%) от кърлежите спадаха към вида *Ixodes ricinus*, 32 броя -*Rhipicephalus sanguineus*, 29 броя - *Dermacentor marginatus*, 10 -*Rhipicephalus bursa*, 4 -*Hyalomma marginatum* 3 от вида *Haemaphysalis punctata*. С PCR получихме данни за 20,69% (249/1203) заразеност на кърлежите от София град и 20%(68/340) заразеност на кърлежите от Софийска област. Средно за страната през 2017г. заразеността възлизаше на 21% (398/1895).

Заклучение: PCR данните показаха повишаване на заразеността на кърлежите от 16,7% през 2016г. на 21% през 2017г. Най-значително нарастване беше установено при нимфите, съответно от 15,93% на 25,30%. Ролята на другите стади на кърлежите и получаването на по-детайлни данни за заразеността им в различните региони на страната ще бъдат изяснени при по-нататъшни проучвания, базирани на по-голям брой проби.

Ключови думи: *Borrelia burgdorferi*, PCR, ticks

**МОЛЕКУЛЯРНА ДИАГНОСТИКА
НА БУНЯ- И ФИЛОВИРУСИ**

Е. Панайотова, И. Трифонова, И. Христова

Национален център по заразни и паразитни болести, София

Увог: Вирусните хеморагични трески са група инфекциозни заболявания с висок леталитет, причинявани от няколко семейства РНК вируси, включително Буня- и Филовируси. България е ендемичен регион за Кримска-Конго хеморагична треска (ККХТ) и хеморагична треска с бъбречен синдром (ХТБС), които се причиняват от вируси от семейство *Bunyaviridae*. А последната епидемия от Ебола в Западна Африка показва, че е необходима и бърза и надеждна диагностика и на Филовирусни инфекции.

Цел: Да се адаптират молекулярно-генетични методи за детекция на Буня- и Филовируси.

Материали и методу: Клинични материали, референтни проби и проби, изпратени с цел контрол на качеството на вирусологичната

**PCR STUDY ON TICKS REMOVED
FROM PATIENTS FROM DIFFERENT REGIONS
OF THE COUNTRY IN 2017 FOR INFECTIONS
WITH *BORRELIA BURGDORFERI*
AND COMPARED TO 2016 YEAR DATA**

*T. Gladnishka, I. Christova, I. Trifonova,
V. Ivanova, E. Panayotova, E. Taseva*

NCIPD

Aim: To investigate the infections with *Borrelia burgdorferi* inticks removed from patients in 2017 from different regions of the country and compared to 2016 year data.

Materials/methods: Total 1895 ticks were collected from patients all over the country. They were identified by Pomerantsev's identifier. Nested PCR were performed to prove two regions of the spacer region between 5S and 23S of *Borrelia burgdorferi sensu lato* rRNA.

Results: 1080 ticks (over 92%) of the species *Ixodes ricinus* were collected, 32 - *Rhipicephalus sanguineus*, 29 - *Dermacentor marginatus*, 10 - *Rhipicephalus bursa*, 4 - *Hyalomma marginatum* and 3 of *Haemaphysalis punctata*. PCR data for infestation of ticks from Sofia city were found in 20,69% (249/1203) of the samples and 20% (68/340) infestation of tick's samples from the Sofia region. The average infestation of the country amounted to 21% (398/1895) in 2017.

Conclusion: PCR data showed an increase in tick infestation from 16,7% in 2016 to 21% in 2017. The most significant increase in infestation was found in nymphs, respectively from 15,93% to 25,30%. The role of other tick's stages and more precise data for tick's infestation in other regions of the country will be clarified by further studies based on the larger number of samples.

Key words: *Borrelia burgdorferi*, PCR, ticks

**MOLECULAR DIAGNOSIS
OF BUNYA- AND FILOVIRUSES**

E. Panayotova, I. Trifonova, I. Christova

National center of infectious and parasitic diseases, Sofia

Introduction: Viral hemorrhagic fevers (VHFs) are a group of infectious diseases with high lethality rate, which can be caused by several families of RNA viruses, including *Bunyaviridae* and *Filoviridae*. Bulgaria is endemic for both Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) and Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), which are caused by viruses of the *Bunyaviridae* family. The last and largest Ebola outbreak in Western Africa on the other hand, showed the necessity of rapid and reliable diagnosis of filoviral infections.

Objective: Adaptation of molecular techniques for the detection of Bunya- and Filoviruses.

Materials and methods: Clinical specimens, reference samples and samples sent for quality control of virological diagnostics were tested using conventional, nested and qRT-PCR.

диагностика бяха изследвани с помощта на конвенционален, nested и qRT-PCR.

Резултати: Успешно бяха приложени и оптимизирани qRT-PCR и nested PCR за вируса на ККХТ и хантавируси. Апробиран беше и one step RT-PCR за рутинна диагностика на представители на семейство *Filoviridae*. С цел доуточняване на диагностиката бяха въведени и one step RT-PCR протоколи за детекция и разграничаване на причинителите на заболяване Ебола и заболяване Марбург.

Заключение: Всички адаптирани и въведени протоколи позволяват бърза и точна детекция на причинителите на вирусни хеморагични трески, необходима за вземане на мерки за ограничаване на епидемии.

Ключови думи: PCR, Бунявируси, Филовируси

– 42 –

ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА АРБОВИРУСИ

*И. Трифонова, И. Христова,
Е. Панайотова, Т. Гладнишка, В. Иванова*

НЦЗПБ, НРА Кърлежово/векторно преносими инфекции, листери и лептоспири

Цел: Развиване на диагностичните възможности за ранна и надеждна детекция на арбовируси.

Материали/методи: клинични материали, референтни проби и проби, изпратени с цел контрол на качеството на вирусологичната диагностика.

Резултати/Обсъждане: Броят на векторно-преносимите вируси (кърлежово и комарно), е огромен. Те са широко разпространени и могат да предизвикат от леки самоограничаващи се заболявания до тежко протичащи такива, с летален изход. Към тях спадат вирусите на Кърлежовия енцефалит (TBEV) и Западно-Нилска треска (WNV), причинителите на Денга (DENV), Жълта треска (YFV), Японски енцефалит (JEV), а също и Зика (ZIKV) и Тоскана (TOSV) вируси. От изброените в България се срещат вирусите на Кърлежовия енцефалит и Западно-Нилската треска. Но в съвременния глобален свят, възможността за внос на инфекции е реален факт и готовността за тяхното навременно диагностициране е от огромно значение.

Генетичните методи позволяват директната детекция на вируса в клиничните материали в най-ранните етапи на инфекцията, преди развиването на имунен отговор и прилагането на другите диагностични методи. През последните години в НРА Кърлежово/векторно преносими инфекции на НЦЗПБ са апробирани за рутинна диагностика редица нови PCR протоколи – както конвенционални, така и Real time. В момента в лабораторията се осъществява диагностика с генетични методи на WNV (Real time PCR за детекция на линия 1 и 2), ZIKV (конвенционен и Real time PCR) и протоколи за детекция в реално време на TBEV, DENV, YFV, TOSV и др. Доказателство за надеждността на въведените методи е отличното представяне на лабораторията в редица международни контроли за външна оценка на качеството.

През изминалата година са изследвани голям брой клинични материали на пациенти, суспектни за ЗНТ, КЕ, Зика и Денга. Генетично са потвърдени случаи на Западно-Нилска треска и вносен случай на Денга треска.

Ключови думи: Арбовируси, генетични методи

Results: Nested and qRT-PCR protocols for CCHF and HFRS diagnosis were successfully optimized. A sensitive universal one step RT-PCR assay for Filoviruses was also optimized, allowing for the detection of all species in the family. For further differentiation of Ebola and Marburg diseases one step RT-PCR protocols were introduced.

Conclusion: All of the PCR assays allow for a rapid and accurate detection of VHF agents, which is vital for preventing outbreaks.

Key words: PCR, Bunyaviridae, Filoviridae

– 42 –

GENETIC METHODS FOR DETECTION OF ARBOVIRUSES

I. Trifonova, I. Christova, E. Panayotova, T. Gladnishka, V. Ivanova

NCIPD, NRL Vector-borne infections

Aim: Improving diagnostic capabilities for early and reliable detection of arboviruses.

Materials/Methods: clinical samples, reference samples and samples sent for the purpose of quality control of virological diagnosis.

Results/Conclusions: The number of vector-transmissible viruses (tick- and mosquito-borne) is huge. They are widespread and can cause from mild self-limiting illnesses to severely ones with fatal outcome. Important viruses in this group are Tick-borne encephalitis virus (TBEV), West Nile Fever virus (WNV), causative agents of Dengue fever (DENV), Yellow fever (YFV), Japanese encephalitis (JEV), as well as Zika (ZIKV) and Toscana (TOSV) viruses. Among them, known in Bulgaria are TBE and WNV. But in the global world, the possibility of importing infections is a real fact and the preparedness for fast and accurate diagnosis is very important.

Genetic methods allow direct detection of the virus in clinical materials at the early stages of the infection, before the development of an immune response and the application of other diagnostic methods. In recent years, a number of new PCR protocols, both conventional and Real time, have been implemented for routine diagnostics in our laboratory. At the moment, the lab performs diagnostic with genetic methods for WNV (Real Time PCR detection for line 1 and 2), ZIKV (conventional and Real time PCR) and real-time detection protocols of TBEV, DENV, YFV, TOSV. Verification for the reliability of the introduced methods is the excellent performance of the laboratory in a number of international external quality assessment controls.

Over the past year, a large number of clinical materials have been investigated from patients suspected for WNV, TBE, Zika, and Dengue. Confirmed with genetic tools was West Nile Fever and imported case of Dengue fever.

Key words: arboviruses, genetic methods

РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА АЗИАТСКИЯ ТИГРОВ КОМАР *Aedes albopictus* В БЪЛГАРИЯ ПРЕЗ 2017 Г.

Огнян Миков

Национален център по заразни и паразитни болести, София

Цел: Азиатският тигров комар *Aedes albopictus* е инвазивен вид, установен за пръв път в България през 2011 г. в област Бургас. Между 2012 и 2016 г. е установен в шест области на страната, като се очаква ареалът му да се разширява.

Материали и методи: От август до октомври 2017 г. в изпълнение на дейностите, заложи в програмата на мрежата VectorNet, са проведени полеви проучвания за установяване на вида в областите Благоевград, Бургас, Варна, Велико Търново, Видин, Враца, Добрич, Кърджали, Монтана, Пазарджик, Плевен, Пловдив, Русе, Силистра, Сливен, Стара Загора, Хасково и Ямбол. Уловът е провеждан с капани за яйцеснасяне, посредством които се установяват яйца, снесени от женските на *Ae. albopictus*. Общо 234 сбора на субстратите за яйцеснасяне са проведени в 26 локации на 18 области. В 21 локации от капаните са събрани ларви, които са отглеждани до имаго в лабораторни условия. Възрастните комари са определяни видово по морфологични белези.

Резултати: Присъствието на *Ae. albopictus* се потвърждава в областите Благоевград, Бургас, Враца, Монтана, Пловдив и Стара Загора. За пръв път се установява в областите Варна, Видин, Кърджали, Пазарджик, Русе, Сливен, Хасково и Ямбол. В областите Велико Търново, Добрич, Плевен, и Силистра тигровият комар не е установен.

В областите, в които е разпространен, *Ae. albopictus* е установяван в селища с надморска височина между 10 и 371 м. Присъствието му в различни части на България предполага разпространение както от една област в съседните ѝ, така и многобройни, независими една от друга точки на внос.

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

EXPANSION OF THE ASIAN TIGER MOSQUITO *Aedes albopictus* IN BULGARIA IN 2017

Ognyan Mikov

National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

Aim: The Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* is an invasive species found for the first time in Bulgaria in 2011 in Burgas region. Between 2012 and 2016, it has established in six regions of the country, and its range is expected to expand.

Materials and methods: From August to October in 2017, by implementing the activities planned in the VectorNet network, field studies were conducted to detect the species in Blagoevgrad, Burgas, Varna, Veliko Tarnovo, Vidin, Vratsa, Dobrich, Kardzhali, Montana, Pazardzhik, Pleven, Plovdiv, Ruse, Silistra, Sliven, Stara Zagora, Haskovo and Yambol regions. The sampling was performed by ovitraps used to detect eggs laid by the females of *Ae. albopictus*. A total of 234 oviposition substrates were collected from 26 locations in 18 regions. Mosquito larvae collected from ovitraps in 21 locations were raised to adults under laboratory conditions. Adult mosquitoes were identified morphologically.

Results: The establishment of *Ae. albopictus* was confirmed in the regions of Blagoevgrad, Burgas, Vratsa, Montana, Plovdiv and Stara Zagora. For the first time it was detected in the regions of Varna, Vidin, Kardzhali, Pazardzhik, Ruse, Sliven, Haskovo and Yambol. In the regions of Veliko Tarnovo, Dobrich, Pleven and Silistra the Asian tiger mosquito was not found.

In areas where it was present, *Ae. albopictus* was found in settlements with an altitude between 10 and 371 metres above sea level. Its presence in different parts of Bulgaria suggests both distribution from one region to the neighbouring ones, and numerous independent introductions from different points of entry.

Keywords: *Aedes albopictus*, expansion, Bulgaria

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ ПАРАМЕТРИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВИСЦЕРАЛНА И КОЖНА ЛАЙШМАНИОЗИ

Красимира Енева, Албена Масарлиева

Медицински Университет – Пловдив
Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина

Въведение: Използването на серологични / имунологични / методи за диагностика на паразитозите е с преваляващо значение при някои кръвни и тъканни паразитози. Диагнозата на заболяването висцерална лайшманиоза, както и кожна лайшманиоза, се поставя въз основа на клинично-епидемиологични данни и лабораторно – паразитологични показатели. Напоследък зачестяват случаите на внесена и местна висцерална и внесена кожна лайшманиоза, при които се различава предимно на серологичната диагностика.

Цел: да представим преваляващото значение на серологичните методи при диагностиката на висцералната и кожна лайшманиоза.

CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS IN PATIENTS WITH VISCERAL AND CUTANEOUS LEISCHMANIOSES

Krasimira Eneva, Albena Masarlieva

Medical University – Plovdiv, Department of Infectious diseases,
Parasitology and Tropical medicine

Introduction: serological methods for diagnosis of parasitic diseases have leading role in blood and tissue parasitoses. The diagnosis of visceral and cutaneous leishmanioses is made on clinical, epidemiological, laboratory and parasitological data. Lately an increase of imported and local cases of visceral leishmaniosis is observed. Serological tests are the keystone for its diagnosis.

Aim: To present the prevailing (leading) significance of serological methods in the diagnosis of visceral and cutaneous leishmanioses.

Materials and methods: laboratory, serological and parasitological diagnosis of visceral and cutaneous leishmanioses by ELISA and DAT was presented. Morphological finding of parasites were not found in bone marrow specimen (either because of refusal for BMP or negative result) and cutaneous lesion.

Материали и методи: представяме лабораторна, серологична, паразитологична диагностика при пациенти с висцерална и кожна лайшманиоза / внесена и местна / – с метод ЕЛИЗА и ДАТ, без да е налична морфологична находка на лайшманийни форми от КМП /поради отказ от КМП или негативен резултат / или от кожни лезии.

Резултати и обсъждане: представяме възможност за различен диагностичен алгоритъм като потвърждаваме значението на рано позитивизираните серологични реакции ЕЛИЗА, РИХА, РДА и др. за диагностика на висцералната и кожна лайшманиоза, които откриват специфични, антилайшманийни антитела и позволяват своевременно, рано и успешно етиологично лечение.

Изводи и заключение : Установен е ранен имунен отговор, в част от случаите и преди пълната клинична и параклинична изява на висцералната лайшманиоза, което позволи бърза и адекватна етиологична терапия, цялостно овладяване на клиниката и пълното им възстановяване.

Ключови думи: висцерална и кожна лайшманиоза, антилайшманийни антитела.

Results and discussion: possibility for different diagnostic algorithm was presented. It confirmed the significance of early positive serological reactions ELISA, RIHA, RDA and etc. for the diagnosis of visceral and cutaneous leishmanioses. These tests detect specific anti-leishmania antibodies and allow timely, early and successful ethiological treatment.

Conclusion: early immune reaction was found in some of the cases, before the change of laboratory tests and complete clinical manifestation of visceral and cutaneous leishmanioses. This allowed quick and adequate ethiological treatment, complete control in all cases.

Key words: visceral and cutaneous leishmanioses, antileishmania antibodies

– 45 –

РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА ВИДОВЕТЕ *MALASSEZIA* SPP. СРЕД ПАЦИЕНТИ СЪС СЕБОРЕЕН ДЕРМАТИТ

V. Райкова¹, P. Байкушев¹, И. Митов

¹Катедра Медицинска микробиология, МУ-София

Въведение: *Malassezia* spp. са липофилни гъби, част от нормалната флора на човешката кожа, които се срещат при около 75–98% от здравите възрастни индивиди. Тези дрожди, обаче, се асоциират с развитието и на няколко често срещани заболявания като себореен дерматит, pityriasis versicolor, фоликулит, псориазис и atopичен дерматит.

Цел на настоящата разработка е проучване разпространението на видовете *Malassezia* spp. сред пациенти със себореен дерматит.

Материали и Методи: В настоящото проучване са включени общо 30 пациенти с активен себореен дерматит, които не са прилагали локална или системна терапия в предишните поне 2 месеца. Бяха взети материали чрез остъргване от засегнатата кожна област, посети в модифицирана среда CHROMagar *Malassezia*. След култивиране от чистата култура бе взет материал за ДНК екстракция и провеждане на последващи 26S rDNA PCR-RFLP анализи.

Резултати: *M. globosa* бе идентифицирана в 33.3% (10), *M. restricta* в 23.3% (7), *M. furfur* в 10.0% (3), *M. obtusa* в 6.7% (2) и *M. sympodialis* в 3.3% (1) от субектите. При двама пациенти бяха доказани два вида *Malassezia* – *M. globosa* и *M. restricta*, както и *M. globosa* и *M. sympodialis*.

Заключение: Това е първото по рода си проучване в България за разпространението на видовете *Malassezia* при пациенти със себореен дерматит. *M. globosa* и *M. restricta* са най-често регистрираните видове. Въпросите „Защо някои индивиди развиват клинични прояви в резултат на поселяване на кожата с видовете *Malassezia*, а други – не“, „Защо някои хора развиват дадено заболяване, а други различно“, както и „Кои щамове как са разпространени и има ли асоциация с тяхното присъствие и тежестта на клиничната изява“ останаха неизяснени и изискват нови и задълбочени проучвания.

Ключови думи: себореен дерматит, *Malassezia* spp., PCR-RFLP анализ;

– 45 –

DISTRIBUTION OF *MALASSEZIA* SPP. AMONG PATIENTS WITH SEBORRHOIC DERMATITIS

V. Raykova¹, R. Baykushev¹, I. Mitov¹

¹Department of Medical microbiology, MU-Sofia

Introduction: *Malassezia* species are lipophilic fungi which are regarded as part of the normal flora of human skin, and are found in 75–98% of healthy individuals. These yeasts appear to be involved in the pathogenesis of common skin disorders such as seborrheic dermatitis, pityriasis versicolor, folliculitis, psoriasis, atopic dermatitis.

Objective: To identify the distribution of *Malassezia* species among patients with seborrheic dermatitis.

Materials and Methods: A total of 30 patients with seborrheic dermatitis and without any treatment in the previous 2 months were included in the study. Scales from lesions were collected by scrapping and swabbing and added to the modified CHROMagar *Malassezia* media. After cultivation from the pure cultures DNA extraction was done and 26S rDNA PCR-RFLP analysis performed.

Results: *M. globosa* was identified in 33.3% (10), *M. restricta* in 23.3% (7), *M. furfur* in 10.0% (3), *M. obtusa* in 6.7% (2) and *M. sympodialis* in 3.3% (1) of the subjects. In two patients combination of fungi was detected – *M. globosa* together with *M. restricta*, as well as *M. globosa* and *M. sympodialis*.

Conclusions: This is the first study of its kind in Bulgaria for the distribution of *Malassezia* species in patients with seborrheic dermatitis. *M. globosa* and *M. restricta* are the most commonly registered species. Questions as “Why do some individuals develop clinical manifestations when attacked by *Malassezia* spp. meanwhile others – not”; “Why there are different disorders stimulated by the same microorganism”; “How the strains are spread in healthy and ill persons”, as well as “Is there an association between the concentrations of *Malassezia* spp. and the severity of the clinical manifestation” remain unclear and require new and in-depth studies.

Key words: Seborrheic dermatitis, *Malassezia* spp., PCR-RFLP analysis;

НАШИЯТ ОПИТ С ЧЕТВЪРТИЧНИТЕ АМОНИЕВИ СЪЕДИНЕНИЯ (ЧАС) – ЕФЕКТИВНОСТ И ПРОБЛЕМИ

Николова М., С. Йорданова, И. Христоскова-Дачева

Национален център по заразни и паразитни болести

Четвъртичните амониеви съединения (ЧАС) са група активни вещества, които участват в състава на дезинфектанти, основно предназначени за повърхности и за лична хигиена. Ефективни са срещу вегетативни бактерии, вируси с обвивки и някои фунги. Тяхната ефективност се влияе от вида на биоцидната формулация, от използваните ко-формулант, концентрацията и времето за контакт. Съвместими са с нейногенни детергенти и се инактивират от аниоактивни ПАВ. Във връзка с това, представяме установени от нас резултати за дезинфектанти, съдържащи ефективни концентрации на ЧАС, които се оказват неефективни при тяхното изпитване по стандартни суспензионни методи в лаб. „Дезинфекция и стерилизация“ към НЦЗПБ.

Ключови думи: дезинфекция, четвъртичните амониеви съединения (ЧАС)

OUR EXPERIENCE WITH QUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS (QACS) – EFFECTIVENESS AND PROBLEMS

Nikolova M., S. Yordanova, I. Hristoskova-Dacheva

National Centre of Infectious and Parasitic Diseases

Quaternary ammonium compounds (QACs) are a group of active substances that are involved in the composition of disinfectants primarily designed for surfaces and for personal hygiene. They are effective against vegetative bacteria, enveloped viruses and some fungi. Their effectiveness depends on type of biocidal formulation, co-formulants, concentration and contact time. They are compatible with non-ionic detergents and they are inactivated by anionic surfactants. We present our results for some disinfectants containing effective QACs concentrations which prove to be ineffective in testing by standard suspension methods in lab. „Disinfection and sterilization“ at NCIPD.

Keywords: disinfection, Quaternary ammonium compounds

СЕРОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ХЕПАТИТНИ МАРКЕРИ ПРИ НОВОДИАГНОСТИЦИРАНИ HIV/AIDS ПОЛОЖИТЕЛНИ ПАЦИЕНТИ

Елица Голкочева-Маркова¹, Антон Тимчев², Диляна Трандева-Банкова¹, Тенчо Тенев¹, Ивайло Алексиев³, Ася Костадинова³, Ренета Димитрова³, Лора Николова³, Ивайло Еленков²

1. НРЛ Хепатитни вируси, НЦЗПБ – София
2. СБАЛИПБ „проф. Иван Киров“ – София
3. НРПЛ по HIV/СПИН, НЦЗПБ – София

Цел: Във времето на антиретровирусната терапия (ART), чернодробните заболявания предизвикани от хепатитни инфекции са водеща причина за смъртност при HIV позитивни лица. Цел на настоящето проучване е да се определи разпространението на серологични маркери за наличие на хепатит В (HBV) и хепатит С (HCV) вирусите при новодиагностицирани HIV/AIDS положителни пациенти.

Материали и методи: За периода Маѝ – Декември 2017 година в НРЛ „Хепатитни вируси“ са тествани 139 новодиагностицирани HIV/AIDS пациенти. Серумна проба от всеки пациент е тествана за наличие на HBV и HCV маркери, а именно – HBV повърхностен антиген (HBsAg) и антитела срещу него (HBsAb), антитела срещу сърцевинния антиген на HBV (HBcAb) и антитела срещу HCV вируса (HCVAb). В серумните проби положителни за HBsAg и HCVAb е определен вирусния товар по отношение на съответния вирус.

Резултати: От 138 пациента 64 (46%) са дали положителен резултат поне по един хепатитен маркер, като от тях 15 (11%) са положителни за HCVAb, 14 (10%) – за HBsAg и 1 (1%) е с положителен резултат по отношение и на двата маркера – HBsAg и HCVAb. При 43 (35%) от 124 HBsAg отрицателни пациенти е установено наличие на HBsAb като 10 (23%) са с така наречения „anti-HBc сам“ серологичен профил, а 31

SEROLOGICAL SURVEY OF VIRAL HEPATITIS MARKERS AMONG NEWLY DIAGNOSED HIV POSITIVE PATIENTS IN BULGARIA

Elitsa Golkocheva-Markova¹, Anton Timchev², Diljana Trandeva-Bankova¹, Tencho Tenev¹, Ivailo Alexiev³, Asja Kostadinova³, Reneta Dimitrova³, Lora Nikolova³, Ivailo Elenkov²

1. NRL “Hepatitis viruses”, NCIPD, Sofia, Bulgaria
2. Specialized hospital for active treatment of infectious diseases, Sofia, Bulgaria
3. NRCL for HIV, NCIPD, Sofia, Bulgaria

Background: In the era of antiretroviral therapy (ART), liver disease from hepatitis virus co-infection is a leading cause of morbidity and mortality in the HIV-positive population. The aim of the study was to determine the seroprevalence of hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infection among patients newly diagnosed with HIV/AIDS.

Methods: One hundred thirty-eight patients newly diagnosed with HIV/AIDS were tested in NRL “Viral hepatitis” during May to December 2017. Serum samples obtained from each individual were screened for HBV and HCV serum markers – HBV surface antigen (HBsAg), HBV surface antibody (HBsAb), HBV core antibody (HBcAb) and HCV antibody (HCVAb). HBV DNA and HCV RNA were then determined in HBsAg positive and in HCVAb positive patients respectively.

Results: Of the 138 patients 64 (46%) were positive for at least one hepatitis serum marker from whom 15 (11%) were HCVAb positive, 14 (10%) were positive for HBsAg and 1 (1%) was positive for both HBsAg and HCVAb. In 43 (35%) of 124 HBsAg negative patients the presence of HBcAb were established from whom 10 (23%) were with so called “anti-HBc alone” serological pattern and 31 (72%) had resolved HBV infection (HBsAb/HBcAb positive). HBV DNA viral load was available for 23 HIV positive patients and HCV RNA –for 14 of them.

(72%) показват маркери за изчистена HBV инфекция (HBsAb/HBcAb положителни). Хепатит В вирусния товар е определен при 23 HIV позитивни, а на HCV – при 14.

Заклучение: Преобладаването на серологични маркери по отношение на HBV и HCV вирусите сред новодиагностицирани HIV/AIDS български пациенти е високо. Тези пациенти от своя страна са с висок риск от развитие на патологични чернодробни промени. Това налага необходимостта от проследяване наличието на маркери по отношение както на настоящи така и на отминали HBV и HCV вирусни инфекции.

Благодарности: Проучването се финансира по договор № Д-130/2017 на Съвета по Медицински Науки към Медицински Университет – София

Ключови думи: HIV, хепатит, серологични маркери

– 48 –

МУЛТИПЛЕКСЕН PCR В ДИАГНОСТИКАТА НА CLOSTRIDIUM DIFFICILE ИНФЕКЦИИ

Й. Калчев^{1,2}, Е. Христозова^{1,2},

Л. Коичева², Е. Добрева³, М. Мурджева^{1,2}

1. Катедра по Микробиология и Имунология, Фармацевтичен факултет, Медицински Университет – Пловдив;
2. Лаборатория по Микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив;
3. Национална референтна лаборатория „Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност“, Национален център по заразни и паразитни болести, София;

Цел: Да се оцени приложението на мултиплексна полимеразна верижна реакция (mPCR) за бързата диагностика на *Clostridium difficile* инфекции.

Материал и методи: За периода април-юни 2017 г. се изследваха фекални проби взети от 24 пациента със съмнение за псевдо-мембранозен колит. Мултиплексен PCR (Biofire FilmArray, Biomérieux) бе сравнен заедно с ELISA тест (Copro ELISA *C. difficile* Toxin A/B, Savyon Diagnostics) и имунохроматографски метод (*Clostridium difficile* Toxin A/BCerTest Biotec) за детекция на токсин A/B на *C. difficile*. Средната възраст на пациентите бе 39,4 години във възрастовия интервал 1 – 85 г., като мъжете съставляваха 70,8 % (n=17), докато жените 29,2 % (n=7). Пациентите са били хоспитализирани в клиниките по гастроентерология, инфекциозни болести и педиатрия на УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив.

Резултати: *C. difficile* беше доказан в 16,7 % (n=4) едновременно от mPCR и ELISA методите, докато имунохроматографският тест беше отрицателен при всички проби. Три от положителните за *C. difficile* проби бяха потвърдени и от Националната референтна лаборатория „Контрол и мониториране на антибиотичната резистентност“. Другата проба не беше изпратена поради недостатъчно количество. Чрез mPCR се откриха и други единични бактерии – *E. coli* група EPEC в 20,8 % (n=5) и *Y. enterocolitica* в 4,2 % (n=1). В една от пробите се доказва едновременно *C. difficile* и *E. coli* група STEC.

Заклучение: Мултиплексният PCR Film Array има значителна роля в диагностиката на *C. difficile* инфекции, поради бързата детекция и възможността за откриване и на други патогени при пациенти с диаричен синдром. Имунохроматографският метод не успя да идентифицира *C. difficile* в изследваните проби.

Ключови думи: *Clostridium difficile*, PCR Film Array, имунохроматографски метод

Conclusions: The seroprevalence of HBV and HCV among patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Bulgaria is high. Patients newly diagnosed with HIV/AIDS and co-infected with HBV and HCV are at higher risk of abnormal liver function. It is necessary to routinely screen for HBV and HCV infection among patients newly diagnosed with HIV/AIDS in order to established present and past hepatitis infections.

Acknowledgments: The study is funded by Grant № D-130/2017 of the Council of Medical Sciences, Medical University, Sofia, Bulgaria.

Key words: HIV, hepatitis, serological markers

– 48 –

MULTIPLEX PCR IN THE DIAGNOSIS OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTIONS

Y. Kalchev^{1,2}, E. Hristozova^{1,2}, E. Dobreva³, M. Murdjeva^{1,2}

1. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Plovdiv;
2. Laboratory of Microbiology, University Hospital “St. George” – Plovdiv;
3. National Reference Laboratory “Control and Monitoring of Antimicrobial Resistance”, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia;

Aim: To assess the application of multiplex polymerase chain reaction (PCR) for the rapid diagnosis in patients with *Clostridium difficile* infections.

Material and Methods: This study included stool samples obtained from 24 patients suspected of having *C. difficile* infection during April – June 2017. Multiplex PCRGI Panel (Biofire FilmArray, Biomérieux) was compared against ELISA test (Copro ELISA *C. difficile* Toxin A/B, Savyon Diagnostics) and immunochromatographic method (*Clostridium difficile* Toxin A/BCerTest Biotec) both detecting Toxin A/B of *Clostridium difficile* in stool samples. The mean age of patients was 39,4 years in the age range 1 to 85 years, as males were 70,8 % (n=17) and females 29,2 % (n=7). Patients were admitted in Gastroenterology, Infectious diseases and Pediatrics at University Hospital “St. George” – Plovdiv.

Results: *C. difficile* was detected by both multiplex PCR and ELISA in 16,7% (n=4), whereas immunochromatographic method was negative for all of the specimens. Three of the positive for *C. difficile* samples were confirmed by real time PCR at the National Reference Laboratory “Control and Monitoring of Antimicrobial Resistance”. The fourth specimen was not sent due to insufficient amount. Additional bacteria were detected by mPCR as single pathogens – *E. coli* group EPEC in 20,8 % (n=5) and *Y. enterocolitica* in 4,2 % (n=1). One sample was positive for both *C. difficile* and *E. coli* group STEC.

Conclusion: Multiplex PCR plays a considerable role in the diagnosis of *C. difficile* infection due to the rapid diagnosis and the ability to detect additional pathogens in patients with diarrhea. Immunochromatographic test failed to identify *C. difficile* in the tested stool samples.

Key words: *Clostridium difficile*, PCR FilmArray, immunochromatographic method

ПРОУЧВАНЕ НА НОЗОКОМИАЛНИТЕ ПНЕВМОНИИ В ИНТЕНЗИВНИТЕ ОТДЕЛЕНИЯ ЗА ВЪЗРАСТНИ В УМБАЛСМ „Н. И. ПИРОГОВ“

*Е. Терзиева, М. Лесева, Ц. Господинова,
Ц. Чалашканов, Е. Замфинова*

УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, Лаборатория по Микробиология

Въведение: Нозокомиалните пневмонии (НП) са едни от най-честите вътрешболнични инфекции сред пациентите на интензивните отделения (ИО). Те са водеща причина за заболяемост и смъртност и често се причиняват от множество-резистентни (MDR) патогени.

Цел на проучването е да се анализира етиологията на НП в ИО за възрастни в УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, да се коментират превантивните мерки и принципите за емпирична и дефинитивна антимикробна терапия на тези инфекции.

Материали и методи: Настоящото ретроспективно проучване включва всички клинични изолати от материали от голните дихателни пътища, изпратени за период от 30 месеца (1.01.2015 г. – 30.06.2017 г.) от три ИО на Болницата (Клиника за интензивно лечение; ИО към Клиниката по Неврохирургия и ИО към Клиниката по Изгаряне и Пластична Хирургия). Култивирането, идентификацията и изпитването на антимикробната чувствителност на изолираните микроорганизми се извършваха чрез рутинни методи и чрез автоматизираната система Vitek 2 Compact, Bio-Merieux. Механизмите на резистентност се проучваха с помощта на скрининговите и потвърдителните фенотипни методи, препоръчвани от EUCAST.

Резултати: Най-често изолираните патогени от материали от голни дихателни пътища бяха, както следва: *A. baumannii* – 614 щам (42,1%), *P. aeruginosa* – 285 щам (19,5%) и *K. pneumoniae* – 155 щам (10,6%). От изолатите *A. baumannii*, 97,7% бяха карбапенем-резистентни (CR) и 36,1% бяха MDR. От изолатите *P. aeruginosa*, 62,19% бяха CR. ESBL – продуциращите *K. pneumoniae* изолати представляваха 98,46%, а 35,38% бяха CR. Дискутират се основни и специфични мерки за успешна превенция на НП, с акцент върху почистването и стерилизацията на респираторната апаратура; придържане към пакета мерки и протокола за грижи при пациенти на механична вентилация; най-подходящите схеми за антимикробна терапия

Заклучение: Необходими са превантивни мерки за контрол на НП, спазване на пакета от мерки за грижи при пациенти на механична вентилация и на правилата на Болнична антибиотична политика, за да се редуцира честотата на тези животно-застрашаващи инфекции до възможния минимум. От ключово значение за успешно лечение на НП е доброто познаване на механизмите на антимикробна резистентност, комбинирано с точна етиологична диагноза.

Ключови думи: Нозокомиална пневмония, интензивни отделения, множество-резистентни патогени.

STUDY OF NOSOCOMIAL PNEUMONIA IN ADULT INTENSIVE CARE UNITS AT UMHATEM “N. I. PIROGOV”

*E Terzieva, M. Leseva, Ts. Gospodinova,
Ts Chalashkanov, E. Zamphirova*

UMHATEM “N. I. PIROGOV”, Laboratory of Microbiology

Background: Nosocomial pneumonia (NP) is one of the most frequent nosocomial infections among patients in intensive care units (ICUs). It is a leading cause of morbidity and mortality and often involves multidrug-resistant (MDR) pathogens. The purpose of this study is to analyze the etiology of NP in ICUs for adults at UMHATEM “N. I. Pirogov”, to comment the preventive measures and principles of empiric and definitive antibiotic therapy of these infections.

Materials and methods: The current retrospective study includes all clinically relevant isolates from lower respiratory tract samples, sent for a period of 30 months (1.01.2015 – 30.06.2017) from three ICUs in the hospital (Clinic for intensive treatment; ICU in the Neurosurgery Clinic and ICU in the Burns and Plastic surgery Clinic). Cultures, identification and antimicrobial susceptibility tests of the isolated organisms were done by routine methods and the automated system Vitek 2 Compact, Bio-Merieux. The mechanisms of resistance were studied using the screening and confirmative phenotypic methods recommended by EUCAST.

Results: The most often isolated pathogens from lower respiratory tract samples were as follows: *A. baumannii* – 614 strains (42,1%), *P. aeruginosa* – 285 strains (19,5%) and *K. pneumoniae* – 155 strains (10,6%). Among the *A. baumannii* isolates, 97,7% were carbapenem-resistant (CR) and 36,1% were MDR. Among the *P. aeruginosa* isolates, 62,19% were CR. ESBL – producing *K. pneumoniae* isolates represented 98,46%, and 35,38% were CR. Basic and specific measures for successful prevention of NP are discussed with an emphasis on cleaning and sterilization of the respiratory equipment; adherence to the ventilator care bundle and protocol for care of mechanically ventilated patients; the most appropriate antimicrobial treatment schemes.

Conclusion: Preventive measures to control NP, adherence to the ventilator care bundle and to the hospital antimicrobial stewardship rules are necessary to reduce the incidence of these life-threatening infections to a possible minimum. Good knowledge of the mechanisms of antimicrobial resistance combined with exact etiological diagnosis is essential for successful treatment of NP.

Key words: Nosocomial pneumonia, Intensive care units, multidrug-resistant pathogens.

КОНТАКТНИТЕ ЛЕЩИ И ПРИНОСЪТ ИМ В ЕПИДЕМИОЛОГИЯТА НА ОЧНИТЕ ИНФЕКЦИОЗНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ – КАУЗАЛНОСТ И МОДЕРНИ ТЕРАПЕВТИЧНИ ПОДХОДИ

Милен Лазов, Симона Такова, Константин Илиев

Медицински факултет, Софийски университет
“Св. Климент Охридски”

В светлината на съвременния медицински прогрес, контактните очни лещи несъмнено представляват социално значимо постижение, но също така и заемат място като ятрогенен фактор, категорично асоцииран с нарастващото разпространение на очни инфекциозни заболявания. С особена важност се изтъква фактът, че това са състояния, водещи до преходно или трайно нарушаване на зрението, но и заплашващи интегритета на зрителния анализатор, прогресиращи до дефинитивна слепота.

Очният булб се характеризира с постоянна, резидентна флора, състояща се предимно от коагулаза-негативни стафилококи, алфа-хемолитични стрептококи, *Corynebacterium* spp. и др. Контактните лещи се явяват ятрогенен фактор, водещ до промяна в естествената микробна очна флора, както в качествен, така и в количествен аспект. Установено е, че употребата им корелира със значима редукция на резидентните микроорганизми и поява на нови, характерни предимно за кожата повърхностни родове като *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, и *Lactobacillus*. Патогенетичното значение на лещите се свързва с ролята им на медиатор по отношение на контактния път на предаване на микроорганизма до очната тъкан. От друга страна категорично е доказано действието им като ятрогенен фактор, водещ до създаване на условия, благоприятстващи развитието на патогенните бактерии. Установено е и наличието на нов клас вируси, т. нар. „Гигантски вируси“ в проби от пациенти с корнеални инфекции, носещи контактни лещи.

Представителите на родовете *Pseudomonas* и *Acinetobacter* често провокират развитието на бактериални кератити, резултиращи в развитието на корнеални язви, но също така и на силно резистентни на лечение форми на ендофталмити. Благоприятстващи фактори за това са предиспозиции като диабет, атопия, синдром на сухото око, имунокомпрометирани пациенти.

Стандартното лечение в голям брой случаи се характеризира с недостатъчна ефективност и увреждане на ретиналната структура, резултиращо в слепота или дори енуклеация. Модерните терапевтични подходи са насочени към въвеждането на нови противомикробни агенти, актуализиране на терапевтичните алгоритми и възстановяване на засегнатите структури (стволовоклетъчна терапия).

Ключови думи: контактни лещи, очни инфекциозни заболявания

CONTACT LENSES AND THEIR CONTRIBUTION TO THE EPIDEMIOLOGY OF OCULAR INFECTIOUS DISEASES – CAUSALITY AND MODERN THERAPEUTIC APPROACHES

Milen Lazov, Simona Takova, Konstantin Iliev

Faculty of Medicine, Sofia University “St. Kliment Ohridski”

In the light of modern medical progress, eye contact lenses undoubtedly represent a socially significant achievement, but also occupy a place as an iatrogenic factor, definitely associated with the increasing incidence of eye infections. Particularly important is the fact that these conditions are not only leading to transient or permanent impairment of vision, but also threatening the integrity of the visual analyzer, progressing to total blindness.

The ocular bulbus is characterised by a permanent, resident flora consisting predominantly of coagulase-negative Staphylococci, alpha hemolytic Streptococci, *Corynebacterium* spp. Contact lenses are an iatrogenic factor that leads to a change in the natural microbial eye flora, both in qualitative and quantitative terms. They have been found to correlate with significant reductions in resident microorganisms and the appearance of new species distinctive for the skin surface such as *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium* and *Lactobacillus*. The pathogenic significance of lenses is associated with their role as a mediator in contact pathway of transmission of micro-organism into the eye tissue. On the other hand, their activity is proven to be an iatrogenic factor leading to the creation of conditions conducive to the development of pathogenic bacteria. The presence of a new class of viruses, the so-called „Giant viruses“, was also found in samples of patients with corneal infections carrying contact lenses.

Representatives of the genus *Pseudomonas* and *Acinetobacter* often lead to bacterial keratitis resulting in corneal ulcers, and also highly resistant forms of endophthalmitis. Beneficial factors for this are predispositions such as diabetes, atopy, dry eye syndrome, and immunocompromised patients.

Standard treatment in a number of cases is characterised by insufficient efficacy and damage to the retinal structure resulting in blindness or even enucleation. Modern therapeutic approaches are aimed at introducing new antimicrobial agents, updating therapeutic algorithms and restoring affected structures (stem cell therapy).

Key words: contact lenses, ocular infectious diseases

**ВТОРО ЕВРОПЕЙСКО ПРЕВАЛЕНТНО
ПРОУЧВАНЕ НА ИНФЕКЦИИ, СВЪРЗАНИ
С МЕДИЦИНСКОТО ОБСЛУЖВАНЕ И
АНТИМИКРОБНА УПОТРЕБА В БОЛНИЦИ ЗА
АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ**

*Е. Добрева¹, Н. Владимирова¹, И. Н. Иванов¹, М. Недялков¹,
Р. Христова¹, В. Войнова-Георгиева², А. Христов¹*

1. Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ), София
2. Научно-Приложен Център по Военна Епидемиология и Хигиена (НПЦВЕХ), Военно Медицинска Академия (ВМА), София

През 2016–2017г. Европейският център по превенция и контрол на заболяванията (ECDC) организира “Второ превалентно проучване за инфекции, свързани с медицинското обслужване и антимикробна употреба в европейските болници за активно лечение (PPSII)”.

Цел: Представяне на организацията и провеждането на PPSII в България през 2017 г.

Материали/ Методи: За участие в PPSII бяха поканени 28 болници за активно лечение от страната. Участието на болниците бе на доброволен принцип. НЦЗПБ организира два обучителни курса за запознаване на участниците с методологията на проучването, което се проведе в периода 16 октомври-5 ноември, 2017 г. Едновременно се реализира и сляпо валидиращо проучване в подбрани болници. Основен координиращ и валидиращ център за проучванията беше НЦЗПБ като компетентна структура на ECDC в България. Приложени бяха последните версии на стандартния пациент- базиран протокол за първично проучване и съответния за валидиращо проучване. Данните се въвеждаха в софтуерен продукт HelicsWin. Net версия 2.3.5 и изпратиха на ECDC за статистическа обработка.

Резултати: В PPSII участваха 43% (12/28) от поканените болници за активно лечение. Първичното проучване обхвана 2200 пациента. След предварителния статистически анализ на ECDC беше установено, че честотата на разпространение на ИСМО е 3.5% като преобладават инфекциите на хирургичното място (28.2%). Установеният брой на пациентите с антимикробна терапия е 45%. При 37.6% от случаите е употребяван цефтриаксон. В седем подбрани болници се проведе и сляпо валидиращо проучване, което обхвана 391 пациента от 31 различни отделения.

Заклучение: Броят на участващите болници в първичното проучване е недостатъчен и не е представителен за страната, главно поради доброволния характер на участието. Установената заболяемост от ИСМО е ниска и е сравнима с тази от PPSI (2011–2012 г.) От друга страна, установеното ниво на антимикробна употреба е изключително високо и се оказва, че всеки втори пациент е на антибиотично лечение. Възникналите затруднения, в хода на първичното и валидиращото проучване, бяха предвидени и успешно преодолены.

Ключови думи: Инфекции, свързани с медицинското обслужване (ИСМО), антимикробна употреба; проучване

**THE SECOND EUROPEAN POINT
PREVALENT SURVEY OF HEALTHCARE-
ASSOCIATED INFECTIONS
AND ANTIMICROBIAL USE IN ACUTE CARE
HOSPITALS**

*E. Dobрева¹, N. Vladimirova¹, I. N. Ivanov¹, M. Nedyalkov¹,
R. Hristova¹, V. Voynova-Georgieva², A. Hristov¹*

1. National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Sofia
2. Science Center of Medical Epidemiology and Hygiene (SCMEH), Medical Military Academy (MMA), Sofia

During 2016–2017 the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) organized “The Second point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals (PPSII).”

Aim: Presentation of organisation and implementation of the PPSII in Bulgaria in 2017.

Materials/Methods: Twenty eight acute care hospitals were invited to participate in PPSII. Participation was on the voluntary basis. NCIPD conducted two training courses for intended participants in order to train them on the survey methodology. The survey was performed during 16 October-5 November, 2017 simultaneously with blinded data validation survey in selected hospitals. The main coordination and validation center was NCIPD as a competent structure of ECDC in Bulgaria. The latest versions of patient-based standard protocol and validation protocol respectively were applied. The survey data were uploaded in software product HelicsWin. Net v 2. 3.5 and submitted to ECDC for statistical processing.

Results: In PPSII participated 43% (12/28) of the invited acute care hospitals. The primary survey covered 2,200 patients. The preliminary ECDC analyses estimated 3.5% HAI prevalence with domination of surgical site infections (28.2%). The patients on antimicrobial therapy were 45%. In 37.6% of the cases was prescribed ceftriaxone. The blinded validation study was performed in seven selected hospitals and covered 391 patients from 31 different wards.

Conclusions: The number of hospitals in the primary study is insufficient and not representative for the country mainly due to the voluntary participation. The estimated HAI morbidity is low and comparable with results from PPSI (2011–2012). On the other hand the estimated level of antimicrobial use is exceptionally high and almost every second patient is on antibiotic treatment. Difficulties arisen in the primary and validation surveys were addressed and successfully overcome.

Keywords: Healthcare-associated infections (HAI); antimicrobial use; PPSII

ФЛУОРЕСЦЕНТНА *IN SITU* ХИБРИДИЗАЦИЯ (FISH) ЗА БЪРЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА МИКРООРГАНИЗМИ ОТ ХЕМОКУЛТУРИ

Ленгерова Г.¹, Рачковска З.³, Кирина В.^{1,3}, Христова Е.², Петров М.¹, Дерменджиев Т.^{1,3} Мурджева М.^{1,3}

1. Катедра Микробиология и Имунология, Фармацевтичен факултет, Медицински университет – Пловдив
2. Катедра Социална медицина и обществено здраве, Факултет по Обществено здраве, Медицински университет – Пловдив
3. Лаборатория по Микробиология, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

Цел: Да се установят диагностичните възможности на FISH метод за бърза идентификация на микроорганизми от хемокултури.

Материали и методи: QuickFISH BC е многоцветен, качествен тест за флуоресцентна *in situ* хибризация на нуклеинова киселина чрез специфични сонди за детекция на Грам-положителни (*S. aureus*, коагулаза-негативни стафилококи (*CNS*), *E. faecalis*, *E. faecium*); Грам-отрицателни бактерии (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) и гъбички (*C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. glabrata*). Методът беше приложен при 90 положителни хемокултури от пациенти, хоспитализирани в УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив, след селективна директна микроскопия по Грам. Микроорганизмите се идентифицираха чрез рутинни биохимични тестове, полуавтоматизирани и автоматизирани системи. Статистическата обработка на данните включваше дескриптивна статистика, непараметрични тестове за проверка на хипотезата, статистически пакет SPSS (версия 19) и Microsoft Excel.

Резултати: При 74 (83%) от хемокултурите FISH идентифицира микроорганизми, а при 16 (17%) не се установи флуоресценция. Липсата ѝ се дължи на факта, че не всички микроорганизми са включени в спектъра на теста – доказаха се обаче *Acinetobacter spp.* и *Enterobacter spp.* с други методи. При 5 (5,7%) от изследваните хемокултури се доказа *S. aureus*, при 38 (42,2%) – *CNS* (вероятен кожен контаминант), *E. faecalis* – при 8 (8,9%), а *E. faecium* – при 1 (1%). От Грам-отрицателните микроорганизми като най-чест патоген с FISH метода се определи *E. coli* – 8 броя (8,9%), а от гъбичките – *C. albicans* при 3 (3,3%).

Заклучение: QuickFISH BC е бърз и точен скриниращ метод за идентификация на едни от най-честите причинители на бактериемии. При липса на идентификация на патогена от положителни хемокултури чрез този метод, е наложително изследването да продължи с други методи.

Ключови думи: хемокултури, FISH, микроорганизми

FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION (FISH) FOR RAPID IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS IN BLOOD CULTURES

G. Lengerova¹, Z. Rachkovska², V. Kirina^{1,2}, E. Hristova³, MM. Petrov¹, T. Dermenzhiev^{1,2} M. Murdjeva^{1,2}

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

Aim: To establish the diagnostic abilities of a FISH method for rapid identification of microorganisms in blood cultures.

Material and Methods: QuickFISH BC is a multicolor, qualitative nucleic acid hybridization assay with specific probes intended for the identification of Gram-positive (*S. aureus*, *CNS*, *E. faecalis*, *E. faecium*); Gram-negative (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) bacteria and fungi (*C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. glabrata*). This method was applied on 90 positive blood-cultures obtained from patients admitted at the University hospital “St. George” – Plovdiv. A preliminary selection on the basis of Gram staining was performed before application of probes. All microorganisms were detected and identified by routine biochemical tests, semi-automated and automated systems as well. Statistical data processing included descriptive statistics, nonparametric analysis for testing hypotheses, SPSS 19.0 and Microsoft Excel software.

Results: FISH detected microorganisms in 74 (83%) blood cultures whereas in 16 (17%) no fluorescent was observed. This was due to the fact that not all microorganisms are included in the test but routine methods identified other bacteria as *Enterobacter spp.* and *Acinetobacter spp.*

S. aureus was found in 5 (5,7%), *CNS* – in 38 (42,2%) (possible contaminant), *E. faecalis* in 8 (8,9%) and *E. faecium* in 1 (1%) case. *E. coli* (8,9%) was the leading cause of bacteremia among Gram-negative bacteria whereas *C. albicans* was predominant (3,3%) among fungi.

Conclusion: QuickFISH BC is a quick and accurate screening method for identification of some of the most frequent pathogens causing bacteremia. The lack of pathogen identification from positive blood cultures using this method implies the need to continue testing with other methods.

Key words: blood cultures, FISH, microorganisms

ВЪЗМОЖНОСТИ НА MALDI-TOF ЗА БЪРЗА ИДЕНТИФИКАЦИЯ НА КЛИНИЧНО-ЗНАЧИМИМИКРООРГАНИЗМИ

З. Рачковска², Г. Ленгерова¹, В. Кирина^{1,2},
Е. Христова³, М. Петров¹, М. Мурджева^{1,2}

1. Катедра Микробиология и имунология, Фармацевтичен факултет, Медицински университет – Пловдив
2. Лаборатория по Микробиология при УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив
3. Катедра Социална медицина и обществено здраве, Факултет по Обществено здраве, Медицински университет – Пловдив

Цел: Сравнителен анализ на възможностите на MALDI-TOF за бърза идентификация на клинично-значими микроорганизми.

Методу: За тримесечен период, с MALDI-TOF (Vitek MS, Biomerieux, Франция) бяха изследвани общо 660 клинични изолата от пациенти на УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив. Получените резултати бяха сравнени с рутинни биохимични методи, полуавтоматизирани и автоматизирани системи за микробна идентификация.

Резултати: От сравняваните 660 изолата с най-голям дял се идентифицираха Грам-отрицателните – 250 (37,9 %), като 227 (34,4 %) от тях са представители на сем. *Enterobacteriaceae*. Следващи по честота са Грам-положителните – 176 (26,7 %) и Грам /–/ неферментативни бактерии – 128 (19,4 %). Изолирани са също гъбички в 63 (9,7 %), както и анаеробни бактерии при 8 (1,2%) случая. Резултатите от MALDI-TOF съвпадат в 94,84% с класическите методи за идентификация и с полуавтоматизираните и автоматизирани системи. При 10 (1,52 %) от случаите апаратът не успя да идентифицира изолата, а при 24 (3,64 %) имаше разминаване между сравняваните методи на рогово/ виво ниво.

От Грам-положителните бактерии в най-висок процент бяха идентифицирани *E. faecalis* – 35 (19,9%), *S. epidermidis* – 26 (14,8 %) и *S. aureus* – 22 (12,5%), а от Грам-отрицателните – *K. pneumoniae* – 65 (28,63%) и *E. coli* – 54 (23,79%). При Грам /–/ неферментативни най-чести патогени са *A. baumannii* – 63 (49,2%) и *P. aeruginosa* – 22 (17,2%), а от гъбичките – *C. albicans* – 22 (34,4%) и *C. glabrata* – 11 (17,2 %). Анаеробните микроорганизми бяха потвърдени в 100%. Установиха се и по-редки патогени като *A. radioresistens*, *B. subtilis*, *S. capitata*, *S. putrefaciens*, *L. adedecarboxylata*.

Заклучение: MALDI-TOF показва категорични предимства за идентификация на клинично-значими микроорганизми: съкращава времето за идентификация; работи с минимално количество от културата; има възможност за идентификация на над 2000 вида микроорганизма едновременно; улеснен работен процес с намаляване на мануалната работа на персонала и икономическа ефективност.

Ключови думи: MALDI-TOF, Vitek MS, методи за идентификация

MALDI-TOF FOR RAPID IDENTIFICATION OF CLINICALLY IMPORTANT MICROORGANISMS

Z. Rachkovska², G. Lengerova¹, V. Kirina^{1,2}, E. Hristova³, MM. Petrov¹, M. Murdjeva^{1,2}

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

Aim: Comparative analysis of MALDI-TOF ability for rapid identification of clinically important microorganisms.

Material and Methods: A total number of 660 isolates from patients at the University Hospital “St. George” – Plovdiv were identified for a period of three months with MALDI-TOF (Vitek MS, Biomerieux, France). The obtained results were compared with routine biochemical methods, semi-automated and automated systems for microbial identification.

Results: Gram-negative bacteria predominated among all 660 isolates – 250 (37,9%). Out of all, 227 (34,4 %) belonged to *Enterobacteriaceae*. Gram-positive microorganisms occupied the second place 176 (26,7 %) and Gram /–/ non-fermentative bacteria followed them – 128 (19,4 %). We also identified fungi – 63 (9,7%) and anaerobes – 8 (1,2 %).

A significant correspondance was observed between MALDI-TOF identification and the compared methods in 94,8 %. In 24 (1,52 %) cases no correspondance was found at genus and/or species level. MALDI-TOF failed to identify isolates in 10 (1,52%) of the samples.

The leading pathogen within Gram-positive bacteria was *E. faecalis* – 35 (19,9 %) followed by *S. epidermidis* – 26 (14,8 %) and *S. aureus* – 22 (12,5 %). Gram-negative bacteria *K. pneumoniae* – 65 (28,63 %) was found and *E. coli* – 54 (23,79%). The most common within the non-fermenters were *A. baumannii* – 63 (49,2 %) and *P. aeruginosa* – 22 (17,2 %), while *C. albicans* – 22 (34,4%) and *C. glabrata* – 11 (17,2 %) were identified as main fungal isolates. All anaerobes have been confirmed in 100 %. Rare bacteria as *A. radioresistens*, *B. subtilis*, *S. capitata*, *S. putrefaciens*, *L. adedecarboxylata* were detected as well.

Conclusion: This study confirmed that MALDI-TOF has a number of advantages for microbial identification: reduced time consumption for identification, small amount of samples required, ability to identify over 2000 species, reduced the workload and was cost-effective.

Key words: MALDI-TOF, Vitek MS, methods for identification

ВЛИЯНИЕ НА РЕЖИМА НА АНТИРЕТРОВИРУСНА ТЕРАПИЯ (АРТ) ВЪРХУ ИМУНОЛОГИЧНОТО ВЪЗСТАНОВЯВАНЕ НА HIV+ ЛИЦА С ТРАЙНА ВИРУСНА СУПРЕСИЯ

Р. Емилова¹, Я. Тодорова¹, Н. Янчева², И. Еленков², М. Стойчева³, П. Гарджева³, Т. Червенков⁴, С. Блажева⁵, Ц. Доичинова⁵, Л. Пекова⁶, И. Алексиев⁷, М. Николова¹

1. НРЛ по имунология, Национален център по заразни и паразитни болести, София
2. СБАЛИПБ «проф. Иван Киров», София
3. Инфекциозна клиника, УМБАЛ «Св. Георги», Пловдив
4. УМБАЛ «Св. Марина», Варна
5. УМБАЛ «г-р Г. Странски», Плевен
6. УМБАЛ проф. Д-р С. Киркович Ст. Загора
7. НРЛ по ХИВ, Национален център по заразни и паразитни болести, София

Увод. Основни критерии при побора на съвременните режими за АРТ са бързото постигане на вирусна супресия и добра поносимост в дългосрочен план. Влиянието върху параметрите на имунологично възстановяване е по-слабо изследвано. У нас АРТ се прилага съгласно актуалните европейските стандарти, като режимите, базирани на протеазен инхибитор (PI) са традиционно по-застъпени.

Цел. Да се сравни имунологичното възстановяване на HIV+ лица с трайна вирусна супресия на фона на непрекъсната АРТ с режим, базиран на: (А) интегразен инхибитор (INSTI), (В) нуклеозиден инхибитор на обратната транскриптаза (NNRTI), (С) PI от второ поколение (DRV), (D), PI от първо поколение (LPV), комбинирани с tenofovir/emtricitabine или abacavir/lamivudine.

Методу. В срезовия анализ са включени HIV+ лица (n=430), които през 2017 са били на непрекъсната АРТ и с трайна вирусна супресия (HIVVL < 40 копия/мл) най-малко две години. Възстановяването на абсолютния брой CD4 клетки (CD4AC) и индекса CD4/CD8 са сравнени в групите с различен АРТ режим (GraphPadPrism7.0).

Резултати. Разпределението по режими бе: А-16%; В-16%; С-43%, D-25%. Не се установиха значими разлики между подгрупите по: продължителност на АРТ, изходни стойности на CD4 и CD4/CD8, както и абсолютното им нарастване, отчетено през 2017 г. Скоростта на промяна на CD4AC, обаче, бе значително по-ниска в група D (LPV) спрямо група С (DRV) средно 5.8 vs 8.0 клетки/μl. За да се избегне възможен ефект на преходни режими при дълго лекуваните пациенти, анализирахме имунологичното възстановяване през периода 2015–2017 и установихме значимо забавено възстановяване на CD4/CD8 индекса в група D: средно 0.09 vs. 0.12, 0.13 и 0.14 (p=0.03), отразяващо персистиращо имунно възпаление. Сравнението на etravirine- и efavirenz-базираните режими в група В не показва значими разлики.

Изводи. Постигането на максимална ефективност от АРТ, особено при продължително лекувани пациенти, изисква своевременно преминаване към препоръчителните режими от ново поколение.

Ключови думи: HIV, АРТ, имунологично възстановяване

EFFECT OF CARTREGIMEN ON THE IMMUNE RECOVERY OF HIV+ PATIENTS WITH SUSTAINED VIRAL SUPPRESSION

R. Emilova¹, Y. Todorova¹, N. Yancheva², I. Elenkov², P. Gardjeva³, M. Stoycheva³, T. Chervenkov⁴, S. Blajeva⁵, C. Dojchinova⁵, L. Pekova⁶, I. Alexiev⁷, M. Nikolova¹

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. University Hospital St. George, Plovdiv
4. University Hospital St. Marina, Varna
5. University Hospital Dr. Ivan Stranski, Plevен
6. University Hospital Prof. Ivan Kirkovich, Stara Zagora
7. NRL of HIV, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

Introduction. The main choice criteria for the currently recommended cART regimens are the time for achieving viral suppression, and the long-term safety profile. The effects on the parameters of immune recovery are less well studied. In Bulgaria, cART is delivered according to the current European standards, the protein inhibitor PI-based regimens being traditionally most often prescribed.

Aim. To compare the immune recovery of HIV+ patients with sustained viral suppression in the settings of continuous cART with the following regimens: (A) integrase inhibitor (INSTI)-based, (B) non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)-based, (C) second generation PI-based (DRV), (D) first generation PI-based (LPV), in combination with emtricitabine/tenofovir or abacavir/lamivudine.

Methods. This cross-sectional study included HIV+ patients (n=430), that in 2017 had been on continuous cART and with sustained viral suppression (HIV VL < 40 c/ml) for at least 2y. The recovery of CD4 absolute count (CD4AC) and CD4/CD8 ratio were compared in groups A-D (GraphPadPrism 7.0).

Results. The distribution according to cART regimen was as follows: A -16%; B- 16%; C-43%, D-25%. Duration of cART, baseline CD4AC and CD4/CD8 values, as well as their absolute increase documented in 2017 did not differ significantly between the groups. However, the rate of CD4AC increase was significantly lower in group D (LPV) as compared to C (DRV): mean 5.8 vs 8.0 cells/μl. To avoid a possible bias due to formerly used regimens in long-term treated patients, immune recovery was reanalyzed for the period 2015 – 2017. A significantly slower recovery of CD4/CD8 ratio was established in group D as compared to A, B and C: mean 0.09 vs. 0.12, 0.13 и 0.14 (KW p=0.03), reflecting a more important residual immune activation. The comparison between etravirine- and efavirenz-based regimens in group B did not yield significant differences.

Conclusion. Timely application of last generation first-line regimens is indispensable for the maximal efficiency of cART, especially in long-term treated patients.

Key Words: HIV, cART, immune recovery

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА ИНФЕКЦИЯ С ПАРВОВИРУС В19 ПРИ БРЕМЕННА ЖЕНА С В-ТАЛАСЕМИЯ

С. Волева¹, Ст. Крумова¹, В. Манолов², Б. Маринов³,
В. Василев⁴, С. Шишков⁵, Л. Николаева-Гломб¹

1. Национален център по заразни и паразитни болести, Отдел Вирусология, София, България
2. Медицински Университет – София, Катедра по Клинична лаборатория и клинична имунология, София, България
3. СБАЛАГ „Майчин дом“, Обща акушерска клиника, София, България
4. УМБАЛ „Александровска“ Клинична лаборатория и клинична фармакология, София, България
5. СУ „Климент Охридски“, Биологически факултет, Катедра Вирусология, София България

Бременна жена на 30 години в 36 гестационна седмица, постъпва в СБАЛАГ „Майчин дом“ по повод предстоящо раждане. Пациентката е с диагностицирана в-таласемия. При направен лабораторен скрининг се установява анемичен синдром с Hb 98 g/L. Кръвната картина е с данни за лекостепенна микроцитна хипохромна анемия: RBC $5.15 \times 10^{12}/L$, HGB 98 g/L, MCV 65.8 fL, MCH 19.4 pg, MCHC 295 g/L. Ниво на серумно желязо 12.9 $\mu\text{mol}/L$, феритин 175 $\mu\text{g}/L$.

Жената е предвидена за родоразрешение със секцио. Два дни след хирургичната интервенция пациентката съобщава за обрив в областта на лицето, ръцете и гърдите. С оглед на възможно инфекциозно заболяване тя е изолирана и насочена за консултация с инфекционист. Спецификата на обрива насочва към инфекция с парвовирус В19.

Чрез три проследяващи серумни проби пациентката е изследвана серологично (В19V ELISA IgM/IgG) и молекулярно-биологично (PCR тест). И в трите анализирани проби се доказват специфични антитела клас IgM/IgG срещу вирус В19, както и наличие на вирусна ДНК, което потвърждава етиологичната роля на В19V в развитата се клинична манифестация.

Въпреки наличието на перинатална майчина инфекция с В19V, при новороденото липсват данни за такава, което се потвърждава от направените му серологични и молекулярно-вирусологични изследвания. Открити са само майчините антитела срещу вирус В19 от клас IgG.

Парвовирус В19 освен цитолитична притежава и апоптотична активност. Вирусът има способност да възпира клетъчния цикъл, което може да доведе до масово загиване на еритроидни прогениторни клетки и да отключи анемичен синдром. С оглед на съпътстващото заболяване на пациентката, а именно в-таласемия, острата вирусна инфекция би могла да предизвика апластична криза. Поради тази причина е назначена консултация с хематолог, който препоръчва определяне на нивото на серумния хепсидин – хормона, регулащ обмяната на желязо в организма. При инфекция възпалителните цитокини водят до повишения му синтез, който пък води до задържане на желязото в клетките. Установеното серумно ниво на хепсидин е 19.4 $\mu\text{g}/L$.

Перинаталната майчина инфекция с парвовирус В19 протече безвредно и възстановяване *ad integrum* без инфектиране и риск за новороденото.

Ключови думи: Парвовирус В19, бременост, в-таласемия, анемия, хепсидин

CLINICAL CASE OF PARVOVIRUS B19 INFECTION IN A PREGNANT WOMAN WITH B-THALASSEMIA

S. Voleva¹, St. Krumova¹, V. Manolov², B. Marinov³,
V. Vasilev⁴, S. Shishkov⁵, L. Nikolaeva-Glomb¹

1. National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), Department Virology, Sofia, Bulgaria
2. Medical University Sofia, Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, Sofia, Bulgaria
3. University Obstetrics and Gynecology Hospital “Maichin Dom”, Sofia, Bulgaria
4. UMBAL “Alexandrovska”, Clinical Laboratory and Clinical Pharmacology, Sofia, Bulgaria
5. “St. Kl. Ohridski Sofia University”, Laboratory of Virology, Faculty of Biology, Sofia, Bulgaria

A pregnant woman of 30 years of age in 36 weeks of gestation enters is hospitalized in The University Obstetrics and Gynecology Hospital Maichin Dom for a forthcoming birth. The patient is diagnosed with β -thalassemia. Laboratory screening revealed anemic syndrome with Hb 98 g/L. The blood is with data for mild hypochromic anemia: RBC $5.15 \times 10^{12}/L$, HGB 98 g/L, MCV 65.8 fL, MCH 19.4 pg, MCHC 295 g/L. Serum iron level is 12.9 $\mu\text{mol}/L$, ferritin 175 $\mu\text{g}/L$.

The woman is scheduled for cesarean section. Two days after the surgery, the patient reports a rash in the face, arms and chest area. In view of a possible infectious disease, she is isolated and targeted for consultation with an infectious diseases specialist. The rash specificity indicates a possible parvovirus B19 infection.

Three patient's serum samples were tested by serological (ELISA B19V IgM/IgG) and molecular biological (PCR test) methods. In all tested samples positive IgM/IgG and viral DNA results were found, which was confirming the etiological role of B19V in the clinical manifestation.

There is no data for perinatal B19V infection in the newborn, which is confirmed by the serological and molecular virological studies. Only maternal B19V IgG antibodies were detected.

Parvovirus B19 have cytolytic and apoptotic activity. The virus has the ability to inhibit the cell cycle, which can lead to mass destruction of erythroid progenitor cells and anemic syndrome. In view of the concomitant illness of the patient, namely β -thalassemia, acute viral infection could cause an aplastic crisis. For this reason, consultation with a hematologist is recommended. He recommends determining the level of serum hepcidin – the hormone regulating the iron metabolism in the body. In infection, inflammatory cytokines lead to increased synthesis, which leads to iron retention in cells. The hepcidin serum level was 19.4 $\mu\text{g}/L$.

Perinatal maternal infection with parvovirus B19 occurred without infection and risk for the newborn.

Keywords: Parvovirus B19, pregnancy, β -thalassemia, anemia, hepcitin

INTERNATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION
CONTROL CONSORTIUM (INICC):
ИНТЕРАКТИВНА ИНТЕРНЕТ-БАЗИРАНА МРЕЖА
ЗА ПРОУЧВАНЕ НА НОЗОКОМИАЛНИТЕ
ИНФЕКЦИИ ПРИ ПАЦИЕНТИ
НА ИНТЕНЗИВНО ЛЕЧЕНИЕ

М. Петров¹, Е. Христозова^{1,2}, З. Рачковска²,
К. Ангелова^{3,4}, А. Проданов^{3,4}, Ч. Стефанов^{3,4}, М. Мурджева^{1,2}

1. Катедра Микробиология и имунология, Фармацевтичен факултет, МУ – Пловдив
2. Лаборатория по Микробиология – УМБАЛ „Св. Георги“ - Пловдив
3. Катедра по анестезиология, спешна и интензивна медицина, Медицински факултет, МУ – Пловдив
4. Клиника по анестезиология и интензивно лечение, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

Цел: Да се проследи етиологичната структура и антибиотичната резистентност сред най-честите нозокомиални инфекции (НИ) при пациенти на интензивно лечение в УМБАЛ „Св. Георги“ - Пловдив и да се анализира влиянието им върху болничния престой и смъртността в Клиниката по анестезиология и интензивно лечение (КАИЛ).

Методу: International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) е международна научна организация, работеща чрез интерактивна интернет-базирана мрежа за мониториране и намаляване на НИ в структурите за интензивно лечение в болниците и асоциираните с тях смъртност, болничен престой, антибиотична резистентност и разходи за антибиотична консумация. За период от две години (2015 и 2016) са проучени 454 болни в КАИЛ на УМБАЛ „Св. Георги“ - Пловдив, от които повече от половината на възраст над 50г. Мъжете преобладават (61.45%). За всеки от болните в софтуерната програма на INICC е попълнен специален болничен лист с дните на престой, инвазивните процедури, НИ с доказан причинител и антибиотична чувствителност.

Резултати: Водещите НИ в КАИЛ са пневмониите (49%), следвани от сепсисите (39%) и уроинфекциите (12%). Доказват се предимно Грам-отрицателни бактерии: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Klebsiella*, както и гъбичките от род *Candida* (основно при уроинфекциите). *Klebsiella spp.* са със запазена чувствителност към аминогликозиди, хинолони и карбапенеми, а ESBL-продуциращите *K. pneumoniae* са 77%. Резистентността при *P. aeruginosa* варира в широки граници за различните антибиотици (над 65% към цефалоспорици, 35% към карбапенеми и 5% към колистин), докато при *A. baumannii* е около и над 90% за почти всички антибиотици, с изключение на колистин (0%). Болничният престой е между два и три пъти по-дълъг за пациентите с НИ, като смъртността при тях е близо двойно по-голяма.

Заклучение: INICC определя важни параметри, свързани с надзора на НИ и може да бъде полезна за проследяването им при пациенти на интензивно лечение и подобряването на инфекциозния контрол в болниците.

Ключови думи: нозокомиални инфекции, антибиотична резистентност, INICC

INTERNATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION
CONTROL CONSORTIUM (INICC):
AN INTERACTIVE WEB-BASED NETWORK
FOR SURVEILLANCE OF NOSOCOMIAL
INFECTIONS IN INTENSIVE CARE PATIENTS

MM. Petrov¹, E. Hristozova^{1,2}, Z. Rachkovska²,
K. Angelova^{3,4}, A. Prodanov^{3,4}, C. Stefanov^{3,4}, M. Murdjeva^{1,2}

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 Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Medical University – Plovdiv, Bulgaria
4. Intensive Care Unit, St. George University Hospital, Plovdiv, Bulgaria

Aim: To study the etiological structure and antimicrobial resistance of most common healthcare-associated infections (HAIs) among intensive care patients at “St. George” University Hospital – Plovdiv and to analyze their impact on the length of hospital stay and attributable mortality in the Intensive Care Unit (ICU).

Methods: International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) is an international organization, working through internet-based network and aiming at monitoring and reducing HAI rates in ICUs and their attributable mortality, bacterial resistance, length of hospital stay, and extra cost. During the two-year period (2015 & 2016) 454 ICU patients were surveyed in „St. George“ University Hospital. More than half of them were over 50 years of age and male patients were predominant (61.45%). For every patient a special medical chart was filled up, containing information about days of hospital stay, invasive procedures, confirmed HAIs with the respective etiological agents and their antimicrobial susceptibility.

Results: The leading HAIs in our ICU were pneumonias (49%), followed by blood-stream infections (39%) and urinary-tract infections (12%). Gram-negative bacteria were predominant: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* & *Klebsiella*, as well as yeasts belonging to *Candida spp.* (mainly among UTIs). *Klebsiella spp.* were with retained susceptibility to aminoglycosides, quinolones and carbapenems, and ESBL-producing *K. pneumoniae* were 77%. Antimicrobial resistance among *P. aeruginosa* strains varied widely for different antibiotic groups (over 65% to cephalosporins, 35% to carbapenems and 5% to colistin), while among *A. baumannii* strains resistance was around and over 90% for all antimicrobials except colistin (0%). The length of hospital stay was two to three folds longer among patients with HAIs and the mortality rate was nearly two times higher.

Conclusion: INICC project identifies and determines important parameters related to HAI-surveillance and can be useful for their tracking in intensive care patients and for improvements in hospital infectious control.

Keywords: nosocomial infections, antimicrobial resistance, INICC

