

## **Резюмета на научни трудове**

**на Д-р Живка Стойкова Демирева-Калчева, дм**

**(на английски и български език)**

## **Резюмета на научни трудове към точка В4 от академичната справка:**

**1. Kostadinova Ts, L Ivanova, Zh Stoykova, T Todorova, L Gercheva, D Staykov, D Tsaneva. Investigation of immunosuppressed patients for the presence of EBV DNA in Real Time PCR. Journal of IMAV. 2018 Jul-Sep;24(3): 2129-2132.**

Epstein-Barr virus (EBV) reactivates during immunosuppression (IS) and immune deficiency. The introduction of stem cell transplantation and the development of transplantology require compliance with criteria for assessing the risk of reactivation of latent viral infections, including EBV. There are no published EBV-DNA findings in Bulgaria for such patient groups. The aim in this study is to assess the possible benefit of EBV PCR testing in immunosuppressed individuals. We investigated 50 immunosuppressed patients – 28 with various haematological diseases, 17 after kidney transplantation and 5 patients with autologous stem cell transplantation (HSCT). Patients were first tested in an indirect ELISA to detect anti-VCA IgM/IgG (Euroimmun, Luebeck, Germany) and then in quantitative PCR (Sacace Biotechnologies S.r.l., Como, Italy). We found EBV DNA in 14.0% (95% CI:5.8% - 26.7%, n=7) of all tested patients. The Real time PCR results were in the range 100-500 copies/ml. The highest was the proportion of patients with haematological diseases (21.4%), predominantly with AML. We found a relatively small proportion of IS patients with detectable EBV DNA. For HSC-transplanted patients, we anticipate probable reactivation or reinfection in one patient, who was anti-VCA IgG positive in the primary study.

Вирусът на Epstein-Barr се реактивира по време на имуносупресия и имунен дефицит. Трансплантацията на стволови клетки, с развитието на трансплантологията, изисква спазване на определени критерии за оценка на риска от реактивиране на латентни вирусни инфекции, включително EBV. В България няма публикувани PCR резултати за EBV при

такива групи пациенти. Целта на това проучване е да се оцени възможната полза от EBV-PCR тестване при имуносупресирани индивиди. Изследвахме 50 имуносупресирани пациенти – 28 с различни хематологични заболявания, 17 след бъбречна трансплантация и 5 пациенти след автоложна трансплантация на стволови клетки. Пациентите първо бяха тествани с индиректна ELISA за откриване на анти-VCA IgM/IgG (Euroimmun, Luebeck, Германия) и след това с количествен PCR (Sacace Biotechnologies S.r.l., Комо, Италия). Открихме EBV ДНК при 14% (95% CI:5.8% - 26.7%, n=7) от всички изследвани пациенти. Резултатите от PCR в реално време бяха в диапазона 100-500 копия/ml. Най-висок беше дялът на пациентите с хематологични заболявания (21,4%), предимно с ОМЛ. Сравнително малък дял от пациентите с имуносупресия бяха с откриваема EBV ДНК. За пациентите след трансплантация на стволови клетки очаквахме вероятна реактивация при един пациент, който е бил анти-VCA IgG положителен в първичното проучване.

**2. Kostadinova Ts, L Ivanova, I Hristov, T Todorova, Zh Stoykova, D Tsaneva. The role of anti-EBNA1 IgG Determination in EBV diagnostics. Journal of IMAB. 2018 Jul-Sep;24(3): 2181-2185.**

In Bulgaria, the diagnosis of Epstein-Barr virus (EBV) infection is performed via ELISA testing of IgM and IgG against viral capsid antigen (anti-VCA IgM and anti-VCA IgG). With the current study, we try to answer is there any benefit of determination of IgG against the nuclear antigen of EBV (anti-EBNA-1 IgG) in the laboratory practice. The prospective study included 82 serum/plasma samples tested for anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA1 IgG and anti-VCA IgG avidity in ELISA (Euroimmun, Luebeck, Germany). Quantitative variables were reported as mean, and standard deviation (mean±SD) and the qualitative variables were reported as a number and a relative proportion (%). Anti-EBNA1 IgG positive patients were 74.4% (95% CI:63.6% - 83.4%) of all tested individuals. Their mean age was significantly higher (30.5; SD±20.5) of this of patients without anti-EBNA1 IgG (14.5; SD±14.1) ( $p < 0.05$ ). The first group of patients (with infectious mononucleosis, anti-VCA Ig M negative) had the highest number of anti-EBNA1 IgG negative results. Negative for anti-EBNA 1 IgG were 12% of patients with Hodgkin's lymphoma. Determination of anti-EBNA1 IgG together with anti-VCA should be considered in the initial serological testing in EBV diagnostics. As different immune responses against the EBNA1 antigen exist, clinicians should interpret the results carefully with regard to the clinical symptoms, the

immune status and the laboratory markers. We found anti-EBNA1 IgG ELISA tests exceptionally useful to distinguish primary and past infections in anti-VCA IgM(+)/anti-VCA IgG (+) patients.

В България диагностицирането на инфекция с вируса на Epstein-Barr се извършва масово чрез ELISA изследване за IgM и IgG срещу вирусен капсиден антиген (anti-VCA IgM и anti-VCA IgG). С настоящото изследване се опитваме да отговорим на въпроса до колко е полезно определянето на IgG срещу ядрения антиген на EBV (anti-EBNA-1 IgG) в лабораторната практика. Проспективното проучване включва 82 серумни/плазмени проби, тествани за авидитет на анти-VCA IgM, анти-VCA IgG, анти-EBNA1 IgG и анти-VCA IgG в ELISA (Euroimmun, Luebeck, Германия). Количествените променливи бяха отчетени като средна стойност, стандартното отклонение (SD) и качествените променливи бяха отчетени като число и относителна пропорция (%). Анти-EBNA1 IgG положителни пациенти бяха 74,4% (95% CI:63,6% - 83,4%) от всички изследвани лица. Тяхната средна възраст е значително по-висока (30,5; SD±20,5) от тази на пациенти без анти-EBNA1 IgG (14,5; SD±14,1) (p <0,05). Първата група пациенти (с инфекциозна мононуклеоза, анти-VCA IgM отрицателен) имат най-голям дял анти-EBNA1 IgG отрицателни резултати. Отрицателни за anti-EBNA 1 IgG са 12% от пациентите с лимфом на Ходжкин. Определянето на анти-EBNA1 IgG заедно с анти-VCA трябва да се има предвид при първоначалното серологично изследване при диагностика на EBV. Тъй като съществуват различни имунни отговори срещу антигена EBNA1, клиницистите трябва внимателно да интерпретират резултатите по отношение на клиничните симптоми, имунния статус и лабораторните маркери. Установихме, че анти-EBNA1 IgG ELISA тестовете са изключително полезни за разграничаване на първични от минали инфекции при анти-VCA IgM (+)/анти-VCA IgG (+) пациенти.

**3. Kostadinova Ts, L Ivanova, M Bozhkova, D Tsaneva, T Todorova, Zh Stoykova. Use of immunoblot IgM in patients with serological and clinical evidence of primary EBV infection and reactivation. Journal of IMAB. 2018 Jul-Sep;24(3): 2186-2189.**

Anti-VCA IgM is a marker for establishing primary infection with Epstein-Barr Virus (EBV), it usually appears in combination with anti-VCA IgG. It has been shown that there is a risk of non-specific IgM reactivity due to cross-reactions, interference with rheumatoid factor or

autoantibodies. These antibodies may also occur during reactivation. In these cases, immunoblot based tests may be useful to confirm the ELISA result. We compared the results of anti-VCA IgM in ELISA and Immunoblot IgM in patients with evidence of primary EBV infection (infectious mononucleosis, IM) and/or reactivation/reinfection. We examined 32 serum samples with commercial immunoblot (Euroline Anti-EBV Profile 2 (IgM), Euroimmun, Germany). Samples were tested primarily for anti-VCA IgM/IgG in ELISA. Patients with IM were 11, and those with probable reactivation/reinfection - 21. We found positive results at 31.3% (95% CI: 16.1% -50.0%, n = 10) of all subjects. Patients with IM and isolated anti-VCA IgM in ELISA (81.8%) were negative in Immunoblot IgM. Positive in Immunoblot IgM was 38.1% (n = 8) of the patients with suspected reactivation. We confirmed a primary infection in three of them due to the low avidity of anti-VCA IgG and missing anti-EBNA1 IgG. In five of the patients, the presence of anti-VCA IgM may be interpreted as reactivation/reinfection. Patients with IM and isolated anti-VCA IgM models in ELISA were not confirmed in the Immunoblot test. Approximately 43% of patients of possible reactivation was also negative in the test.

Anti-VCA IgM е маркер за установяване на първична инфекция с Epstein-Barr Virus (EBV), обикновено се появява в комбинация с anti-VCA IgG. Доказано е, че съществува риск от неспецифична IgM реактивност поради кръстосани реакции, взаимодействие с ревматоиден фактор или автоантитела. Тези антитела (IgM) могат да се появят и по време на реактивиране. В тези случаи тестовете, базирани на имуноблот, могат да бъдат полезни за потвърждаване на резултата от ELISA. Ние сравнихме резултатите от анти-VCA IgM в ELISA и Immunoblot IgM при пациенти с данни за първична EBV инфекция (инфекциозна мононуклеоза, ИМ) и/или реактивиране/реинфекция. Изследвахме 32 серумни проби с търговски имуноблот тест (Euroline Anti-EBV Profile 2 (IgM), Euroimmun, Германия), които бяха тествани първоначално за анти-VCA IgM/IgG в ELISA. Пациентите с ИМ са 11, а тези с вероятна реактивация/реинфекция - 21. Установихме положителни резултати при 31,3% (95% CI: 16,1% -50,0%, n = 10) от пробите. Пациентите с ИМ и изолиран анти-VCA IgM + в ELISA (81,8%) бяха отрицателни в Immunoblot IgM. Положителни в Immunoblot IgM са 38,1% (n = 8) от пациентите със съмнение за реактивиране. Ние потвърдихме първична инфекция при трима от тях поради ниския авидитет на анти-VCA IgG и липсващ анти-EBNA1 IgG. При пет от пациентите наличието на анти-VCA IgM може да се тълкува като реактивиране/реинфекция. Пациенти с диагноза ИМ и изолирани анти-VCA IgM модели в

ELISA не бяха потвърдени в имуноблот теста. Приблизително 43% от пациентите с възможна реактивация също бяха отрицателни в имуноблот теста.

**4. Tsaneva-Damyanova D, Golkocheva-Markova E, Ivanova L, Kostadinova Ts, Stoykova Zh. Occult hepatitis B virus infection among patients with liver dysfunction in Varna, Bulgaria. Journal of IMAV. 2018 Oct-Dec;24(4): 2196-2200.**

Occult hepatitis B infection (OBI) is a challenge in virology and a clinically relevant topic. The present study assessed the presence of HBV-DNA in serum samples of HBsAg negative, patients with data of liver dysfunction, positive for anti- HBc total Ab with or without anti-Hbs Ab.

The goal of this study was to evaluate the prevalence of occult hepatitis B in Varna region, among patients with chronic liver dysfunction. The investigation was conducted among 79 people, predominantly patients at Gastroenterology Clinic in “St. Marina” University Hospital, Varna, Bulgaria. Quantitative determination of HBV DNA was performed in the National Reference Laboratory for Hepatitis viruses at the National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria. From 79 investigated patients with liver dysfunction 16 (20.25%), were considered as occult HBV carriers. Fourteen of them (17.72%) were positive for HBV DNA with very low values, below 200 IU/ml. Two of the cases (2.53%) were with serum levels comparable to those usually detected in the different phases of serologically evident (overt) infection and are considered as “false” OBI. Our data showed that OBI is more widespread than expected and can be identified as a significant risk factor for the presence of more severe liver damages and an important oncogenic factor for developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Окултната хепатит В инфекция е предизвикателство във вирусологията и клинично значима тема. Настоящото проучване оценява наличието на HBV-DNA в серумни проби на HBsAg отрицателни, пациенти с данни за чернодробна дисфункция, положителни за анти-HBc total Ab със или без анти-Hbs Ab. Целта на това проучване е да се оцени разпространението на окултен хепатит В във Варненска област при пациенти с хронична чернодробна дисфункция. Изследването е проведено сред 79 души, предимно пациенти в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ „Св. Марина“ Варна, България. Количественото определяне на HBV-ДНК е извършено в Националната референтна лаборатория по хепатитни вируси към Националния център по заразни и паразитни болести, София, България. От 79

изследвани пациенти с чернодробна дисфункция 16 (20,25%), се считат за окултни носители на HBV. Четиринадесет от тях (17,72%) са положителни за HBV-ДНК с много ниски стойности, под 200 IU/ml. Два от случаите (2,53%) са със серумни нива, сравними с тези, които обикновено се откриват в различните фази на серологично очевидна (явна) инфекция и се считат за „фалшиви“ окултни В хепатити. Нашите данни показват, че окултната хепатит В инфекция е по-разпространено от очакваното и може да бъде идентифицирана като значителен рисков фактор за наличието на по-тежки чернодробни увреждания и важен онкогенен фактор за развитие на цироза и хепатоцелуларен карцином.

**5. Kostadinova Ts, Ivanova L, Todorova T, Stoykova Zh, Tsaneva D, Tsankova G. Role of anti-EA-(D) IgM and anti-EA-(D) IgG tests in patients with primary EBV infection, lymphomas and immunosuppression. J of IMAB. 2018 Oct-Dec;24(4):2267-2271.**

The EA (early antigen) is expressed during the lytic phase of the EBV life cycle, together with VCA (viral capsid antigen) and MA (membrane antigen). Antibodies to EA (D) IgG occur in the course of primary infection, but not in all patients. The titers increase in the first 3-4 weeks and usually last about 3-4 months. Their presence is also associated with reactivation of the infection due to impaired immune control of the viral replication. The aim of this study was to compare the primary immune response against the major antigens (VCA) and EA (D) in patients with clinically proven primary infection and to define the antibody response to the EA (D) antigen as a marker for reactivation in patients at risk. We examined 86 persons with lymphomas, incl. Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma, immunosuppressed patients, mainly with AML (acute myeloid leukemia) and primary infection (infectious mononucleosis, IM) patients. We used an indirect ELISA for anti-EA (D) IgM/IgG and anti-VCA IgM/IgG (Euroimmun, Germany). Patients with anti-EA(D) IgM were 29.1% (95% CI:19.8% - 39.9%, n=25) while patients with anti-EA(D) IgG were 23.3% (95% CI:14.8%-33.6%, n=20) ( $p>0.05$ ). As expected, younger individuals with IM diagnosis predominated among the positive patients. We found isolated anti-EA(D) IgM in four persons (with lymphoma and immunosuppression) and isolated anti-EA(D) IgG in five patients. The routine diagnostic tests used to detect antibodies to VCA have a much better diagnostic value in defining a primary infection. Use of antibodies against EA (D) in case of isolated anti-VCA IgM and anti-VCA IgG needs further evaluation. Use of anti-EA (D) IgG as a reactivation marker should be compared with Real-time PCR results.

EA (ранен антиген) се експресира по време на литичната фаза на жизнения цикъл на EBV, заедно с VCA (вирусен капсиден антиген) и MA (мембранен антиген). Антителата срещу EA (D) IgG се появяват в хода на първичната инфекция, но не при всички пациенти. Титрите се увеличават през първите 3-4 седмици и обикновено траят около 3-4 месеца. Тяхното присъствие също е свързано с реактивиране на инфекцията поради нарушен имуен контрол на вирусната репликация. Целта на това проучване е да се сравни първичният имуен отговор срещу основните антигени (VCA) и EA (D) при пациенти с клинично доказана първична инфекция и да се дефинира отговорът на антителата към EA (D) антигена като маркер за реактивиране в пациенти в риск. Тествахме серумни проби от 86 пациента с лимфоми, в т.ч. Лимфом на Ходжкин и неходжкинов лимфом, пациенти с имуносупресия, главно с ОМЛ (остра миелоидна левкемия) и пациенти с първична инфекция (инфекциозна мононуклеоза, ИМ). Използвахме индиректна ELISA за анти-EA (D) IgM/IgG и анти-VCA IgM/IgG (Euroimmun, Германия). Пациентите с анти-EA(D) IgM бяха 29,1% (95% CI:19,8% - 39,9%, n=25), докато пациентите с анти-EA(D) IgG бяха 23,3% (95% CI:14,8%-33,6%, n=20) ( $p>0,05$ ). Както се очакваше, по-младите пациенти с диагноза ИМ преобладават сред положителните пациенти. Открихме изолирани анти-EA(D) IgM+ при четирима (с лимфом и имуносупресия) и изолирани анти-EA(D) IgG+ при петима пациенти. Рутинните диагностични тестове, използвани за откриване на антитела срещу VCA, имат много по-добра диагностична стойност при определяне на първична инфекция. Използването на антитела срещу EA (D) в случай на изолирани анти-VCA IgM и анти-VCA IgG се нуждае от допълнителна оценка. Използването на анти-EA (D) IgG, като маркер за реактивиране, трябва да се сравни с резултатите от PCR в реално време.

**6. Kostadinova Ts, Ivanova L, Stoykova Zh, Todorova T, Tsaneva D. Analysis of infectious mononucleosis clinical cases in Varna region (2010-2016). J of IMAV. 2019 Jan-Mar;25(1):2332-2336.**

Infectious mononucleosis (IM) is an acute and self-limiting lymphoproliferative disease, and according to literature data in 90% of cases is associated with primary Epstein-Barr (EBV) viral infection. However, the mononucleosis-like syndrome is also caused by a number of other pathogens such as HHV-6, CMV, HIV, adenoviruses, etc., which makes the laboratory diagnosis necessary to identify the etiology of the disease. We compared clinical with serological IM data

and defined serological profiles requiring further laboratory investigation. We investigated 746 patients with clinical symptoms for IM who had been tested in a virological laboratory at the „St. Marina” University Hospital in the period 2010-2016, 57.6% (95% CI: 54.0% -61.2%, n = 430) were men. The average age of the subjects was 9.56 years (SD  $\pm$  8.26), lower in the boys. We used an indirect ELISA to detect anti-VCA IgM/IgG (Euroimmun, Germany). The serological markers used in our laboratories (anti-VCA IgM/IgG) in combination with symptoms and other laboratory results are in most cases sufficient to confirm primary EBV infection, but there are cases where additional studies are needed to accurately determine the stage of the infection. Serological profiles requiring ongoing studies are the isolated anti-VCA IgM and anti-VCA IgG models.

Инфекциозната мононуклеоза (ИМ) е остро и самоограничаващо се лимфопролиферативно заболяване, като по литературни данни в 90% от случаите се свързва с първична Epstein-Barr (EBV) вирусна инфекция. Синдромът, подобен на мононуклеоза, обаче се причинява и от редица други патогени като HHV-6, CMV, HIV, аденовируси и др., което прави лабораторната диагностика необходима за идентифициране на етиологията на заболяването. Ние сравнихме клиничните със серологичните ИМ данни и дефинирахме серологични профили, налагащи допълнителни лабораторни изследвания. Ретроспективното проучване включва 746 пациенти с клинични симптоми за ИМ, изследвани във вирусологична лаборатория на УМБАЛ „Св. Марина“ Варна в периода 2010-2016 г. От тях 57,6% (95% CI: 54,0% -61,2%, n = 430) бяха мъже. Средната възраст на субектите е 9,56 години (SD  $\pm$  8,26), по-ниска при момчетата. Използвана е индиректна ELISA за откриване на анти-VCA IgM/IgG (Euroimmun, Германия). Тези серологични маркери, в комбинация с клинични симптоми и други лабораторни резултати в повечето случаи са достатъчни за потвърждаване на първичната EBV инфекция, но има случаи, при които са необходими допълнителни изследвания за точно определяне на стадия на инфекцията. Серологичните профили, изискващи текущи изследвания, са изолираните анти-VCA IgM+ / анти-VCA IgG+ модели.

**7. Kostadinova Ts, Ivanova L, Tsaneva D, Ermenlieva N, Stoykova Zh, Tsankova G. Distribution of Epstein - Barr virus among women of reproductive age and children up to 1 year in the Varna region. J of IMAV. 2019 Jan-Mar;25(1): 2369-2371.**



The Epstein-Barr virus (EBV) is widespread in the human population and is the major cause of infectious mononucleosis. Also, the virus is associated with the development of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas and nasopharyngeal carcinoma. The evidence of its role in neonatal pathology is contradictory and not well known. The aim of this study is to evaluate the EBV serostatus of women of reproductive age in the Varna region (2010-2016) to determine the risk of intrauterine and early postnatal EBV infection. We analyzed the results of a total of 1126 women of reproductive age and 360 children up to 1 year tested for anti-VCA IgM (viral capsid antigen) and anti-VCA IgG. An indirect ELISA of Euroimmun – Germany was used. The proportion of positive anti-VCA IgG women in the reproductive age (76.8%; 95% CI: 74.2 %-79.3%) correlates with that of children up to 6 months - 68.0% (95% CI: 62.1% -73.6%), Pearson's = 8.395,  $p = 0.004$ . We found high anti-VCA IgG seropositivity among women of reproductive age, which reduces the risk of infection during pregnancy and intrauterine infection of the fetus, respectively. The presence of seronegative women (around 6.0%) and of women with serological evidence of primary infection or reactivation (17%) assumes a group of babies at risk of early infection. Despite the little evidence of virus involvement in neonatal pathology, contamination should be considered and sought after excluding the most common infectious agents.

Вирусът на Epstein-Barr (EBV) е широко разпространен в човешката популация и е водеща причина за инфекциозна мононуклеоза. Също така, вирусът се свързва с развитието на лимфоми на Ходжкин и неходжкинови лимфоми и назофарингеален карцином. Доказателствата за неговата роля в неонаталната патология са противоречиви и не са добре известни. Целта на настоящото проучване е да се оцени EBV серостатусът на жени в репродуктивна възраст във Варна (2010-2016 г.) за определяне на риска от вътрематочна и ранна постнатална EBV инфекция. Анализирахме резултатите на общо 1126 жени в репродуктивна възраст и 360 деца до 1 година, изследвани за вирусен капсиден антиген - анти-VCA IgM и анти-VCA IgG. Използвана е индиректна ELISA на Euroimmun, Германия. Делът на положителните анти-VCA IgG жени в репродуктивна възраст (76,8%; 95% CI: 74,2 %-79,3%) корелира с този на децата до 6 месеца - 68,0% (95% CI: 62,1% -73,6%), Pearson's = 8.395,  $p = 0.004$ . Установихме висока анти-VCA IgG серопозитивност сред жени в репродуктивна възраст, което намалява риска от първична инфекция по време на бременност и съответно вероятна вътрематочна инфекция на плода. Наличието на

серонегативни жени (около 6,0%) и жени със серологични данни за първична инфекция или реактивиране (17%) предполага, че не малка част от бебета са изложени на риск от инфекция. Въпреки малкото доказателства за участието на вируса в неонаталната патология, трябва да се има предвид и да се търси заразяване, като се изключат най-честите инфекциозни агенти.

**8. Zhivka Stoykova. Serological CMV Screening in women of reproductive age and in pregnant women. J of IMAB. 2019 Oct-Dec; 25(4): 2755-2758. <https://doi.org/10.5272/jimab.2019254.2755>.**

Prenatal cytomegalovirus (CMV) screening is not routinely conducted in Bulgaria. According to our previous data, CMV infection is widespread in our region with a total seroprevalence of 78.4%. Such high seroprevalence may have profound effect over the incidence of congenital CMV (cCMV) infections. We aimed in determination of the serological CMV status of both women in reproductive age and pregnant women.

Retrospective study: 1612 women in childbearing age (15-49 y)

Prospective study: 121 pregnant women (14-41 y)

We used ELISA tests for detection of anti-CMV IgM/IgG and for avidity determination of anti-CMV IgG, EUROIMMUN, Germany.

From a total of 1612 women in childbearing age, 1362 (84.5%, 95% CI: 82.73 - 86.27) were anti-CMV IgG positive.

From a total of 121 pregnant women, 105 (86.8%, 95% CI: 80.77 - 92.83) were anti CMV IgG positive and 12 (9.9%, 95% CI: 4.58 - 15.22%) were anti CMV IgM positive. We got a high IgG avidity index in all seropositive pregnant women, including those with IgM positive results.

CMV infection is highly prevalent in women in reproductive age in Bulgaria and the estimated hypothetical population transmission risk in our region is a total of 7% (considering 40% transmission risk in primary infection during pregnancy and 1% transmission risk in immune pregnant women).

We compared the preliminary retrospective data with the data obtained from a real situation of 121 pregnancies and got very similar results. Since almost 10% of the pregnant women had evidence of acute or recent infection, this required us to perform the anti-CMV IgG avidity test. We got a high IgG avidity index in all pregnant women.

Пренатален скрининг за цитомегаловирус (CMV) не се провежда рутинно в България. Според предишни данни CMV инфекцията е широко разпространена в нашия регион с обща сероразпространеност от 78,4%. Такова високо разпространение може да има дълбок ефект върху честотата на вродените CMV (сCMV) инфекции. Имахме за цел да определим серологичния CMV статус както на жени в репродуктивна възраст, така и на бременни жени. Ретроспекция: 1612 жени в детеродна възраст (15-49 години) Проспективно: 121 бременни жени (14-41 г.). Използвахме ELISA тестове за откриване на анти-CMV IgM/IgG и за определяне на авидитет на анти-CMV IgG, EUROIMMUN, Германия. От общо 1612 жени в детеродна възраст, 1362 (84,5%, 95% CI: 82,73 - 86,27) са анти-CMV IgG положителни. От общо 121 бременни жени 105 (86,8%, 95% CI: 80,77 - 92,83) са били анти-CMV IgG положителни, а 12 (9,9%, 95% ДИ: 4,58 - 15,22%) са анти-CMV IgM положителни. Получихме висок индекс на IgG авидитет при всички серопозитивни бременни жени, включително тези с IgM положителни резултати. CMV инфекцията е силно разпространена сред жените в репродуктивна възраст в България и прогнозният популационен хипотетичен риск от вътреутробно предаване в нашия регион е общо 7% (като се взема предвид 40% риск от предаване при първична инфекция по време на бременност и 1% риск от предаване при имунни бременни жени). Сравнихме тези предварителни ретроспективни данни с данните, получени от реална ситуация на 121 бременности в проспективно проучване и получихме много сходни резултати. Тъй като почти 10% от бременните жени имаха серологични данни за остра или скорошна инфекция, това наложи да направим допълнително тест за анти-CMV IgG авидитет. Установихме обаче висок индекс на IgG авидитет при всички CMV инфектирани бременни жени.

**9. Zhivka Stoykova, Tsvetelina Kostadinova, Radka Argirova. Varicella zoster virus associated aseptic meningitis in an immunocompetent patient. J of IMAB. 2020 Apr-Jun; 26(2): 3053-3056. <https://doi.org/10.5272/jimab.2020262.3053>.**

Varicella zoster virus (VZV) is a widespread herpes virus that causes chickenpox after primary infection. Later the virus remains persistent in the sensory nerve ganglia, and it can be reactivated with the manifestation of herpes zoster most often. But reactivation of VZV can manifest as infection of the CNS (central nervous system) even in an immunocompetent host. The detection of VZV Ab by ELISA and VZV-DNA in cerebrospinal fluid by PCR has improved the laboratory

conformation of that condition in an immunocompetent host with discreet exanthema. Two serum samples and three CSF samples of a patient with aseptic meningitis were tested by ELISA and PCR. This clinical case demonstrates that VZV may be considered in all cases of aseptic meningitis even in immunocompetent individuals without the typical rash. In cases under VZV associated meningitis suspicion, the first detection marker to be positive is VZV-DNA and later anti-VZV IgG in CSF.

Вирусът на варицела зостер (VZV) е широко разпространен херпесен вирус, който причинява варицела при първична инфекция. По-късно вирусът остава персистентен в сетивните нервни ганглии и може да се реактивира най-често с проява на херпес зостер клинично. Но повторното активиране на VZV може да се прояви като инфекция на ЦНС (централната нервна система) дори при имунокомпетентен гостоприемник. В описания от нас клиничен случай, откриването на VZV Ab (ELISA) и на VZV-ДНК (PCR) в цереброспиналната течност е лабораторно потвърждение на това състояние при имунокомпетентен гостоприемник с дискретен обрив. Две серумни проби и три ликворни проби на пациент с асептичен менингит бяха тествани в ELISA и PCR. Този клиничен случай доказва, че VZV етиология, трябва да се има предвид при всички случаи на асептичен менингит дори при имунокомпетентни индивиди без типичния весикулозен обрив. В случаи със съмнение за VZV асоцииран менингит, първият положителен маркер е откриване на VZV-ДНК и по-късно анти-VZV IgG в ликвор.

**10. Tsvetelina Kostadinova, Zhivka Stoykova, Tatina Todorova, Denis Niyazi, Milena Bozhkova, Svetomira Bizheva & Temenuga Stoeva (2021) SARS-CoV-2 distribution in North-East Bulgaria. J of IMAB. 2021 vol. 27, Issue SUPPLEMENT 11 SEEC & 31 IMAB Section Medicine (1-3). DOI: 10.5272/jimab.2021Supplement.**

The purpose of the present work was to analyze the frequency of SARS-CoV-2 positive samples in North-East Bulgaria and the spatiotemporal distribution of COVID-19 during the first two years of the pandemic (2020-2021). We found that the distribution of SARS-CoV-2 was not related to seasons and there were significant regional differences in the timing and the strength of the waves' peaks.

Целта на настоящата работа беше да се анализира честотата на положителните проби за SARS-CoV-2 в Североизточна България и пространствено-времето разпределение на COVID-19 през първите две години на пандемия (2020-2021 г.). Установихме, че разпространението на SARS-CoV-2 не е свързано със сезоните и имаше значителни регионални различия във времето и силата на пиковете на вълните на пандемията.

### **Резюмета на научни трудове към точка Г7 от академичната справка:**

**1. Ivanova L, M Kyoseva, K Metodiev, Zh Stoykova. Serologic Hepatitis B Virus Immunity in Health Care Workers. 2013, European Journal of Inflammation, 11(3), 733-738. ISSN 1721-727X. Impact factor 5.173.**

Health care workers (HCWs) are at high risk of blood borne infections including Hepatitis B virus (HBV) infection. HBV vaccination is recommended for HCWs but post vaccination testing of immune response (anti-HBs) is not routinely performed. In our study information on immune response after the first immunization schedule of HCWs is not available. By reason of the questions regarding long lasting immunity, we decided to assess the anti-HBs of HCWs who wished to check immune response after different times of vaccination and also unvaccinated persons in St. Marina University Hospital, Varna, Bulgaria. After informed consent, 341 HCWs were investigated. They were divided into 3 groups according to their status: Group A had no history of vaccination against HBV, Group B had no complete vaccination schedule and Group C had complete vaccination data. Of Group C, 32 had been vaccinated more than 10 years previously, 111 - 10–5 years previously and 48 - < 5 years previously. Quantitative detection of antibody to HBsAg (anti-HBs) by commercial ELISA was carried out. A total, positive immune response was detected in 35.6% (group A), 66.2% (group B) and 80.1% (group C) of HCWs investigated. Of Group C positive immune response was detected in 68.7%, 81.1% and 85.4% respectively of the time of vaccination. Detectable anti-HBs was found in HCWs without HBV immunization, probably after unknown exposure to HBV. The lack of information regarding immune response after the first immunization schedule makes the interpretation of no detectible anti-HBs level 5–10 years post immunization difficult. For the HCWs with anti-HBs loss, counseling for booster vaccine dose and consequent testing is mandatory.

Здравните работници са изложени на висок риск от инфекции, пренасяни по кръвен път, включително инфекция с вируса на хепатит В (HBV). HBV ваксинацията се препоръчва за здравни работници, но не се извършва рутинно изследване на имунния отговор след ваксинация (анти-HBs). В нашето проучване няма налична информация за имунния отговор след първата имунизационна схема на група здравни работници. Поради въпросите относно продължителността на имунитета, решихме да оценим анти-HBs на здравни работници, които желаят да проверят имунния отговор в различно време след ваксиниране, както и неваксинирани лица в УМБАЛ „Света Марина“ Варна, България. След информирано съгласие бяха изследвани 341 здравни работници. Те бяха разделени на 3 групи според техния статус: Група А нямаше история на ваксинация срещу HBV, Група В нямаше пълната схема на ваксиниране и Група С имаше пълни данни за ваксинация. От група С 32 са били ваксинирани преди повече от 10 години, 111 - преди 10–5 години и 48 - < 5 години преди това. Извършено е количествено откриване на анти-HBs срещу HBsAg (анти-HBs) чрез търговски ELISA тест. Общ положителен имуноен отговор е открит при 35,6% (група А), 66,2% (група В) и 80,1% (група С) от изследваните здравни работници. От група С положителен имуноен отговор е открит при 68,7%, 81,1% и 85,4% респективно от времето на ваксиниране. Откриваеми анти-HBs бяха открити при здравни работници без HBV имунизация, вероятно след неизвестна експозиция на HBV. Липсата на информация относно имунния отговор след първата имунизационна схема затруднява тълкуването на липсата на откриваемо ниво на анти-HBs 5–10 години след имунизацията. Обсъждането на бустерна доза ваксина и последващото изследване е задължително за здравните работници със загуба на анти-HBs.

**2. Stoykova Zh, Kostadinova T, Todorova T, Niyazi D, Bozhkova M, Bizheva S & Stoeva T. (2022) Dealing with inconclusive SARS-CoV-2 PCR samples—Our experience. PLoS ONE 17(5): e0268187.**

Early confirmation of SARS-CoV-2 is a key point in the timely management of infected patients and contact persons. Routine diagnostics of COVID-19 cases relies on RT-PCR detection of two or three unique sequences of the virus. A serious problem for the laboratories is how to interpret inconclusive samples which are positive for only one of the SARS-CoV-2 specific genes.

A total of 16 364 naso-oropharyngeal swabs were collected and tested with SARS-CoV-2 Real-TM kit (Sacace Biotechnologies, Italy) between May and September 2020. We retrospectively analyzed their amplification plots to determine the number of inconclusive samples. We also reviewed the medical records to summarize the patient's COVID-19 testing history and basic demographic characteristics.

We obtained 136 (0.8%) inconclusive samples with amplification signal only for the N-gene. Thirty-nine of the samples were excluded from further analysis as no additional data were available for them. Of the rest of the samples, the majority— 48% (95% CI 38–59%) had a previous history of SARS-CoV-2 positivity, 14% (95% CI 8–23%)—a subsequent history of positivity and 37% (95% CI 28–48%) were considered as false positive.

A substantial proportion of the inconclusive results should be considered as positive samples at the beginning or the end of the infection. However, the number of false-positive results is also significant and each patient's result should be analyzed separately following the clinical symptoms and epidemiological data.

Ранното потвърждаване на SARS-CoV-2 е ключов момент в навременното лечение на заразени пациенти и контактни лица. Рутинната диагностика на случаи на COVID-19 разчита на RT-PCR за откриване на две или три уникални последователности на вирусния геном. Сериозен проблем за лабораториите е как да интерпретират неубедителни проби, които са положителни само за един от специфичните за SARS-CoV-2 гени. Общо 16 364 назо-орофарингеални секрета бяха събрани и тествани с SARS-CoV-2 Real-TM (Sacace Biotechnologies, Италия) между май и септември 2020 г. Ретроспективно анализирахме техните PCR профили, за да определим броя на неубедителните проби. Също така прегледахме медицинската документация, за да обобщим историята на тестовете за COVID-19 на пациента и основните демографски характеристики при тях. Получихме общо 136 (0.8%) неубедителни проби с усилващ сигнал само за амплификация на N-гена. Тридесет и девет от пробите бяха изключени от допълнителен анализ, тъй като нямаше налични допълнителни данни за тях и повторни тествания в PCR. От останалите проби по-голямата част – 48% (95% CI 38–59%) са имали предишна анамнеза за положителност на SARS-CoV-2, 14% (95% CI 8–23%) – последваща анамнеза за положителност и 37% (95% CI 28–48%) се считат за фалшиво положителни/съмнителни резултати. Заклучаваме, че значителна част от неубедителните резултати трябва да се считат за положителни проби в началото или в

края на самата инфекция. Въпреки това, броят на фалшиво положителните/ съмнителни резултати също е значителен и PCR резултатът на всеки пациент трябва да се анализира отделно, следвайки клиничните симптоми и епидемиологичните данни.

**3. Kostadinova Ts, Ivanova L, Todorova T, Stoykova Zh, Staykov D, Efraim M, Gercheva L. Detection of EBV DNA in Non-Hodgkin Lymphoma Patients in Bulgaria. Indian J Hematol Blood Transfus. July 2019, Volume 35, Issue 3, pp 465–470. <https://doi.org/10.1007/s12288-019-01088-8>.**

Epstein-Barr virus is the first human oncogenic virus associated with a broad range of different malignant diseases but its role in non-Hodgkin lymphomas (NHL) development still needs to be fully understood. High expression levels of EBV major genes are found in NHL tumor cells and free viral DNA circulates in the plasma of such individuals. In the current study we detected EBV DNA levels in plasma samples from NHL patients in order to validate its significance as a laboratory marker for disease monitoring. We investigated a cohort of 52 patients diagnosed with NHL in The University Hospital "St. Marina" Varna, Bulgaria. Viral DNA was extracted from single plasma samples using Kit Ribo Virus (Sacace Biotechnologies S.r.l., Como, Italy) and amplified with EBV Real-TM Quant (Sacace Biotechnologies S.r.l., Como, Italy). Plasma samples of the same patients were tested for presence of EBV VCA IgM/IgG antibodies with indirect ELISA tests (Euroimmun, Luebeck, Germany). We found 15.4% (95% CI 6.9-28.1%, n = 8) of the samples from NHL patients to be positive in quantitative PCR (range 674 - 221 333 copies/ml). The diffuse large B cell lymphomas and peripheral T cell lymphomas were most often associated (although not statistically significant,  $p = 0.167$ ) with detectable plasma EBV DNA levels. To our knowledge, this is the first study about the role of EBV in NHL development in Bulgaria. The results we have obtained should stimulate new, larger investigations to apply the quantitative PCR technique in the routine laboratory EBV diagnosis.

Вирусът на Epstein-Barr е първият човешки онкогенен вирус, свързан с широк спектър от различни злокачествени заболявания, но ролята му в развитието на неходжкинови лимфоми (НХЛ) все още не е напълно разбрана. Високи нива на експресия на основните гени на EBV се откриват в НХЛ туморни клетки и свободната вирусна ДНК циркулира в плазмата на такива индивиди. В настоящото проучване открихме нива на EBV ДНК в плазмени проби



от пациенти с НХЛ, за да потвърдим значението му като лабораторен маркер за мониторинг на заболяването. Изследвахме кохорта от 52 пациенти с диагноза НХЛ в УМБАЛ „Света Марина” Варна, България. Вирусната ДНК беше екстрахирана от единични плазмени проби с помощта на Kit Ribo Virus (Sacace Biotechnologies S.r.l., Como, Италия) и се амплифицира с EBV Real-TM Quant (Sacace Biotechnologies S.r.l., Como, Италия). Плазмени проби от същите пациенти бяха тествани за наличие на EBV VCA IgM/IgG антитела с индиректни ELISA тестове (Euroimmun, Luebeck, Германия). Установихме, че 15,4% (95% CI 6,9-28,1%, n = 8) от пробите от пациенти с НХЛ са положителни при количествен PCR (диапазон 674 - 221 333 копия/ml). Дифузните големи В-клетъчни лимфоми и периферните Т-клетъчни лимфоми бяха най-често асоциирани (макар и статистически незначими, p = 0,167) с откриваеми плазмени нива на EBV ДНК. Доколкото ни е известно, това е първото проучване за ролята на EBV в развитието на НХЛ в България. Резултатите, които получихме, трябва да стимулират нови, по-големи изследвания за прилагане на количествената PCR техника в рутинната лабораторна диагностика на EBV инфекцията при пациенти с лимфопролиферативни заболявания.

**4. Zhivka Stoykova, Liliya Ivanova, Snejinka Cvetkova, Diana Yordanova. Congenital Cytomegalovirus Infection-Lessons from a Clinical Case. Folia Medica, 2020; Volume 62(2): 403-407; doi: 10.3897/folmed.62.e49840.**

Cytomegalovirus (CMV) is a worldwide spread herpes virus that establishes a latent infection after the primary infection. It becomes a major problem in immunocompromised patients and in cases of primary or reactivated infection during pregnancy. CMV is the most common congenital infection and is the leading infectious cause of sensorineural deafness and cerebral mental retardation. We aimed to raise an attention to the discordance in our knowledge of cCMV infection and the implementation of the knowledge in practice. CMV-DNA was extracted from saliva and plasma samples according to the protocol of DNA-Sorb-A, Sacace, Biotechnologies, Italy. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using a commercial kit based on the Taq-man principle: Quantitative RT-PCR for CMV-DNA detection (Sacace, Biotechnologies, Italy). The linear range of the CMV Real-TM Quant PCR test is 500-10 000 000 copies/ml, and the reported sensitivity is 400 copies/ml.

The infant was born with clinical manifestations involving development of hepatosplenomegaly, chorioretinitis, anemia, microcephaly and simultaneous dilatation of the brain ventricles. CMV infection was confirmed using modern PCR studies.

This case highlights the need for specific virological/PCR tests to be performed for all children with the least suspected congenital infection, especially when there is an option of a specific treatment.

Цитомегаловирусът (CMV) е широко разпространен херпесен вирус, който установява латентна след първичната инфекция. Това се превръща в основен проблем при имунокомпрометирани пациенти и в случаи на първична или реактивирана инфекция по време на бременност. CMV е най-честата вродена инфекция по света и е водещата инфекциозна причина за сензонеурална глухота и ментална ретардация. Имахме за цел да алармираме за несъответствието в познанията ни за сCMV инфекцията и прилагането на тези знания в практиката. CMV-ДНК беше екстрахирана от проби от слюнка и плазма съгласно протокола на DNA-Sorb-A, Sacace, Biotechnologies, Италия. RT PCR за откриване на CMV-DNA се извърши с търговски комплект, базиран на принципа на Taq-man: Sacace, Biotechnologies, Италия. Линейният диапазон на CMV Real-TM Quant PCR теста е 500 - 10 000 000 копия/ml, а отчетената чувствителност е 400 копия/ml. Тестваното новородено беше с клинични прояви, изразяващи се в развитие на хепатоспленомегалия, хориоретинит, анемия, микроцефалия и едновременно с това данни за дилатация на мозъчните вентрикули. CMV инфекцията беше потвърдена с помощта на серологични и PCR тестове. Този клиничен случай подчертава необходимостта от извършване на навременни специфични вирусологични/PCR тестове за всички новородени с най-малко съмнение за вродена CMV инфекция, особено при съвременните възможности за специфично лечение.

**5. Todorova T, Stoykova Zh, Kostadinova T. An increased occurrence of viral hepatitis A during the COVID-19 pandemic. Infect Dis (Lond). 2021 Nov-Dec;53(12):963-964. doi: 10.1080/23744235.2021.1962012. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34379035.**

The COVID-19 effect on seasonal respiratory infections is widely reported and even predictable to some extent but little information exists for other widespread human viruses which exhibit different transmission routes. One could anticipate that most infectious diseases would decrease in

occurrence as a result of the massive disinfection and social distancing. However, during the first year of the COVID-19 pandemic in the Laboratory of Virology, University Hospital “St. Marina”, Varna, Bulgaria we have observed a somewhat surprising higher hepatitis A (HAV) occurrence. The routine HAV diagnosis in our laboratory is performed with HAV IgM ELISA detection kit (Dia.Pro – Diagnostic Bioprobes s.r.l., Italy) and is intended for use in patients admitted to the hospital with a diagnosis of acute hepatitis. For the ‘pandemic’ period (from 01 May 2020 to 30 April 2021), we found 33 HAV positive cases out of 308 tested suspicious patients (11%) while for the previous 1-year period (01 May 2019 to 30 April 2020) – 14 out of 299 (5%) and for 01 May 2018 to 30 April 2019 – 8 positive samples out of 198 tests (4%). The Chi-squared test is 11.9 with  $p < .003$ . We suggested hypotheses that may explain why HAV incidence has not decreased during the pandemic but do not satisfactorily explain the actual several-fold higher frequency found in our patients. In addition, we detected higher HAV positivity in a particular group – hospitalized patients. Data are not available for the general population. Most HAV cases are mild and often undiagnosed, so the here-reported data have to be accepted as the incidence of the most severe cases. It is possible that the proportion of hospitalizations has enlarged while the general incidence has kept its standard frequency. The true reason for the increased number of HAV hospitalizations in Varna remains unclear. Moreover, it will be interesting to find out whether the present increase of HAV during the COVID-19 pandemic is just occasional or whether it might occur in other regions.

Ефектът на COVID-19 върху сезонните респираторни инфекции е широко докладван и дори предсказуем до известна степен, но има малко информация за други широко разпространени човешки вируси, с различни пътища на предаване. Очаквано е, че повечето инфекциозни заболявания ще намалееят в резултат на масовата дезинфекция и социалното дистанциране по време на пандемия. През първата година от пандемията от COVID-19 обаче в Лабораторията по вирусология на УМБАЛ „Св. Марина”, Варна, България наблюдаваме донякъде изненадващо по-висока честота на хепатит А инфекцията (HAV). Рутинната диагностика на HAV в нашата лаборатория се извършва с кит за откриване на Anti HAV IgM ELISA (Dia.Pro – Diagnostic Bioprobes s.r.l., Италия) и е предназначен за използване при пациенти, приети в болница с диагноза остър хепатит. За „пандемичния“ период (от 01 май 2020 г. до 30 април 2021 г.) открихме 33 положителни случая на HAV от 308 тествани подозрителни пациенти (11%), докато за предходния 1-годишен период (01 май 2019 г. до

30 април 2020 г.) – 14 от 299 (5%) и за 01 май 2018 г. до 30 април 2019 г. – 8 положителни проби от 198 теста (4%). Тестът Chi-squared е 11,9 с  $p = 0,003$ . Ние предложихме някои хипотези, които могат да обяснят защо честотата на HAV не е намаляла по време на пандемията, но те не обясняват задоволително действителната няколко пъти по-висока честота, открита при нашите пациенти. Освен това открихме по-висока HAV позитивност в определена група – хоспитализирани пациенти, което е лимитиращ фактор. Нямаме данните за общата популация в този период. Повечето случаи на HAV инфекция са леки и често недиагностицирани, така че докладваните от нас данни трябва да се приемат като честота на най-тежките случаи. Възможно е делът на хоспитализациите да се е увеличил, докато общата заболяемост е запазила стандартната си честота. Истинската причина за увеличения брой хоспитализации с остра HAV инфекция във Варна в този период остава неясна. Освен това ще бъде интересно да разберем дали настоящото увеличение на HAV по време на пандемията от COVID-19 е случайно или дали може да се появи и в други региони.

**6. Tsvetelina Kostadinova, Liliya Ivanova, Ivaylo Hristov, Zhivka Stoykova, Tatiana Todorova, Merlin Efraim, Liana Gercheva. Detection of Epstein Barr Virus DNA in Patients with Hodgkin Lymphoma. Comptes rendus de l'Acade'mie bulgare des Sciences, 2021, Vol 74, No9, pp.1390-1396.**

Epstein Barr virus (EBV) often associates with Hodgkin lymphoma (HL) cases but its clinical significance for HL development in Bulgarian population is currently unknown. The purpose of this work was to assess whether plasma EBV DNA can be found in patients with HL and to determine the utility of Real-time PCR testing in patients diagnosed with the disease. We investigated a cohort of 27 HL patients with EBV Real-time PCR and anti VCA IgM/IgG indirect ELISA tests. The Real-time PCR showed detectable EBV DNA levels in 40.7% (95% CI: 22.4÷61.2%  $n = 11$ ) of the HL patients. The range varied from 500 to 424 477 copies/ml. We observed no dependence between the plasma EBV DNA copies and the anti-VCA IgM/IgG serum titers. The viral load was not found to be a significant predictor for the histology subtype or the stage of the HL in our patients. To our knowledge, this study was the first to evaluate the free plasma EBV DNA loads in Bulgarian patients with HL and the results obtained suggest that the determination of EBV-DNA is important for diagnosis and monitoring of EBV-associated HL cases.

Вирусът Epstein Barr (EBV) често се свързва със случаи на лимфом на Ходжкин (ЛХ), но клиничното му значение за развитието на болестта в българската популация засега не е проучвано. Целта на тази работа беше да се оцени дали плазмената EBV ДНК може да бъде открита при пациенти с ЛХ и да се определи полезността на PCR теста при пациенти, диагностицирани със заболяването. Изследвахме група от 27 пациенти с ЛХ с EBV PCR в реално време и анти VCA IgM/IgG индиректни ELISA тестове. PCR в реално време показва откриваеми нива на EBV ДНК при 40,7% (95% CI: 22,4÷61,2% n = 11) от пациентите с ЛХ. Диапазонът варира от 500 до 424 477 копия/ml. Не наблюдавахме зависимост между плазмените EBV ДНК копия и анти-VCA IgM/IgG серумните титри. Не беше установено, че вирусният товар е значим предиктор за хистологичния подтип или стадия на ЛХ при нашите пациенти. Доколкото ни е известно, това проучване е първото, което оценява натоварванията на свободната плазмена EBV ДНК при български пациенти с ЛХ и получените резултати предполагат, че определянето на EBV-DNA е важно за диагностицирането и проследяването на случаи на EBV-асоциирани ЛХ.

**7. Tsvetelina Kostadinova, Tatina Todorova, Zhivka Stoykova, Denis Niyazi, Milena Bozhkova, Svetomira Bizheva & Temenuga Stoeva (2021) Dynamics of COVID-19 and demographic characteristics as predisposing risk factors for SARS-CoV-2 infection: a hospital-based, one-center retrospective study, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35:1, 1869-1873, DOI: 10.1080/13102818.2022.2026817**

The SARS-CoV-2 pandemic is the most devastating health crisis our generation has seen. The present study tries to gather more epidemiological data and improve the knowledge of the demographic factors responsible for a higher incidence of COVID-19. We analyzed the real time polymerase chain reaction (RT-PCR) results obtained in one of the biggest tertiary hospitals in Bulgaria during the first year of the COVID-19 pandemic (May 2020–April 2021). For this period, almost 40% of all tested samples of hospitalized patients and health care workers in University Hospital “St. Marina,” Varna, were SARS-CoV-2 positive. The most affected individuals were 60–79-year-old people. Male sex is a significant risk factor only for the active ages (20–59 years), while both men and women of advanced age have the same risk to be infected with SARS-CoV-2. Interestingly, girls under 19 years were more susceptible to the infection than boys in the same age group.

Пандемията SARS-CoV-2 е най-опустошителната здравна криза, на която нашето поколение е свидетел. Настоящото проучване се опитва да събере повече епидемиологични данни и да подобри познаването на демографските фактори, отговорни за по-високата честота на COVID-19. Анализирахме резултатите от RT-PCR, получени в една от най-големите болници в България през първата година от пандемията от COVID-19 (май 2020 г. – април 2021 г.). За този период почти 40% от всички изследвани проби на хоспитализирани пациенти и здравни работници в УМБАЛ „Св. Марина” Варна са положителни за SARS-CoV-2. Най-засегнатите са хора на възраст 60–79 години. Мъжският пол е значим рисков фактор само за активните възрасти (20–59 години), докато мъжете и жените в напреднала възраст имат еднакъв риск да бъдат заразени със SARS-CoV-2. Интересното е, че момчетата под 19 години са по-податливи на инфекцията, отколкото момчетата в същата възрастова група.

**8. Kostadinova Ts, L Ivanova, T Raykov, Zh Stoykova, G Tsankova. Seroprevalence of Epstein-Barr in the North-Eastern Bulgaria, Acta Microbiologica Bulgarica, 2016, Volume 32(3): 33-38.**

Epstein-Barr Virus (EBV) is a widely spread member of the Herpesviridae family. Data show that in more than 90% of the adult population, specific anti-EBV can be found. In different Bulgarian studies the seroprevalence was set between 60% and 80%. The primary infection early in life is often asymptomatic or with nonspecific clinical symptoms, while in teenagers infectious mononucleosis develops. EBV is a proven agent of malignant, autoimmune and lymphoproliferative diseases, especially in immunocompromised patients. Tracking and analyzing the seroepidemiological status of the population in every region is of utmost importance. In our study, 5016 single serum samples from patients referred for EBV testing for various reasons were analyzed for the period 2010-2015. People aged between 1 month and 89 years old were divided into sixteen age groups. The samples were tested using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-EBV (VCA) IgM and IgG. The proportion of EBV seropositive individuals and their corresponding confidence intervals (CI), chi-squared distributions and p-values were calculated. Our data indicated high, age-dependent EBV (VCA) IgG dissemination with 90% seroprevalence after age 26. Primary infections detected by anti-EBV (VCA) IgM occur in a bimodal model with peaks in age groups 1 – 5 and 11 - 20 years old.

EBV е широко разпространен представител на семейство Herpesviridae. По литературните данни повече от 90% от възрастното население притежава специфични антитела срещу вируса. Според различни проучвания в България серопревалентността се движи между 60% и 80%. Първичната инфекция в ранното детство често е асимптомна или протича с неспецифична клинична симптоматика, докато в юношеска възраст се развиват симптоми на инфекциозна мононуклеоза. EBV е доказан причинител на малигнени, автоимунни и лимфопролиферативни заболявания, особено при имунокомпрометирани пациенти. Проследяването и анализирането на сероепидемиологичния статус на населението във всеки регион е от изключителна важност. Нашето проучване се основава на анализ на 5016 единични серумни проби от пациенти, насочени по различни причини за изследване на EBV-инфекцията към Лаборатория по клинична вирусология в УМБАЛ “Света Марина“, Варна в периода 2010 – 2015 г. Пациентите бяха разделени в 16 възрастови групи. Използвани са стандартизирани ELISA китове за доказване на специфични anti-EBV (VCA) IgM и IgG. Статистическият анализ беше направен с помощта на McCallum Layton calculators ([www.mccallum-layton.co.uk](http://www.mccallum-layton.co.uk)) и Social Science Statistics ([www.socscistatistics.com](http://www.socscistatistics.com)). Нашите данни показват високо, възрастово свързано разпространение на заразеността с EBV, според наличието на anti EBV (VCA) IgG. Серопревалентността след 26-годишна възраст е над 90%. Първичната инфекция според наличието на anti-EBV (VCA IgM) има бимодален модел на разпространение с пикове във възрастови групи 1 – 5 и 11 - 20 години.

**9. Tsaneva-Damyanova D, L Ivanova, I Ivanova, T Chervenkov, T Todorova, Zh Stoykova, Ts Kostadinova. Virological responses evaluated during antiviral therapy in chronically infected HBV and HDV Patients. Acta Microbiologica Bulgarica, 2017, Volume 33(4):157-166.**

The aim of this investigation was to evaluate the various virological responses at several time points of therapy in chronically infected patients with dual HBV and HDV infection. A total of 23 patients, 8 (34.8%) women and 15 (65.2%) men with serologically proved chronic HBV and HDV infection, at the Gastroenterology Department of the University Hospital St. Marina, Varna, Bulgaria, were investigated in the hospital's laboratories of Clinical Virology and Clinical Immunology. Quantitative determination of HBV DNA and HDV RNA was performed by Real-time PCR, on several occasions during and after therapy from 2012 to 2017. HBV viremia ranged from  $1.0 \times 10^2$  to

1.6x10<sup>6</sup> cps/ml. HDV viremia ranged from 2.5x10<sup>2</sup> to 9.6x10<sup>6</sup> cps/ml. HDV replication dominated in 16 patients (69.6%), accompanied by low HBV viremia. HDV-RNA and HBV-DNA levels showed no direct inverse correlation in the less part of the investigated patients, although higher HDV levels were accompanied by lower HBV viremia. HBV DNA correlates positively with HBeAg positivity. IFN is efficient in reducing transaminases (ALT), decreasing HDV RNA levels at some point, but it is not operative in HDV RNA clearance. Lamivudine alone is a potent inhibitor of HBV DNA replication but does not improve disease activity or lower HDV RNA levels in patients with chronic delta hepatitis. It did not increase sustained virological response when combined with IFN. When virological breakthrough during Lamivudine therapy occurs, Tenofovir is a means of choice for treatment. Biochemical parameters did not accurately indicate the stage and grade of liver disease in chronic HDV patients as they often fluctuate over time.

Да се оценят различните вирусологични отговори, в няколко етапа от терапията, при пациенти с хронична смесена HBV и HDV инфекция. Изследвани са 23 пациенти на гастроентерологичната клиника на УМБАЛ „Св. Марина” Варна, от които 8 жени (34.8%) и 15 мъже (65.2%), със серологични данни за хронична смесена HBV и HDV инфекция в Лабораторията по клинична вирусология и Лабораторията по клинична имунология на УМБАЛ „Св. Марина”. Количествено определяне на вирусния товар за HBV-ДНК, както и HDV-РНК беше извършено посредством Real-time PCR, на различни етапи от провежданата терапия, в периода 2012-2017 год. HBV вирусният товар се движи от 1.0x10<sup>2</sup> до 1.6x10<sup>6</sup> cps/ml. HDV вiremия доказане в обсег от 2.5x10<sup>2</sup> до 9.6x10<sup>6</sup> cps/ml. HDV репликацията доминира при 16 пациента (69.6%), съпроводена от ниска HBV вiremия. Регистрираните нива на HDV РНК и HBV ДНК не показаха директна обратна корелация, при по-малка част от пациентите, въпреки че по-високите HDV нива се свързват обичайно с по-ниска HBV вiremия. HBV-ДНК корелира положително с HBeAg-позитивността. IFN ефективно води до снижаване на нивата на трансаминазите (ALAT), намалява нивата на HDV РНК, но не води до трайно негативиране на HDV РНК. Монотерапията с Lamivudine не подобрява хода на болестта при пациенти с хроничен делта хепатит и не намалява трайно нивата на HDV РНК, въпреки че е потенциален инхибитор на HBV ДНК репликацията. Lamivudine в комбинация с IFN не задържа нивата на HBV ДНК под 2000 IU/ml за поне 12 месеца след края на терапията. При наличие на вирусологичен пробив на фона на терапия с Lamivudine, се включва Tenofovir, като средство на избор. Биохимичните показатели не отразяват коректно



стадия на чернодробното заболяване, при пациентите с хронична HBV и HDV инфекция, т.к се варират през цели период на лечението и след това.

**10. Ivanova L, Stoykova Zh, Kostadinova Ts, Tsaneva-Damyanova D. Human Immunodeficiency Virus - related laboratory and clinical manifestations. Acta Microbiologica Bulgarica, 2018, Volume 34(2):83-88.**

Human immunodeficiency virus (HIV) is a member of the family Retroviridae that attacks the immune system of the infected person. The virus destroys a type of white blood cell (T helper cells or CD4+ cells) and gradually breaks down a person's immune system. As many as 37 million people worldwide are thought to be infected. In our retrospective study, we review the clinical evidences as a reason for association with HIV infection and the most common co-infections in patients living with HIV. Since 2003 we have tested 148 HIV infected patients (104 males and 44 females), aged between 3 months and 67 years, average age 37.3 years. Out of the patients investigated, 108 were with proven HIV-positive status (persons living with HIV), hospitalized in "St Marina" University Hospital, Clinic of Infectious, Parasitic and Dermatovenerologic Diseases and 40 patients were found with reactive results at our Virology Laboratory and confirmed as HIV infected at the National HIV Reference Laboratory in Sofia. ELISA HIV Ag&Ab (DiaPro Italy), HbsAg (SURASE Taiwan), Anti Hbc (DiaPro Italy), Anti HCV (NANBASE Taiwan), Anti CMV IgM/IgG (EUROIMMUN Germany), Syphilis Ab screening (EUROIMMIN - Germany) were performed according to the manufacturer's recommendations. Out of the 40 investigated patients with diagnostic and therapeutic problems, 13 (32.5%) were with clinical diagnosis pneumonia, 6 (15%) with lymphadenopathy, 5 (12.5%) with hepatitis, 3 (7.5%) with mononucleosis-like syndrome, 4 (10%) with wasting syndrome and chronic diarrhea, 4 (10%) with neurological symptoms, 3 (7.5%) with dermatological manifestation including Herpes zoster, and 2 (5%) were mothers of infected children. Out of the 108 pre-defined HIV infected patients, we received serological data for hepatitis B in 12 (11%), hepatitis B/C co-infection in 2 (1.9%), hepatitis C in 6 (5.6%), syphilis in 24 (22.2%), CMV active infection in 21 (19.4%). The most common reason for HIV testing is the diagnosis bilateral pneumonia, unsusceptible to conventional antibacterial treatment. People living with HIV most often were co-infected with syphilis.

Човешки имунодефицитен вирус (HIV) принадлежи към семейство Retroviridae. Атакува предимно белите кръвни клетки (CD4 + клетки) и срива имунната система на заразения индивид. Около 37 млн индивиди по света са инфектирани. Целта на настоящото изследване е да се анализират най-честите клинични симптоми, водещи до доказване на HIV серопозитивност и най-честите ко-инфекции при пациенти, живеещи с HIV. В периода 2003-2017 са тествани 148 HIV инфектирани пациенти (104 мъже и 44 жени) на възраст 3 м. - 67 г., средна възраст 37.3 г. От изследваните пациенти 108 са с доказан HIV позитивен статус, хоспитализирани в Клиниката по Инфекциозни болести, паразитология и дерматовенерология на УМБАЛ „Света Марина“ - Варна и 40 са доказани като позитивни в Лабораторията по Вирусология и потвърдени в Националната референтна HIV лаборатория - София. Приложени са търговски ELISA тестове, HIV Ag&Ab (DiaPro Italy), HbsAg (SURASE Taiwan), Anti Hbc (DiaPro Italy), Anti HCV (NANBASE Taiwan), Anti CMV IgM/IgG (EUROIMMUN Germany), Syphilis Ab screening (EUROIMMIN Germany) съобразно изискванията на тест процедурата. От изследваните 40 пациенти с диагностични и терапевтични проблеми 13 (32.5%) са с клинична диагноза пневмония, 6 (15%) с лимфаденопатия, 5 (12.5%) с хепатит, 3 (7.5%) с мононуклеоза подобен синдром, 4 (10%) с хронична диария и загуба на тегло, 4 (10%) с неврологична симптоматика, 3 (7.5%) с дерматологична симптоматика включително Herpes zoster, артралгия с обрив и 2 (5%) са майки на HIV инфектирани деца. От 108-те HIV инфектирани пациенти са установени серологични данни за хепатит В при 12 (11%), хепатит В/С ко-инфекция при 2 (1.9%), хепатит С - 6 (5.6%), сифилис 24 (22.2%), активна CMV инфекция при 21 (19.4%). Данните показват, че най-честа клинична манифестация като основание за HIV тестване и доказване на серопозитивност е двустранна пневмония, неподдаваща се на лечение с конвенционални антибактериални средства. Лицата живеещи с HIV инфекция най-често са ко-инфектирани със сифилис.

**11. Kostadinova Ts, Ivanova L, Stoykova Zh, Todorova T, Tsaneva D. Relevance of Avidity Testing of VCA IgG in EBV Diagnostics. Acta Microbiologica Bulgarica. 2018; 34(3): 149-152.**

Diagnosics of Epstein-Barr virus (EBV) primary infection is usually based on the results of ELISA determination of IgM and IgG against viral capsid antigen (anti-VCA IgM and anti-VCA IgG) and

of IgG against EBV nuclear antigen (anti-EBNA-1 IgG). In cases of difficult interpretation, the use of additional tests, such as measurement of IgG avidity, may help to determine the infection stage. IgG maturation occurs several weeks after primary infection, and the presence of high-grade antibodies is a marker for a previous infection. In this study, we determined the significance of the avidity of anti-VCA IgG avidity test for patients with infectious mononucleosis or suspected EBV reactivation. Serological ELISA was used to determine the avidity of IgG against viral capsid antigen (anti-VCA IgG) in 46 single serum samples. Low anti-VCA IgG avidity was found in 26% (95% CI: 14% - 41%) of all tested samples, which could be interpreted as acute infection. Our results confirmed the presence of isolated IgG models in 24% (95% CI: 11%-42%) of primary EBV infections, while possible reactivation or non-specific reactivity of anti-VCA IgM was suggested for 69% (95% CI: 39%-91%) of the positive anti-VCA IgM/IgG patients. Our results show that the laboratory confirmation of patients with clinical evidence of infectious mononucleosis and absence of IgM should include the use of avidity tests. We believe that avidity tests may be useful for the discrimination between reactivation and primary infections.

Диагностиката на първична инфекция с Epstein-Barr вируса (EBV) обикновено се основава на определянето на IgM и IgG антитела срещу вирусния капсиден антиген (anti-VCA IgM и anti-VCA IgG) и IgG антитела срещу ядрения антиген (anti-EBNA-1 IgG). Съществуват серологични профили, в които използвайки само тези маркери не е достатъчно да се определи стадия на инфекцията. Използването на допълнителен тест за определяне на IgG авидността, може да помогне в интерпретацията на резултатите. Узряването на IgG става няколко седмици след първичната инфекция и наличие на антитела с висока зрялост е маркер за минала инфекция. В това изследване определихме значимостта на теста за авидността на anti-VCA IgG при пациенти с инфекциозна мононуклеоза и предполагаема реактивация на EBV. Включихме 46 серумни проби първично тествани за anti-VCA IgM/anti-VCA IgG, разделени в две групи в зависимост от диагнозата и серологичните профили. Използвахме ELISA за определяне на авидността на anti-VCA IgG. Установихме 26% (95% CI: 14% - 41%) проби с ниска anti-VCA IgG авидност, определящи ги като остра инфекция. Наличието на изолирани IgG модели има в 24% (95% CI: 11% -42%) от случаите с първична EBV инфекция, докато реактивация или неспецифична реактивност на anti-VCA IgM има в 69% (95% CI: 39% -91%). Нашите резултати показват, че лабораторното потвърждение на пациентите с клинични данни за инфекциозна мононуклеоза и липсата на

IgM трябва да включва използването на тестове за авидност. Тестовите могат да бъдат полезни за диференциране на първични инфекции и реактивация.

**12. Kostadinova Ts, Ivanova L, Tsaneva-Damyanova D, Stoykova Zh. HBV and HCV incidence among Non-Hodgkin's Lymphoma patients in Varna region (2013-2016). Acta Microbiologica Bulgarica. 2018 Volume 34 (4): 220-226.**

Several epidemiological studies have discussed the relationship between HBV and HCV viral infections and the development of non-Hodgkin 's lymphomas (NHL). According to WHO, Bulgaria is in the intermediate zone of hepatitis B endemicity, with 3.87% HBsAg (+) carriers. The frequency of HCV (+) individuals in the general population is lower -1.28%. A national survey from 1999 to 2000 showed a higher proportion of these infections in the Varna region, 5.26% and 1.4%, respectively. The purpose of the present study was to investigate the incidence of HBV and HCV infection in patients with different histological variants of NHL, based on the presence of HBsAg, anti-HBc total Ab and anti-HCV Ab. We analyzed 466 patients with clinical and laboratory diagnosis NHL, tested for HBsAg and 462 patients, explored for anti- HCV Ab. The survey was conducted in the laboratory of clinical virology of "St. Marina" University Hospital, Varna, from 2013 to 2017. Sixty individuals were tested for anti-HBc total Ab, ten of which were HBsAg positive. The proportion of anti-HCV positive patients with NHL was 1.7% (95% CI: 0.8-3.4, n = 8), while HbsAg carriers were significantly more - 8.2% (95% CI: 5.8-11.0, n=38) ( $p<0.05$ ). Fifty HBsAg (-) patients were tested for anti-HBc total Ab assay and positive results were found in 46.0% (95% CI: 31.8-60, n=23) of them. A higher HBsAg and anti-HCV positivity was determined in patients with NHL than the average for Bulgaria and Varna region. HBV infection dominated in this group compared to HCV.

През последните години въз основа на епидемиологични проучвания се обсъжда връзката между заразността с HBV и HCV и развитието на Неходжкинови лимфони. България се намира в средната зона на хепатит В ендемичност с 3.87% носители на HBsAg, докато честота на носителите на HCV е по-ниска -1.28%. Национално проучване от периода 1999 г. - 2000 г. показва по-висок относителен дял на тези инфекции във Варненски регион, съответно 5.26% и 1.4%. Целта на настоящото изследване е да установим заразността с HBV и HCV при пациенти с различни видове Неходжкинов лимфом. Анализирани са 466

пациенти с клинична и лабораторна диагноза Неходжкинов лимфом, изследвани за HBsAg. От тях 462-ма са изследвани за anti-HCV в Лаборатория Вирусология на УМБАЛ „Св. Марина“, Варна. За носителство на anti-Hbc total Ab са изследвани общо 60 лица, като 10 от тях са HBsAg позитивни. Използвани са стандартизирани търговски ELISA тестове. Относителният дял на anti-HCV положителните пациенти с Неходжкинов лимфом е 1.7% (95% CI:0.8-3.4, n=8), докато носителите на HBsAg са сигнификантно повече - 8.2% (95% CI:5.8-11.0, n=38) ( $p < 0.05$ ). От отрицателните HBsAg пациенти, 50 са изследвани в теста за определяне на anti-Hbc total. Положителни резултати открихме в 46.0% (95% CI:31.8-60.7, n=23) от случаите. Установихме по-висока от средната за региона и страната честота на HBsAg и anti-HCV позитивност при пациентите с Неходжкинови лимфоми. Нашите данни показват по-висока честота на разпространение на HBV при тази група пациенти, в сравнение с HCV.

**13. Kostadinova Ts, Ivanova L, Stoykova Zh, Tsaneva-Damyanova D. Investigation of anti-EA (D) IgG in patients with haematological diseases. Acta Microbiologica Bulgarica. 2018 Volume 34 (4): 232-235.**

Epstein-Barr virus is associated with a wide range of clinically relevant diseases - from infectious mononucleosis to malignant diseases of epithelial and lymphoid origin. The use of serological markers, such as predictors of malignant disease or the detection of viral reactivation, are debatable and unsupported by many studies. The purpose of this study is to establish positivity in the anti-EA (D) IgG test in patients with haematological diseases as a possible marker for viral reactivation. We examined 91 patients with haematological diseases (acute leukemias and non-Hodgkin 's lymphomas, including chronic lymphocytic leukemia), of which 54.9% (95% CI: 44.2-65.2) were male. The age range was from 1 to 83 years, with predominance of older patients. Patients were tested for anti-EA (D) IgG with tests of Euroimmun, Germany. The patients positive for anti-EA (D) IgG were also tested for EBV-DNA. We found 13.2% (95% CI: 6.2 -20.1, n = 12) positive for anti-EA (D) IgG. Patients with non-Hodgkin lymphomas predominated (23.1% 95%CI: 11.1-39.3, n=9). Two of the patients were in a gray zone. All positive patients were over 60 years of age. The positive anti-EA (D) IgG samples represent a small proportion of the investigated patients with predominance in those with non-Hodgkin's lymphomas. Based on our previous experience and the

results of this study, we consider that the use of anti-EA (D) IgG are not sufficiently reliable in defining EBV reactivation in these patients.

Epstein-Barr вирусът се асоциира със широк спектър от клинично значими заболявания – от добокачествено протичаща инфекциозна мононуклеоза до малигнени заболявания от епителен и лимфоиден произход. Използване на серологични маркери, като предиктори на малигнено заболяване или за установяване на вирусна реактивация са дискутабилни и неподкрепени с много проучвания. Целта на това проучване е да установим позитивност в anti-EA (D) IgG теста при пациенти с хематологични заболявания, като евентуален маркер за вирусна реактивация. Изследвахме 91 пациенти с хематологични заболявания (остри левкемии и неходжкинови лимфоми, вкл. хронична лимфоцитна левкемия), от които 54.9% (95%CI:44.2-65.4) мъже. Възрастовият диапазон е 1 г. - 83 г., с преобладаване на по-възрастните пациенти. Пациентите са изследвани за anti-EA (D) IgG с тестове на Euroimmun, Germany. Позитивните anti-EA (D) IgG пациенти бяха тествани сравнително за определяне на EBV-DNA. Нашите данни показват 13.2% (95%CI:6.2-20.1, n=12) положителни за anti-EA (D) IgG, с преобладаване на пациентите с Неходжкинови лимфоми (23.1%; 95%CI:11.1-39.3, n=9). При двама от пациентите резултатите са в сива зона. Всички положителни пациенти са във възраст над 60 г. Положителните анти-EA (D) IgG проби представляват малка част от изследваните пациенти. Преобладават случаите с неходжкинови лимфоми. Въз основа на предишния ни опит и резултатите от това проучване считаме, че използването на анти-EA (D) IgG, не е достатъчно надеждно за установяване на EBV реактивация при тази група пациенти.

**14. Zhivka Stoykova, Tsvetelina Kostadinova, Denitsa Tsaneva-Damyanova, Liliya Ivanova. BKV - a Challenge for Post-Transplant Patients. Acta Microbiologica Bulgarica. 2019 Volume 35 (4): 172-175.**

BKV infection is widespread as early as infancy and early adolescence. The virus remains persistent at low levels in many tissues of the human body, in particular the urogenital tract. Reactivation and/or reinfection from donors in the post-transplant period may result in severe disease, including BKV-associated nephropathy and graft rejection. The aim of this study is to determine the percentage involvement of BKV in morbidity after kidney transplantation and after

allogeneic stem cell transplantation. Eighty-seven studies were performed in a total of 37 post-transplant patients (out of which 59.4% were women) with a mean age of 42.2 years (SD  $\pm$  10.6, range 26-70 years). Thirty-three patients after renal transplantation were screened for reactivation (89.2%, CI: 79.2% to 99.2%) in serum, and 4 patients (10.8%; CI: 0.8% to 20.8%) after allogeneic stem cell transplantation in urine samples when clinical evidence of haematuria was present. We used quantitative BKV PCR test kit Anatolia Geneworks, Istanbul, Turkey. We obtained a positive result in 1 patient after renal transplantation (3.03%) and in 3 patients (75%) after allogeneic stem cell transplantation and haematuria. Our data indicate that BKV is involved in morbidity after transplantation. In order to determine the most appropriate PCR sample material (serum, plasma or urine), all three should be tested simultaneously.

ВКV инфекцията е широко разпространена още в детска и ранна юношеска възраст. Вирусът остава да персистира в ниски нива в много тъкани на човешкия организъм, в частност урогениталния тракт. Реактивация и/или реинфекция от донора при пациенти след трансплантация на органи или тъкани може да доведе до тежко заболяване, включително ВКV-асоциирана нефропатия и отхвърляне на присадката. Целта на настоящото проучване е да се определи относителния дял на участие на ВКV в заболяемостта след трансплантация на бъбрек и след алогенна трансплантация на стволови клетки. Проведени са 87 изследвания на 37 пациенти след трансплантация, на средна възраст 42.2 г. (SD  $\pm$  10.6; обхват 26-70 г.). Скринирани са 33 пациенти след трансплантация на бъбрек (89.2%; CI:74.6%-97.0%) в клиничен материал серум/плазма и 4 пациенти след алогенна трансплантация на стволови клетки в материал урина и клинични данни за хематурия. Приложен е PCR тест на Anatolia, Geneworks. Положителен резултат е получен при 1 пациент след бъбречна трансплантация (3.03%) и при 3 (75%) от пациентите след алогенна трансплантация на стволови клетки и хематурия. Нашите предварителни данни показват, че ВКV участва в заболяемостта след трансплантация на органи или тъкани. За определяне на най-подходящия материал за изследване в PCR е необходимо едновременно приложение на теста в серум/плазма и урина.

**Резюмета на научни трудове към точка Г8 от академичната справка:**

**1. Ivanova L, D Tsaneva, Zh Stoykova, Ts Kostadinova. Viral Diseases in Transplant and Immunocompromised Patients. In: Ed: Kr. Metodiev, Immunopathology and Immunomodulation, November, 18, 2015. InTech Croatia, ISBN 978-953-51-2210-4 under CC BY 3.0 license; pp 101-126. Open Access Publisher, Chapter 6.L**

For the last few years, the number of immunocompromised individuals is growing fast, due to more intensive antitumor therapy, transplantations and the concomitant immunosuppressive therapy, and the HIV epidemic, as well. Immunosuppressed patients very often are affected with nosocomial infections in hospitals, and with infections in the society. The defense from viral diseases depends mainly on the immune system. When there is immune deficiency, the illness is taking severely longer and has complicated outcome. Usually immunocompromised individuals have one or more defects in the defensive mechanisms and leading cause of death is infection. The viruses taking part in this process are Epstein Barr virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Herpes simplex viruses (HSV1, HSV2), Varicella zoster virus (VZV), Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), and Human Polyomaviruses (BKV, JC). Many viruses (HIV, CMV, EBV) are depressing the immune resistance and are leading to co-infections with other microbial agents. Some viruses (HSV1/2, HPV, CMV, EBV, BKV, JC) are at latent condition in the infected persons for life. They become activated when decline in the immunity occurs, leading to serious illnesses. For this reason, accurate screening and prompt and precise diagnosis can be performed to prevent exacerbation of diseases and provide appropriate treatment.

През последните няколко години броят на имунокомпрометираните лица расте бързо, както поради по-интензивната противотуморна терапия, трансплантациите и съпътстващата имunosупресивна терапия, така и поради епидемията от ХИВ. Имуносупресивните пациенти много често са засегнати от нозокомиални инфекции в болниците и от инфекции в обществото. Защитата от вирусни заболявания зависи основно от имунната ни система. Когато има имуноен дефицит, заболяването е много по-дълго и има усложнен изход. Обикновено имунокомпрометираните индивиди имат един или повече дефекти в защитните механизми и водещата причина за смъртта е инфекцията. Вирусите, участващи в този процес, са Epstein Barr virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), Herpes simplex viruses (HSV1, HSV2), Varicella зостер вирус (VZV), вирус на хепатит В (HBV), вирус на хепатит С (HCV) и човешки полиомавируси (BKV, JC). Много вируси (HIV, CMV, EBV) потискат имунната



резистентност и водят до коинфекции с други микробни агенти. Някои вируси (HSV1/2, HPV, CMV, EBV, ВКV, JC) са в латентно състояние в заразените хора за цял живот. Те се активират, когато настъпи спад в имунитета, което води до сериозни заболявания. Поради тази причина е необходим скрининг и бърза и прецизна диагностика, за да се предотврати клинично проявление на заболяванията и да се осигури подходящо лечение.

**Резюмета на научни трудове към показателя от академичната справка: Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници, извънминималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus).**

- 1. Zarina Brady & Zhivka Stoykova (2019) Hepatitis C virus genotype analysis in patients with chronic hepatitis in North Eastern Bulgaria, Journal of Drug Assessment, 8:1, 146-149, DOI: 10.1080/21556660.2019.1654484**

The main objective of this study was to analyse the spread of hepatitis C virus (HCV) genotype in patients with chronic liver disease; commenting on the molecular characterization of HCV and gender and age in Varna, Bulgaria. Across Europe and the world, HCV is a significant economic concern and public health crisis. Defined by genotype variations, HCV is the leading cause of chronic liver disease, liver related morbidity, and mortality worldwide. Active examination for asymptomatic patients is essential, initiating early treatment aimed at the specific HCV genotype, effective outcomes, and reducing transmission and mortality in Bulgaria. Methods and materials: Nucleic acid extraction and amplification were performed with commercially available test kits on 115 patients blood samples collected from March 2018 to October 2018. Male (n = 58) (50.43%, 95% CI = 41.29%–59.57%) and female (n = 57) (49.57%, 95% CI = 41.29%–59.57%) samples were equally distributed (mean age = 51.4 years; SD = ±16.5 years; range = 17–87 years old). Results: Genotype 1b predominated (73%, 95% CI = 64.89%–81.11%), followed by high prevalence of 1a (13.9%, 95% CI = 7.58%–20.22%) and 3 genotypes (11.3%, 95% CI = 5.51%–17.09%). Genotypes 2 and 4 were equally the least prevalent (0.9%, 95% CI = 0.83%–2.63%). In genotype 1b, 60.7% were women and 39.3% were men; in genotype 1a, 25% were women and 75% were men; and in genotype 3, only 7.7% were women and 92.3% were men. Males were most prevalent in genotypes 1a (75%) and 3 (92.3%), while women were most prevalent in genotype 1b

(60.7%). Conclusions: HCV genotype 1b is the predominant variant within the epidemiological pattern of HCV genotypes in patients with chronic liver diseases in North Eastern Bulgaria.

Основната цел на това проучване беше да се анализира разпространението на различните генотипове на вируса на хепатит С (HCV) при пациенти с хронично чернодробно заболяване; да се асоциира с пол и възраст във Варна, България. В цяла Европа и по света HCV е значителен икономически и здравен проблем. Генотипни вариации на HCV са водеща причина за хронично чернодробно заболяване, свързана с черния дроб заболяемост и смъртност в световен мащаб. Активното изследване на асимптоматични пациенти е от съществено значение за започване на ранно лечение, насочено към специфичния HCV генотип, ефективни резултати и намаляване на предаването на вируса в популацията и смъртността в България. Методи и материали: Извличането и амплификацията на нуклеинова киселина бяха извършени с търговски комплект за тестване на 115 кръвни проби на пациенти, събрани от март 2018 г. до октомври 2018 г. Мъжете ( $n = 58$ ) (50,43%, 95% CI = 41,29%–59,57%) и жените ( $n = 57$ ) (49,57%, 95% CI = 41,29%–59,57%) са равномерно разпределени (средна възраст = 51,4 години; SD =  $\pm 16,5$  години; диапазон 17–87 години). Резултати: Преобладава генотип 1b (73%, 95% CI = 64,89%–81,11%), следван от високо разпространение на генотип 1a (13,9%, 95% CI = 7,58%–20,22%) и генотип 3 (11,3%, 95% CI = 5,51%–17,09%). Генотипове 2 и 4 са еднакво най-слабо разпространени (0,9%, 95% CI = 0,83%–2,63%). В групата на генотип 1b 60,7% са жени и 39,3% са мъже; при генотип 1a 25% са жени и 75% са мъже; и в генотип 3 само 7,7% са жени и 92,3% са мъже. Мъжете са мнозинство в генотипове 1a (75%) и 3 (92,3%), докато жените са най-представени в генотип 1b (60,7%). Изводи: HCV генотип 1b е преобладаващият вариант в епидемиологичния модел на HCV генотипове при пациенти с хронични чернодробни заболявания в Североизточна България.

2023 г.

Д-р Живка Стойкова