**НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**

ДОЦ. Д-Р ИВА СТЕФАНОВА ХРИСТОВА, Д.М.

# ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА И РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ПРЕДАВАНИТЕ С КЪРЛЕЖИ И СРОДНИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ

**Професионално направление: Медицина**

**Научна специалност: Микробиология**

## А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

## НА Д И С Е Р Т А Ц И О Н Е Н Т Р У Д

***за присъждане на научната степен***

***„Доктор на медицинските науки“***

София, 2012

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ..... 2012 г. от ..... ч. в аулата на Национален Център по Заразни и Паразитни Болести, бул. „Я. Сакъзов“ №26, София на открито заседание на жури, назначено от директора на НЦЗПБ.

Материалите по защитата се намират на разположение на желаещите в библиотеката на НЦЗПБ, София.

# Съдържание

1. УВОД ..... 5

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА НАУЧНАТА РАБОТА ..... 6

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ..... 8

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ ..... 10

РАЗДЕЛ ПРЕДАВАНИ С КЪРЛЕЖИ БАКТЕРИАЛНИ ИНФЕКЦИИ: ЛАЙМСКА БОРЕЛИОЗА, АНАПЛАЗМОЗА, МАРСИЛСКА ТРЕСКА, ТУЛАРЕМИЯ ..... 10

I. ЛАЙМСКА БОРЕЛИОЗА ..... 10

1. Разработване на PCR системи за доказване на *B. burgdorferi.* Специфичност и чувствителност на използваните праймерни системи за амплификация ..... 10
2. Изследване на кърлежи ..... 12
3. Изследване на гризачи ..... 20
4. Изследване на пациенти ..... 22

II. ЧОВЕШКА ГРАНУЛОЦИТНА АНАПЛАЗМОЗА ..... 38

1. Разработване на PCR системи за откриване на *A. phagocytophilum* ..... 38
2. Изследване на кърлежи ..... 38
3. Изследване на гризачи ..... 44
4. Изследване на пациенти ..... 46

III. ТУЛАРЕМИЯ ..... 51

1. Оптимизиране и въвеждане на PCR системи за откриване на *F. tularenisis* ..... 51
2. Изследване на кърлежи ..... 51
3. Изследване на гризачи ..... 52

IV. РИКЕТСИОЗИ ..... 54

1. Разработване на PCR системи за откриване на рикетсии от групата на петнистите трески ..... 55
2. Изследване на кърлежи ..... 55
3. Изследване на гризачи ..... 58
4. Изследване на пациенти ..... 59

V. КОИНФЕКЦИИ ..... 60

1. Коинфекции при кърлежи ..... 60
2. Коинфекции при гризачи ..... 62
3. Коинфекции при пациенти ..... 63

РАЗДЕЛ ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ: ККХТ, ХТБС и КЕ ..... 65

I. КРИМСКА КОНГО ХЕМОРАГИЧНА ТРЕСКА ..... 65

1. Разработване на RT-PCR системи за откриване на вируса на ККХТ ..... 65
2. Генетична характеристика на ККХТ вирусите, циркулиращи в България ..... 70
3. Проучвания върху антитяло отговора срещу българската ККХТ ваксина ..... 76
4. Проучвания върху разпространението на вируса на ККХТ сред домашни животни в ендемично огнище ..... 79
5. Проучвания върху разпространението на вируса на ККХТ сред хората в България ..... 80

II. ХАНТАВИРУСИ ..... 82

1. Оптимизиране на серологичната диагностика на хантавирусните инфекции в България ..... 82
2. Разработване на RT-PCR системи за откриване на хантавируси ..... 84
3. Проучвания върху гризачи ..... 87
4. Генетична характеристика на хантавируси добрава, циркулиращи в България ..... 89

III. КЪРЛЕЖОВ ЕНЦЕФАЛИТ ..... 91

1. Разработване на Real-time RT-PCR за откриване на вируса на кърлежовия енцефалит ..... 91
2. Оптимизиране на серологичната диагностика и проучвания върху разпространението на кърлежовия енцефалит в България ..... 92
3. Проучвания върху пациенти с неясен фебрилен синдром ..... 93

5. РЕЗЮМЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ. ИЗВОДИ ..... 95

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ. ПРИНОСИ ..... 98

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ..... 105

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ ..... 108

# 1. УВОД

Предаваните с кърлежи инфекции продължават да заемат значителен дял в човешката патология. Това са заболявания с природна огнищност, които не могат да бъдат изкоренени. Напротив, наблюдава се тенденция към нарастване на заболяемостта и разширяване ареала на разпространението им, което до някъде е свързано с непрекъснато подобряващите се възможности за диагностика, но като цяло отразява промените в природо-географските и климатичните фактори, както и засилената миграция на хора и животни. Не случайно предаваните с кърлежи инфекции са сред основните направления, на които специално внимание обръщат ECDC, CDC и СЗО.

Предаваните с кърлежи патогени водят до тежки инфекции, някои от които протичат остро с висока температура и полиорганно засягане (Марсилска треска, Ку-треска, човешка гранулоцитна анаплазмоза, кърлежов енцефалит), други се характеризират с хеморагична диатеза и висока смъртност (Кримска Конго хеморагична треска, ККХТ), а трети са с тенденция към хронифициране и трайно инвалидизиране (Лаймска борелиоза). Хеморагичната треска с бъбречен синдром (ХТБС) се предава чрез гризачи, без участието на кърлежи, но причиняващите я хантавируси, родствени с найровирусите, причиняващи ККХТ, по традиция също се отнасят към групата на арбовирусите.

За лабораторно потвърждение на диагнозата е необходимо доказване на причинителя в клинични материали и/или доказване на специфичен имунен отговор срещу него в серум или ликвор от болния. Ранната диагностика е от решаващо значение за терапевтично повлияване и предотвратяване прогресирането на болестта, което е от съществено значение при тези тежки застрашаващи живота инфекции. Диагностиката на предаваните с кърлежи инфекции се нуждае от разработване и въвеждане на съвременни надеждни молекулярно-генетични методи за доказване на причинителите в клинични материали, както и от въвеждане на съвременни имунологични методи за ефективно доказване на специфичния антитяло отговор при пациентите в съвсем ранната фаза на болестта. Необходими са проучвания върху заразеността на векторите и резервоарите на предаваните с кърлежи инфекции, за да се уточнят рисковете от заразяване на хората и да се предприемат мерки за успешен контрол и ограничаване на разпространението им.

# 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА НАУЧНАТА РАБОТА

**ЦЕЛ: Апробиране и оптимизиране на съвременни диагностични методи и разширяване на диагностичните възможности при предаваните с кърлежи и сродни инфекции с оглед бърза и прецизна етиологична диагностика и провеждане на еколого-епидемиологични и молекулярно-генетични проучвания на тези инфекции.**

**За постигане на тази цел решавахме следните ЗАДАЧИ:**

1. **Разработване на нови подходи за серологична и молекулярно-генетична диагностика на Лаймската борелиоза и проучвания върху нейните резервоари и вектори в България**

- Въвеждане на генетични методи за етиологична диагностика
- Разработване на ново поколение тестове за серологична диагностика с рекомбинантни *B. burgdorferi* протеини
- Проучвания върху участието на отделните *B. burgdorferi* протеини в имунния отговор на организма
- Проучвания върху използването на пептидни антигени от С6 пептида на VlsE антигена
- Изясняване на диагностичните възможности на различните групи методи
- Уточняване на векторите и резервоарите на инфекцията у нас

2. **Разработване и въвеждане на методи за диагностика на човешката гранулоцитна анаплазмоза, клинико-лабораторни и еколого-епидемиологични проучвания**

- Разработване на генетични методи за етиологична диагностика
- Въвеждане на серологична диагностика на анаплазмозата у нас
- Проучвания върху хуморалния имунен отговор
- Изясняване на клиничните симптоми и лабораторните находки при болни с анаплазмоза
- Проучвания върху потенциалните вектори и резервоари

3. **Въвеждане и преценка на методи за откриване на *F. tularensis* в кърлежи и гризачи**

- Въвеждане на генетични методи за откриване на *F. tularensis* в кърлежи и гризачи
- Изясняване ролята на различни видове кърлежи като вектори чрез проучване на заразеността им с *F. tularensis*
- Серологични и генетични проучвания върху различни видове гризачи за уточняване ролята им като резервоари на инфекцията

4. **Разработване и въвеждане на методи за откриване на рикетсии от групата на петнистите трески**

- Разработване на генетични методи за доказване на рикетсии от групата на петнистите трески в кърлежи и гризачи
- Изясняване на основните и потенциалните вектори и резервоари на рикетсиозите у нас
- Проучвания върху участието на Марсилската треска в етиологичната структура на неясните фебрилни синдроми в България

5. **Установяване на коинфекции с предавани с кърлежи патогени**

- Проучвания върху коинфекциите в кърлежи
- Изясняване коинфекциите при гризачи
- Изследвания върху коинфекциите при пациенти

6. **Разработване и въвеждане на методи за откриване на вируса на Кримската Конго хеморагична треска и проучвания върху генетичните харастеристики на вируса на ККХТ и разпространението на инфекцията в България**

- Разработване и усъвършенстване на едностъпкови, nested и Real time RT-PCR системи за откриване на вируса на ККХТ
- Изследване на генетичните характеристики на ККХТ вирусите, циркулиращи в България
- Проучвания върху разпространението на ККХТ вируса сред хората и домашните животни
- Изследване на хуморалния имунен отговор след прилагане на българската ККХТ ваксина

7. **Разработване на методи за откриване на хантавируси и оптимизиране диагностиката на хантавирусните инфекции у нас**

- Апробиране на нови методи за серологичната диагностика
- Разработване на едностъпкови, nested и Real time RT-PCR системи за откриване на хантавируси
- Изследване на генетичните характеристики на хантавируси, циркулиращи в България
- Проучвания върху разпространението на хантавируси сред гризачите

8. **Разработване и въвеждане на методи за етиологична диагностика на кърлежовия енцефалит**

- Разработване и усъвършенстване на RT-PCR системи за откриване на вируса на кърлежовия енцефалит
- Оптимизиране на серологичната диагностика
- Проучвания върху разпространението на инфекцията сред пациентите с неясен фебрилен синдром в България

# 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

**МАТЕРИАЛИ**

3.1. Кърлежи

3.2. Гризачи

3.3. Пациенти
- 3.3.1. Лаймска болест
- 3.3.2. Човешка гранулоцитна анаплазмоза
- 3.3.3. Кримска-Конго хеморагична треска, хеморагична треска с бъбречен синдром, кърлежов енцефалит

3.4. Контролни бактериални ДНК и вирусни РНК

3.5. Търговски набори (китове)
- 3.5.1. За екстракция на ДНК от тъкани на гризачи, от кръв, серум и урина на пациенти.
- 3.5.2. За амплификация
- 3.5.3. За пречистване на PCR продукти от агарозен гел
- 3.5.4. За клониране на PCR продукти във вектори
- 3.5.5. За екстракция на РНК
- 3.5.6. За синтез на комплементарна ДНК от екстрахирана РНК
- 3.5.7. За обратна транскрипция
- 3.5.8. ELISA китове

**МЕТОДИ**

3.6. Събиране и определяне на кърлежи

3.7. Събиране и определяне на гризачи

3.8. Изследване на кърлежи в тъмно зрително поле

3.9. Екстракция на ДНК/РНК
- 3.9.1. Екстракция на ДНК/РНК от кърлежи
- 3.9.2. ДНК екстракция от органи на гризачи
- 3.9.3. Екстракции на ДНК/РНК от клинични материали
- 3.9.4. Екстракция на тотална ДНК от *Borrelia burgdorferi*
- 3.9.5. Екстракция на плазмидна ДНК от *E.coli*

3.10. Количествена и качествена оценка на екстрахираните ДНК/РНК

3.11. Полимеразна верижна реакция (PCR)

3.12. Обратна блот-хибридизация (Reverse line blot hybridization)

3.13. Клониране на PCR продуктите и секвениране на ДНК

3.14. Амплификация на ДНК и откриване на продукта с моноклонално антитяло
3.15. Конструиране на рекомбинантни плазмиди
3.16. Трансформация на рекомбинантните вектори в химиокомпетентни клетки
3.17. Анализ на получените трансформанти и селекция на положителни клонове
3.18. Пречистване на рекомбинантните протеини
3.19. SDS-Полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)
3.20. Доказване на рекомбинантните протеини с Уестърн блот
3.21. Синтез на комплементарна ДНК (cDNA) и обратно транскриптазна полимеразно-верижна реакция (RT-PCR)
3.22. RT-PCR в реално време (real-time RT-PCR)
SYBR® Green real-time RT-PCR
TaqMan real time RT-PCR
3.23. Секвениране и филогенетичен анализ
3.24. Серологични реакции

**Реакция степенна аглутинация с туларемиен антиген при гризачи**
ELISA за *B. burgdorferi* sensu lato при гризачи
ELISA за *A. phagocytophilum* при гризачи
ELISA за Лаймска болест при пациенти
Home-made ELISA тестове с рекомбинантни протеини
Home-made ELISA тестове с различни генотипове OspC
Home-made пептидни ELISA тестове
ELISA за гранулоцитна анаплазмоза при пациенти.
Реакция свързване на комплемента (РСК)
ELISA за Кримска Конго хеморагична треска
ELISA и имуноблот за доказване на антитела срещу хантавируси
ELISA за кърлежов енцефалит
ELISA за Марсилска треска
ELISA за Ку-треска
3.25. Статистически методи

# 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Необходимостта от проучване на векторите и резервоарите на предаваните с кърлежи инфекции ни доведе до необходимостта от разработване, оптимизиране и въвеждане на надеждни методи за откриване на предаваните с кърлежи патогени. Така при изследването на кърлежи обогатихме микроскопирането с въвеждане на полимеразна верижна реакция (PCR), при изследването на гризачи разработихме PCR за доказване на патогените в тъканите им и имуноензимни тестове (ELISA) за откриване на специфичните антитела в кръвта им, при изследването на хора оптимизирахме и въведохме PCR тестове за доказване на патогените в кръвта им и обогатихме използваната реакция за свързване на комплемента с чувствителните ELISA тестове при доказване на вирусните инфекции.

## РАЗДЕЛ ПРЕДАВАНИ С КЪРЛЕЖИ БАКТЕРИАЛНИ ИНФЕКЦИИ: ЛАЙМСКА БОРЕЛИОЗА, АНАПЛАЗМОЗА, МАРСИЛСКА ТРЕСКА, ТУЛАРЕМИЯ

### I. ЛАЙМСКА БОРЕЛИОЗА

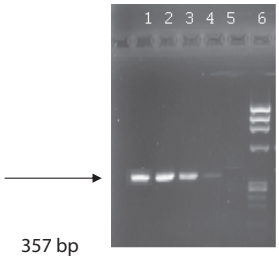
#### 1. Разработване на PCR системи за доказване на *B. burgdorferi.* Специфичност и чувствителност на използваните праймерни системи за амплификация.

Разработени бяха PCR системи за доказване гена за 16S рРНК и гена за флагелина (ресните) на борелии от комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato, както и на трите основни вида борелии, причиняващи Лаймска болест в Европа: *B. garinii*, *B. afzelii* и *B. burgdorferi* sensu stricto.

Специфичността на разработените праймерни системи беше тествана при амплификация с ДНК от различни бактериални и гъбични видове, както и с човешка ДНК по протоколите, съответстващи на всяка от праймерните двойки. Кръстосана (неспецифична) амплификация не беше наблюдавана.

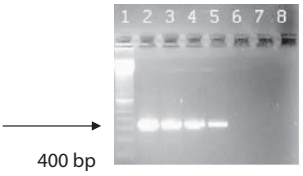
Праймерните системи бяха контролирани и по отношение на тяхната чувствителност с 10-кратни серийни разреждания на ДНК от съответния вид *B. burgdorferi*.

Най-малкото количество ДНК от *Borrelia burgdorferi* sensu lato, което беше възможно да се амплифицира с праймерите LD, разпознаващи гена за 16S рРНК и с праймерите BBSCH31/BBSCH2, разпознаващи гена за флагелина, беше 10 pg (фиг.1–2).




1 – 10 ng
2 – 1 ng
3 – 100 pg
4 – 10 pg
5 – 1 pg
6 – Молекулярен маркер ФХ 174–RF-DNA, Amersham pharmacia biotech

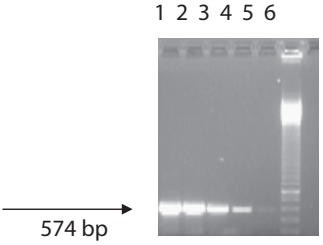
**Фиг. 1.** Амплификация на различно количество ДНК от *B. burgdorferi* sensu lato с праймерите LD, разпознаващи гена за 16S рРНК




1 – Молекулярен маркер 100 bp Ladder, Amersham Bioscienses
2 – 10 ng
3 – 1 ng
4 – 100 pg
5 – 10 pg
6 – 1 pg
7 – 100 fg

**Фиг. 2.** Амплификация на различно количество ДНК от *B. burgdorferi* sensu lato, с праймерите BBSCH31/ BBSCH2, разпознаващи гена за флагелина

Също 10 pg беше минималното количество ДНК, съответно от *B. burgdorferi* s.s. и *B. garinii*, което беше възможно да се амплифицира с праймерите, разпознаващи специфични участъци в гена за 16S рРНК на двата вида борелии: BB1/BB2 и BG1/BG2. При *B. afzelii* най-малкото количество ДНК, което беше възможно да се амплифицира с праймерите BA1/ BA2 беше 1 pg (фиг.3).




1 – 10 ng
2 – 1 ng
3 – 100 pg
4 – 10 pg
5 – 1 pg
6 – Молекулярен маркер 100 bp Ladder, Amersham Bioscienses

**Фиг. 3.** Амплификация на различно количество ДНК от *Borrelia afzelii*, с праймерите BA1/ BA2, разпознаващи гена за 16S рРНК

## 2. Изследване на кърлежи

Разработването и въвеждането на специфични PCR тестове позволи провеждането на проучвания върху инфекциите и коинфекциите на кърлежите с различни бактериални видове, да се установи зависимостта от географския фактор и динамиката през годините.

**Първите проучвания в страната** за заразеност на кърлежи с борелии с помощта на PCR направихме през 2000 г. Общо 202 кърлежа *I. ricinus*, събрани от парк „Борисова градина" в София, бяха изследвани с PCR за носителство на борелии и анаплазми. Възрастните екземпляри (62 женски и 50 мъжки) бяха изследвани индивидуално, а нимфите (90 броя) в пулове по 5 броя.

За амплифициране на ДНК от *B. burgdorferi* беше приложена PCR реакция със специфични праймери за откриване гена за флагелина на борелиите от комплекса *B. burgdorferi* sensu lato – BBSCH31/BBSCH2. Разпределението на заразените кърлежи по пол и стадий на развитие е отразено в табл. 1. Общо в 36 (32,1%) от 112 възрастни кърлежи бяха доказани *B. burgdorferi*. При нимфите, от 18–те пула на 90 нимфи, 9 (10%) бяха заразени с представители на комплекса *B. burgdorferi* sensu lato. Средната заразеност на изследваните кърлежи с борелии беше 22,3% (Табл.1).

**Таблица 1**. Резултати от *fla* PCR амплификацията за доказване на *B. burgdorferi* s.l. ДНК в кърлежи *I. ricinus*

| Пол и стадий | Общо | Брой (%) инфектирани кърлежи с *B. burgdorferi* s.l. |
|---|---|---|
| Женски | 62 | 20 (32.3) |
| Мъжки | 50 | 16 (32) |
| Общо възрастни | 112 | 36 (32.1) |
| Нимфи | 90 (18 пула) | 9 (10) |
| ОБЩО | 202 | 45 (22.3) |

Посредством обратна блот-хибридизация с видово-специфични сонди определихме вида на инфектиращите борелии. Най-често доказвана беше *B. afzelii*, при това със значително по-висока честота (17%) в сравнение със следващите я *B. burgdorferi* sensu stricto (5,4%) и *B. garinii* (1,8%). Доказано беше носителство в кърлежите и на *B. valaisiana* (1,8%) и *B. lusitaniae* (0,9%) (Табл. 2).

Интересен факт, който установихме, беше коинфекция на *B. valaisiana* предимно с *B. afzelii* и на *B. lusitaniae* предимно с *B. garinii*. Общо при 5 (4,5%) от изследваните възрастни форми на кърлежите бяха наблюдавани инфекции с два различни вида борелии, а при един от тях (0,9%) беше доказана и тройна инфекция *B. valaisiana/ B. afzelii/ B. burgdorferi* s. s.

**Таблица 2**. Доказване на основните видове борелии от комплекса *B. burgdorferi* sensu lato в кърлежите *Ixodes ricinus* с обратна блот-хибридизация

| *B. burgdorferi* s.l. видове | Брой инфектирани кърлежи нимфи | имаго | % инфектирани имаго форми |
|---|---|---|---|
| *B. afzelii* | 4 | 19 | 17.0% |
| *B. burgdorferi s.s.* | 1 | 6 | 5.4% |
| *B. garinii* | 5 | 2 | 1.8% |
| *B. valaisiana* | 0 | 2 | 1.8% |
| *B. lusitaniae* | 2 | 1 | 0.9% |
| *B. afzelii-like* | 1 | - | - |
| Двойни инфекции | 3 | 5 | 4.5% |
| Тройни инфекции | 1 | 1 | 0.9% |

Най-често разпространените видове борелии в Европа са *B. garinii* и *B. afzelii*, а *B. valaisiana* и *B. lusitaniae* са доказани в много малко страни. *B. lusitaniae* не беше доказвана в Източна Европа. Въобще данните за разпространението на причиняващите Лаймска болест борелии в Източна Европа бяха много ограничени.

**На следващия етап от проучването** бяха изследвани 96 иксодови кърлежи събрани от парк "Борисова градина" в София, но през 2001 г., с цел да се проследи заразеността на нашите кърлежи във времето. Изследвани бяха 48 женски имаго форми, 24 мъжки имаго форми и 24 броя нимфи. За разлика от предишното проучване, при което беше приложена PCR техника и блот-хибридизация (reverse line blot, RLB) само за потвърждение на положителните проби, при това проучване всички проби бяха изследвани с RLB. За сравнение, всички кърлежи, събрани през 2000 г. бяха повторно изследвани с RLB.

Повторното изследване на кърлежите от 2000 г. показа дори по-висока степен на заразеност с борелии, което е логично предвид по-високата чувствителност на приложения метод. Установи се, че 41% от имаго-формите и поне 10% от нимфите бяха заразени с борелии (Табл. 3). Доминиращият борелиен вид беше *B. afzelii*, която беше доказана при 23 % (26/112) от възрастните форми на кърлежите и 6% (5/18 пула) от нимфите, което съставляваше 57% (26/46) от всички инфектирани с борелии кърлежи. На второ място по честота беше *B. burgdorferi* s.s., открита при 13% (15/112) от възрастните кърлежи и в един от пуловете нимфи. *B. garinii* и *B. valaisiana* бяха доказани всяка при 5% от пробите, а *B. lusitanie* – при 1% от кърлежите. Около 6% от кърлежите бяха инфектирани с повече от един вид борелия (табл. 3).

По-ниска степен на заразеност с борелии беше установена при кърлежите от 2001 г. – 31% от възрастните кърлежи, а при нимфите не бяха открити заразени. *B. afzelii* отново беше доминиращият вид, открит при половината от всички съдържащи борелии кърлежи. (табл. 3).

**Таблица 3.** *Borrelia* в кърлежите *Ixodes ricinus* от България

| | 2000 | | | | 2001 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Женски | Мъжки | Общо имаго | Нимфи* | Женски | Мъжки | Общо имаго | Нимфи** |
| | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) |
| Общ брой кърлежи | 62 | 50 | 112 | 18 | 48 | 24 | 72 | 24 |
| *Borrelia* | 24 (39) | 22 (44) | 46 (41) | 9 (10) | 20 (42) | 2 (8) | 22 (31) | 0 (0) |
| *B. burgdorferi* sensu stricto | 6 | 9 | 15 | 1 | | | | |
| B. afzelii | 15 | 11 | 26 | 5 | 9 | 2 | 11 | |
| B. garinii | 3 | | 3 | 6 | 5 | | 5 | |
| B. valaisiana | 1 | 2 | 3 | | 5 | | 5 | |
| B. lusitaniae | 1 | | 1 | 2 | | | | |
| неопределени | 3 | 3 | 6 | | 2 | | 2 | |
| Двойна инфекция с борелии | 5 | 2 | 7 | 4 | 1 | | 1 | |

*18 пула по 5 нимфи, ** индивидуално изследвани нимфи

Интерес представлява фактът, че *B. afzelii* е силно доминиращият вид борелии в нашите кърлежи, а в същото време клиничните прояви, свързани с този вид борелии (хроничният атрофичен акродерматит) отсъстват, като са налице предимно свързаните с *B. garinii* прояви (невроборелиоза). В кожните биопсии на пациенти с ранна Лаймска борелиоза се доказва предимно *B. afzelii.* За сега липсва обяснение на този феномен. Според нас, напълно възможно е, *B. afzelii* да причинява по-често ранна Лаймска борелиоза, която да се самоограничава, а *B. garinii* да притежава по-голям патогенетичен потенциал, изявен като повишена способност да персистира в организма и да води до усложнения.

**Следващите проучвания** бяха проведени върху много по-голям брой кърлежи, събрани от различни региони на страната в следващите 4 последователни години.

С помощта на PCR бяха изследвани поединично за заразеност с *B. burgdorferi* общо 1265 кърлежа, събрани за периода 2003 – 2006 г. от цялата страна. До момента у нас нямаше други данни за заразеността на иксодовите кърлежи от различните райони на страната.

С цел изясняване механизмите на предаване на *B. burgdorferi* в кърлежите, бяха събрани и изследвани кърлежи от различни жизнени стадии и пол. Резултатите от PCR-изследването за региона на град София (2003 г. – 2006 г.) показаха най-висока степен на заразеност с причинителя на Лаймската болест сред женските кърлежи (6,98–33,33%), следвани от мъжките (5,71–28,00%), нимфите (3,85–25,00%) и ларвите (1,85–9,09%) (Табл. 4).

**Таблица 4.** Резултати от PCR изследването на кърлежите от региона на град София

| Брой (%) заразени кърлежи *I. ricinus* с *B. burgdorferi* sensu lato | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Година | Женски | Мъжки | Общо (имаго) | Нимфи | Ларви | Общо кърлежи |
| 2003 | 13/39 (33,33) | 7/25 (28,00) | 20/64 (31,25) | 8/32 (25,00) | 2/22 (9,09) | 30/118 (25,42) |
| 2004 | 4/46 (8,70) | 2/24 (8,33) | 6/70 (8,57) | 1/13 (7,69) | 1/28 (3,57) | 8/111 (7,21) |
| 2005 | 4/52 (7,69) | 2/35 (5,71) | 6/87 (6,90) | 2/38 (5,26) | 1/54 (1,85) | 9/179 (5,03) |
| 2006 | 3/43 (6,98) | 2/32 (6,25) | 5/75 (6,67) | 1/26 (3,85) | 1/46 (2,17) | 7/147 (4,76) |
| Общо | 24/180 (13,13) | 13/116 (11,21) | 37/296 (12,50) | 12/109 (11,01) | 5/150 (3,33) | 54/555 (9,73) |

Проверката на статистическата значимост на заразеността на кърлежите показа, че съществуват статистически значими различия в заразеността с причинителя на Лаймската борелиоза между 2003 г. и 2004–2006 г. ($p \leq 0,05$) (Табл. 4).

Наличието на *B. burgdorferi* ДНК в ненапити нимфи, мъжки и женски имаго форми, потвърждава функционирането на *трансфазален* механизъм на трансмисия. Ненапитите екземпляри могат да съдържат *B. burgdorferi,* само ако са я придобили през предходния стадий на развитие, тъй като при иксодовите кърлежи кръвосмучането е еднократно, след което настъпва линеене и преминаване към следващия стадий.

Откриването на борелии в ненапити ларви демонстрира функционирането на *трансоварuален* път на предаване на борелиите от овариите на заразена женска към поколението. За определяне на географското разпространение бяха изследвани и кърлежи, събрани в други 9 региона на България (Табл. 5).

**Таблица 5.** Резултати от PCR изследването на кърлежите от цялата страна за периода 2003–2006 г., разпределени по пол и стадий на развитие

| **Брой (%) заразени кърлежи с *B. burgdorferi* sensu lato** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Регион | Година | Женски | Мъжки | Общо (имаго) | Нимфи | Общо кърлежи |
| ДОБРИЧ | 2005 | 1/38 (2,63) | 0/3 | 1/41 (2,44) | 1/20 (5,00) | 2/61 (3,28) |
| | 2006 | 1/35 (2,86) | 0/1 | 1/36 (2,78) | 2/24 (8,33) | 3/60 (5,00) |
| | Общо | 2/73 (2,74) | 0/4 | 2/77 (2,60) | 3/44 (6,82) | 5/121 (4,13) |
| СТАРА ЗАГОРА | 2005 | 2/45 (4,44) | 3/91 (3,30) | 5/136 (3,68) | - | 5/136 (3,68) |
| | 2006 | 2/35 (5,71) | 2/40 (5,00) | 4/75 (5,33) | - | 4/75 (5,33) |
| | Общо | 4/80 (5,00) | 5/131 (3,82) | 9/211 (4,27) | - | 9/211 (4,27) |
| ХАСКОВО | 2005 | 1/50 (2,00) | 0/17 | 1/67 (1,49) | - | 1/67 (1,49) |
| | 2006 | 1/15 (6,67) | 0/15 | 1/30 (3,33) | - | 1/30 (3,33) |
| | Общо | 2/65 (3,08) | 0/32 | 2/97 (2,06) | - | 2/97 (2,06) |
| ВАРНА | 2005 | 2/52 (3,85) | 0/16 | 2/68 (2,94) | - | 2/68 (2,94) |
| МОНТАНА | 2005 | 1/20 (5,00) | 0/8 | 1/28 (3,57) | - | 1/28 (3,57) |
| РУСЕ | 2005 | 2/44 (4,55) | 0/8 | 2/52 (3,85) | - | 2/52 (3,85) |
| ПЛОВДИВ | 2005 | 1/12 (8,33) | 1/21 (4,76) | 2/33 (6,06) | 1/18 | 3/51 (5,88) |
| СЛИВЕН | 2005 | 0/36 | - | 0/36 | - | 0/36 |
| СЛИВНИЦА | 2005 | 1/16 (6,25) | 0/30 | 1/46 (2,17) | - | 1/46 (2,17) |

Интересни находки при тези изследвания са доказването на борелии не само в основния вектор, *I. ricinus*, но и в кърлежи от видовете *R. bursa*, *D. marginatus* и *H. punctata* (Табл. 6). Това показа, че тези видове могат да играят ролята на потенциални вектори с второстепенно значение в трансмисионната динамика на това заболяване.

**Таблица 6.** Резултати от PCR изследването на кърлежите от цялата страна за периода 2003–2006 г., разпределени по вид

| **Брой (%) заразени кърлежи с *B. burgdorferi* sensu lato** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Регион** | **Година** | ***I. ricinus*** | ***R. bursa*** | ***D. marginatus*** | ***H. plumbeum*** | ***H. punctata*** |
| ДОБРИЧ | 2005 | 1/41 (2,44) | - | - | - | - |
| | 2006 | 1/36 (2,78) | - | - | - | - |
| | Общо | 2/77 (2,60) | - | - | - | - |
| СТАРА ЗАГОРА | 2005 | 0/2 | 5/125 (4,00) | 0/1 | 0/8 | - |
| | 2006 | 1/6 | 2/49 (4,08) | 1/13 (7,69) | 0/7 | - |
| | Общо | 1/8 | 7/174 (4,02) | 1/14 (7,14) | 0/15 | - |
| ХАСКОВО | 2005 | 1/21 (4,76) | 0/34 | - | 0/2 | 0/10 |
| | 2006 | 0/1 | 0/2 | - | 0/12 | 1/15 (6,67) |
| | Общо | 1/22 (4,55) | 0/36 | - | 0/4 | 1/25 (4,00) |
| ВАРНА | 2005 | - | 2/68 (2,94) | - | - | - |
| МОНТАНА | 2005 | 1/8 | - | 0/16 | - | 0/4 |
| РУСЕ | 2005 | 0/12 | 1/20 (5,00) | 1/16 (6,25) | - | 0/4 |
| ПЛОВДИВ | 2005 | 3/48 (6,25) | 0/3 | - | - | - |
| СЛИВЕН | 2005 | - | 0/24 | - | 0/12 | - |
| СЛИВНИЦА | 2005 | - | 0/10 | 1/36 (2,78) | - | - |

В Европа е установена средна стойност на заразеност на кърлежите *I. ricinus*, възлизаща на 14%. Наблюдавана е тенденция за нарастване на заразеността от западна към източна Европа.

На следващия етап от това проучване доказаната борелийна ДНК беше типизирана с видово-специфични праймери за определяне на вида борелия в рамките на комплекса *B. burgdorferi* sensu lato.

Сред кърлежите от региона на гр. София най-често срещаният вид беше *B. afzelii,* следван от *B. burgdorferi* s.s. и *B. garinii* (Табл. 7). Това разпределение се запази през четирите години на проучването.

**Таблица 7.** Резултати от типизиране чрез PCR на положителните за *B. burgdorferi* sensu lato кърлежи *I. ricinus* от региона на град София, 2003–2006 г.

| Типизиране чрез PCR на положителните за *B. burgdorferi* sensu lato кърлежи *I. ricinus* (брой положителни кърлежи / общ брой изследвани кърлежи) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2003–2006 | Женски | Мъжки | Общо имаго | Нимфи | Ларви | Общо кърлежи |
| *B. afzelii* | 12/24 | 5/13 | 17/37 | 6/12 | 4/5 | 27/54 |
| *B. burgdorferi* sensu stricto | 6/24 | 4/13 | 10/37 | 5/12 | 0 | 15/54 |
| *B. garinii* | 3/24 | 1/13 | 4 /37 | 1/12 | 1/5 | 6/54 |
| Неопределени до вид *B. burgdorferi* | 1/24 | 2/13 | 3/37 | 0 | 0 | 3/54 |
| Кърлежи, заразени с два вида борелии от комплекса *B. burgdorferi* s.l. | 2/24 | 1/13 | 3/37 | 0 | 0 | 3/54 |
| Общо *B. burgdorferi* sensu lato | 24 | 13 | 37 | 12 | 5 | 54 |

Тези данни показаха едно относително постоянство в циркулирането на видовете борелии, в подкрепа на което има публикувани данни – *B. afzelii* е доминиращ вид в страните от източна и централна Европа. Във Великобритания, Ирландия, централна и северна Германия, Австрия и Швейцария на първо място по честота излиза видът *B. garinii,* следван от *B. afzelii* и *B. burgdorferi* sensu stricto.

Проучването ни показа, че 3/37 (8,11%) от кърлежите (имаго формите) бяха заразени с два вида борелии, което показва възможността за трансмисия на повече от един вид борелия при едно единствено ухапване от кърлеж. В Европа в 13% от случаите са наблюдавани смесени инфекции на

различни видове борелии сред кърлежите, което добре корелира с получените от нас данни.

Резултатите от типизирането на PCR-положителните кърлежи от регионите на останалите 9 града на страната са отразени в Табл. 8. В някои от регионите бяха доказани само *B. afzelii* (Монтана, Варна, Хасково, Сливница), в други – *B. afzelii* и *B. garinii* (Русе, Пловдив, Добрич, Стара Загора), в трети – *B. afzelii, B. garinii* и *B. burgdorferi* s. s. (Стара Загора 2005 г.), в четвърти – на първо място излизаше *B. garinii,* следвана от *B. afzelii* и *B. burgdorferi* s. s. (Стара Загора, 2006 г).

**Таблица 8.** Резултати от типизиране чрез PCR на положителните за *B. burgdorferi* sensu lato кърлежи от страната, 2005–2006 г.

| Типизиране чрез PCR на положителните за *B. burgdorferi* sensu lato кърлежи *I. ricinus* Брой положителни/общ брой | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Регион | *B. afzelii* | *B. garinii* | *B. burgdorferi s.s.* | Общо |
| Добрич | 4/5 | 1/5 | - | 5 |
| Стара Загора | 4/9 | 3/9 | 2/9 | 9 |
| Хасково | 2/2 | - | - | 2 |
| Варна | 2/2 | - | - | 2 |
| Монтана | 1/1 | - | - | 1 |
| Русе | 1/ 2 | 1/ 2 | - | 2 |
| Пловдив | 2/3 | 1/3 | - | 3 |
| Сливница | 1/1 | - | - | 1 |
| ОБЩО | 17/25 | 6/25 | 2/25 | 25 |

Различни са климатичните фактори в отделните региони и различна беше видовата структура на изследваните кърлежи. Данните за превалирането на различните видове борелии има не само екологично и епидемиологично, но и важно клинично значение, тъй като всеки един от видовете се свързва с конкретна локализация на борелията след хематогенната дисеминация и съответна клинична симптоматика.

**Анализът на получените резултати навежда на следните изводи:**

1. Първите у нас проучвания върху заразеността на кърлежи с PCR доказаха наличието на трансфазален и трансовариален път на предаване на борелиите сред кърлежите. Установена беше най-висока степен на заразеност с борелии при имагото и по-точно на женските кърлежи, следвани от мъжките, нимфите и ларвите. Заразеността при ненапитите (гладни) ларви може да се обясни единствено с трансовариален път на трансмисия. Наличието на борелии в гладни нимфи и имаго форми, събрани от растителността, а не от животни, потвърди наличието на трансфазален път на предаване на борелиите в кърлежите.

2. Видът *B. afzelii* доминираше сред доказаните борелии в заразените кърлежи, следван от *B. burgdorferi* s.s. и *B. garinii*. Доказани бяха и двата по-редки патогенни вида борелии в Европа – *B. valaisiana* и *B. lusitaniae*, които не бяха установявани до момента в източна Европа.
3. Доминирането на *B. afzelii* в изследваните от нас кърлежи, както и в кожни биопсии от еритема мигранс лезии от една страна, както и установеното доминиране на невроборелиозата сред късните прояви на Лаймската болест в Европа, свързана с *B. garinii* от друга страна, ни позволява да изкажем хипотезата за по-високия патогенетичен потенциал на *B. garinii*. Възможно е инфекцията с *B. afzelii* по-често да се самоограничава и да остава безсимптомна, а макар и по-рядката инфекция с *B. garinii* да прогресира и да води до проявата на неврологични симптоми.
4. Доказани бяха коинфекции с два вида борелии. Установено беше по-честото комбиниране на *B. valaisiana* с *B. afzelii* и на *B. lusitaniae* с *B. garinii.*
5. Проследяването на заразеността на кърлежите от София в 4 последователни години (2003–2006 г.) показа снижение в заразеността с борелии през годините.
6. Първото у нас мащабно проучване върху заразеността на кърлежите от различни региони на страната показа максимална заразеност с борелии на кърлежите от София, Пловдив, Стара Загора, Хасково и Монтана, с динамика през годините и вариации между различните стадии и форми на кърлежите.
7. Доказването на борелии, макар и в нисък процент, в кърлежи от видовете *R. bursa*, *D. marginatus* и *H. punctata* подсказва възможността тези видове да играят ролята на потенциални вектори в предаването на инфекцията.

## 3. Изследване на гризачи

Общо 120 гризачи от видовете *R. rattus* (черен плъх), *R. norvegicus* (сив плъх), *M. musculus* (домашна мишка), *A. sylvaticus* (горска мишка) и *A. agrarius* (полска мишка) бяха изследвани за заразеност с причинителите на Лаймската борелиоза. Гризачите бяха уловени в регионите на 5 населени места на страната: Мещица, Перник, Добрич, Варна и Монтана.

**Серологично изследване**

С ELISA бяха установени серологични данни за инфекция с *B. burgdorferi* sensu lato при 36 (30%) от изследваните гризачи (Табл. 9).

От установените 36 гризачи с антитела срещу *B. burgdorferi*, 23 бяха от вида *R. rattus* (черен плъх) и 13 от вида *M. musculus* (домашна мишка). Сред другите изследвани видове гризачи не беше установена инфекция с борелии. Това означава, че 38,3% (23/60) от изследваните *R. rattus* и 33,3% (13/39) от изследваните *M. musculus* бяха носители на борелии.

**Таблица 9.** Резултати от серологичните и PCR изследвания за *B. burgdorferi* върху гризачи

| Находище | Общ брой | **Доказване носителство на *B. burgdorferi* Брой положителни/ Общ брой** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Серологичен метод ELISA | | | | | PCR метод | | | | |
| | | *R.r.* | *M.m.* | *A.ag.* | *A.s.* | *R.n.* | *R.r.* | ***M.m.*** | ***A.ag.*** | ***A.s.*** | ***R.n.*** |
| Мещица | 65 | 22/51 | 5/9 | 0/3 | 0/1 | 0/1 | 16/51 | 2/9 | 0/3 | 0/1 | 0/1 |
| Перник | 27 | 1/5 | 4/16 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 1/5 | 3/16 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |
| Добрич | 12 | 0/2 | 1/5 | - | - | 0/5 | 1/ 2 | 1/5 | - | - | 0/5 |
| Варна | 13 | 0/2 | 1/6 | 0/1 | - | 0/4 | 1/ 2 | 1/6 | 0/1 | - | 0/4 |
| Монтана | 3 | - | 2/3 | - | - | - | - | 1/3 | - | - | - |
| ОБЩО | 120 | 23/60 | 13/39 | 0/6 | 0/3 | 0/12 | 19/60 | 8/39 | 0/6 | 0/3 | 0/12 |

*R.r. – Rattus rattus* (черен плъх), *M.m. – Mus musculus* (домашна мишка), *A.ag. – Apodemus agrarius* (полска мишка), *A.s. – Apodemus sylvaticus* (горска мишка), *R.n. – Rattus norvegicus* (сив плъх).

**PCR изследване**

С помощта на PCR изследване, най-често доказваният кърлежово-предаван патоген в уловените гризачи бяха борелиите от комплекса *B. burgdorferi* sensu lato – общо 27 положителни проби (22,5%). От тях 19 проби бяха от вида *R. rattus* (черен плъх), а 8 от вида *M. musculus* (домашна мишка), което означава, че 31,7% (19/60) от изследваните *R. rattus* и 20,5% (8/39) от изследваните *M. musculus* бяха с активна инфекция с борелии.

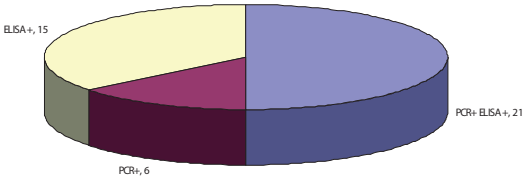
По региони, относителният дял на PCR-позитивните проби беше съответно 27,7% (18/65) в Мещица; 14,8% (4/27) в Перник; 16,7% (2/12) в Добрич; 15,4% (2/13) във Варна; 33,3% (1/3) в Монтана.

**Комбиниране на възможностите на PCR и ELISA**

Половината от заразените с борелии гризачи бяха установени едновременно с PCR и ELISA методите – 21 проби от общо 27 доказани с PCR и 36 доказани с ELISA (Фиг. 4).

Различията в резултатите могат да се обяснят с различния обект на доказване – антителата при ELISA и генома на борелията при PCR. Серологичното изследване не говори непременно за настояща инфекция, какъвто е случаят с доказване на специфичния патоген.. При комбиниране на PCR и серологичните методи се увеличават възможностите за откриване на инфекцията.

Заразеността на гризачите е от основно значение за предаване на инфекцията, тъй като такива гризачи служат като резервоар на инфекцията, от където се заразяват постоянно нови кърлежи, които директно я предават на нови гостоприемници, в това число и на човека. Затова данните за заразеност на дивите гризачи в различните региони на страната отразяват потенциалния риск за здравето на хората.




**Фиг. 4.** Сравнителни възможностите на PCR и ELISA методите за откриване на инфекция с *B. burgdorferi* при гризачи

Въз основа на извършените наблюдения върху заразеността на гризачите у нас с борелии могат да се направят следните по-важни изводи:

1. Заразеността на гризачите зависи от прилагания метод и се движи средно между 22,5% и 30% (съответно с PCR и ELISA).
2. Заразеността на *R. rattus* и *M. musculus* се движи между 31,7% и 38,3% за *R. rattus* и 20,5% и 33,3% за *M. musculus*.
3. Комбинирането на PCR и серологичните методи увеличава възможностите за откриване на инфекцията при гризачите.
4. Гризачите са основен гостоприемник на кърлежите *I. ricinus*, с които се предава *B. burgdorferi*. При заразяване с борелии, гризачите играят ролята на основен резервоар на инфекцията. Ето защо тяхната заразеност с борелии е показател за риска от заболяване при хората.

## 4. Изследване на пациенти

### 4.1. PCR изследване

Важно допълнение на серологичното изследване е доказването на самия причинител, *B. burgdorferi*, чрез PCR. За целта най-успешно е изследването на кожни биопсии от периферния ръб на еритема мигранс лезията в ранния стадий на болестта. Вземането на кожна биопсия е инвазивна процедура.

Проучихме до каква степен изследването на кръв или урина може да замести кожната биопсия при доказването на *B. burgdorferi* в ранния стадий на Лаймската борелиоза. Изследвахме с PCR кръвна плазма от 228 пациенти и урина от 106 от тях.

*B. burgdorferi* беше доказана с PCR единствено при болните с ранна Лаймска болест (еритема мигранс) и то само при нелекуваните от тях (Табл. 10). Това говори, че антибиотичното лечение бързо изчиства борелиите от кръвта и урината на болните, дори и без да са отстранени симптомите на болестта.

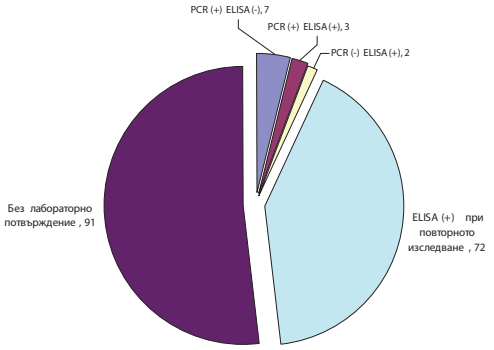
**Таблица 10.** Резултати от изследването с полимеразна верижна реакция (PCR) на клинични материали (проби урина и кръвна плазма) от болни с Лаймска борелиоза

| Стадий на болестта | PCR – позитивни резултати при изследване на проби: | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | КРЪВНА ПЛАЗМА | | | УРИНА | | | ОБЩО | |
| | Общ брой | от тях положителни брой | % | Общ брой | от тях положителни брой | % | Положителни/ общ брой изследвани | % |
| Нелекува на Еритема мигранс | 81 | 6 | 7,4 % | 59 | 4 | 6,8 % | 10 / 81 | 12,3 % |
| Еритема мигранс с лечение | 92 | - | - | 31 | - | - | - | - |
| 2–3 стадий | 55 | - | - | 16 | - | - | - | - |
| ОБЩО | 228 | 6 | 2,6 % | 106 | 4 | 3,8 % | 10 / 228 | 4,4 % |

При общо 10/81 (12,3 %) от болните с нелекувана еритема мигранс диагнозата беше потвърдена с PCR. При 6/81 (7,4 %) причинителят на Лаймската болест беше доказан в кръвната плазма, а при 4/59 (6,8 %) – в урината.

Доказването на борелии в кръвта или урината показва, че независимо от кожната локализация на борелиите при еритема мигранс, очевидно е налице и известна хематогенна дисеминация още в съвсем ранните етапи на инфекцията. Трябва да се има предвид също, че не всички субтипове *B. burgdorferi* могат да дисеминират хематогенно от мястото на първичното кожно огнище.

Паралелно направихме **серологични изследвания** (ELISA) на пациентите в ранната фаза на болестта, за да потърсим корелация на резултатите с тези от PCR (Фиг. 5).




**Фиг. 5.** Възможности на PCR и ELISA методите в ранния стадий на Лаймската борелиоза

Общо едва при 5 от 81 (6,2%) нелекувани болни с еритема мигранс се доказаха ИгМ антитела още при първото серологично изследване.

Получените резултати показаха, че PCR е по-надеждно средство за доказване на *B. burgdorferi* в съвсем ранния стадий на болестта от серологичното изследване, дори и при изследване на различни от кожната биопсия клинични материали за PCR. С помощта на PCR се доказа наличието на етиологичния агент преди образуването на специфичните ИгМ антитела и позитивирането на серологичните тестове. Това е от съществено значение предвид известното бавно задвижване на хуморалния имунен отговор в ранната фаза на Лаймската борелиоза.

Резултатите от сравнителните изследвания на пациенти с PCR и ELISA насочват към следните по-важни обобщения:

1. PCR е основна алтернатива на серологичното изследване в съвсем ранния стадий на болестта преди етиологичното лечение. С PCR успешно бяха доказани 12,3% от болните с ранна Лаймска борелиоза.

2. Най-подходящ материал за изследване с PCR е кожната биопсия от лезията еритема мигранс, което обаче е инвазивна процедура. В кръв от болните борелиите се доказват по-трудно и по-рядко, тъй като кръвта е неблагоприятна среда за борелиите. Взимането на урина обаче е неинвазивна процедура, а процентът на доказване на борелии в урината е сравним с този при изследване на кръв (6,8% доказване в урина; 7,4% в кръв).

3. Независимо от кожната локализация на инфекцията при еритема мигранс, доказването на борелиите в кръвта на болния говори за ранна хематогенна дисеминация.

4. Ранното антибиотично лечение бързо изчиства борелиите от кръвта на болните и те не могат да се докажат с PCR дори и скоро след началото на етиологичното лечение.

5. Сравнителните възможности на PCR и ELISA в съвсем ранния стадий на болестта са в полза на изследването с PCR. С PCR се доказва етиологичният агент преди образуването на специфичните ИгМ антитела и позитивирането на серологичните тестове. След 20–30 ден от началото на болестта, когато се образуват сигнификантни количества антитела, диагностичната стойност на PCR отстъпва пред възможностите на серологичните техники.

## 4.2. Клониране, експресия и проучвания с рекомбинантни *B. burgdorferi* протеини

За да проучим ролята на отделните *B. burgdorferi* протеини в развитието на специфичния антитяло отговор в хода на Лаймската болест, както и за да създадем ново поколение ELISA тестове у нас, клонирахме в под-

ходящи плазмидни вектори и експресирахме в химиокомпетентни клетки 4–те основни имунодоминантни протеини на *B. burgdorferi* – OspC, FlaB, OspA и VlsE.

**Разработване на PCR праймерни системи за амплификация на *ospC, flaB, ospA* и *vlsE* гените на *B. burgdorferi* s.l.**

Разработени бяха PCR системи с конструирани от нас праймери, амплифициращи максимално дълги участъци от 4–те гена. Конструирането на праймерните двойки беше съобразено със съответния вектор и необходимостта клонираният ген да бъде включен в рамка на четене при експресията. Клонирането на OspC, FlaB и OspA протеините беше извършено в pET 200/D-TOPO вектор, притежаващ ген за канамицинова резистентност и $His_6$ tag. Поради ниска степен на лигиране към TOPO вектора, клонирането на *vlsE* гена беше извършено успешно в плазмидния вектор pQE30, съдържащ ген за ампицилинова резистентност и $His_6$ tag.

**Конструиране на рекомбинантни плазмиди**

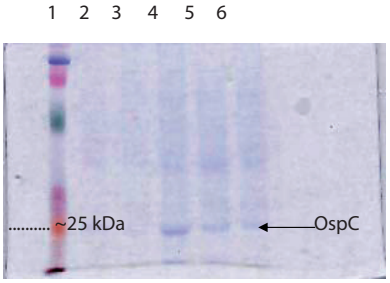
Гените, кодиращи OspC, FlaB, OspA и VlsE протеините бяха амплифицирани с полимеразно-верижна реакция с Pfu ДНК полимераза. За матрица беше използвана геномна ДНК на *B. burgdorferi* s.s, щам B31.

Наличието на амплификационен продукт беше визуализирано чрез електрофореза в 1,5% агарозен гел. Бандовете от електрофорезата бяха изрязвани, пречиствани и клонирани в експресионните вектори pET 200/D-TOPO – за *ospC, flaB* и *ospA* гените и съответно pQE30 вектора – за *vlsE* гена.

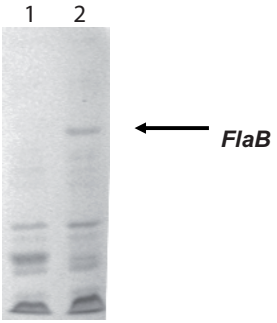
**Трансформация на рекомбинантните вектори в химио-компетентни *E. coli* клетки**

Щамовете *E. coli* MOS BLUE competent cells (GE Healthcare) и *E. coli* One Shot TOP 10 competent cells (Invitrogen) бяха използвани за намножаване и охарактеризиране на рекомбинантните плазмиди. Други щамове – *E. coli* BL21 StarTM (DE3), (Invitrogen), *E. coli* XL 1 Blue Supercompetent Cells (Stratagene) и *E. coli* SURE® 2 Supercompetent Cells (Stratagene) бяха използвани за експресия на рекомбинантните протеини. Трансформационната реакция беше проведена в условията на температурен шок, последван от инкубиране на $37^0$ C.

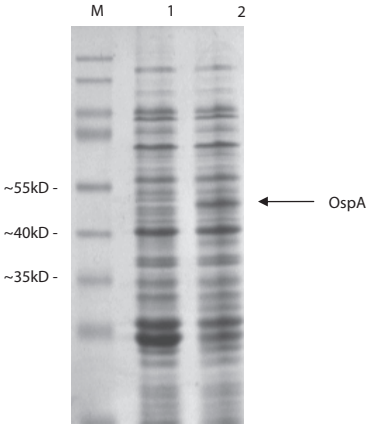
Трансформантите бяха подбирани след 18–24 ч. инкубиране върху Luria Bertani (LB) агар с антибиотик, съответно канамицин (при TOPO вектора) и ампицилин (при pQE вектора). Колониите бяха препосявани в течна LB среда със същите антибиотици и от тях беше изолирана плазмидна ДНК (фиг. 6–8).




**Фиг. 6.** SDS-PAGE на клетъчни лизати от клетки на *E. coli* BL 21, трансформирани с рекомбинантен плазмид – pET TOPO вектор с включен ген за OspC
след индукция с IPTG. 1 – Маркер (BioRad),
2–6 – Клетъчни лизати на клонове, изолирани на LB среда с канамицин.




**Фиг. 7.** SDS-PAGE на клетъчни лизати на *E.coli* BL 21, трансформирани с вектор pET TOPO и с рекомбинантен конструкт с включен ген за *flaB* след индукция с IPTG. 1 – лизат от *E.coli* BL 21, трансформирани само с вектор pET TOPO; 2 – лизат от *E. coli* BL 21, трансформирани с вектор и конструкт pET TOPO/*FlaB.*




**Фиг. 8.** SDS-PAGE на клетъчен лизат *E. coli* BL 21, трансформирани с вектор pET TOPO и с рекомбинантен конструкт с включен ген за OspA след индукция с IPTG. 1 – лизат от *E. coli* BL 21, трансформирани само с вектор pET TOPO; 2 – лизат от *E. coli* BL 21, трансформирани с вектор и конструкт pET TOPO/*OspA*

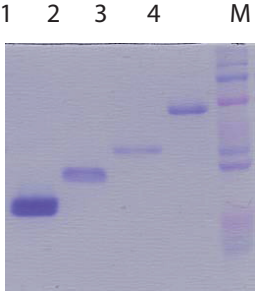
За да се потвърди наличието на *ospC, flaB* и *ospA* гените в изолираната плазмидна ДНК бяха проведени PCR реакции с праймера T7 за промотора на pET TOPO вектора и Rev праймера от праймерната двойка, използвана за първоначална амплификация на всеки от гените. Така доказвахме и възможността плазмида да осигури високи нива на експресия на рекомбинантните протеини чрез наличието на промотора, необходим за синтезата на T7 РНК полимеразата.

За потвърждение на *vlsE* векторния конструкт бяха използвани рестриктазни реакции с рестрикционните ензими: *EcoR*I, *BamH*I, *Ndl*, *Bgl*II. Продуктите бяха визуализирани с агарозна гел електрофореза. Така беше потвърждавано успешното включване на гена в рекомбинантния конструкт.

**Експресия и пречистване на рекомбинантните протеини**

Селектираните *E. coli* клонове с включен рекомбинантен плазмид бяха използвани за трансформация на експресионнен щам *E. coli*. Култивирането се извършваше в течна LB среда, съдържаща съответния антибиотик – канамицин или ампицилин. Към културите се прибавяше IPTG за стимулиране на експресията. За оценка нивото на експресия беше използвана полиакриламидна гел електрофореза. При достигане на максимална експресия, пробите се центрофугираха и протеините се пречистваха с имобилизирана металнойонна афинитетна хроматография (HIS-Select™ Nickel Affinity Gel, Sigma).

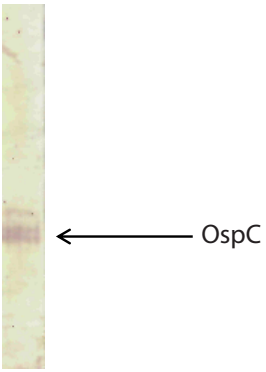
Пречистените протеини се визуализираха с полиакриламидна гел електрофореза (фиг. 9).




**Фиг. 9.** SDS гел-елетрофореза на пречистени рекомбинантни протеини. **M**- белтъчен маркер; **1 –** OspC**, 2** – OspA, **3** –VlsE и **4** – FlaB.

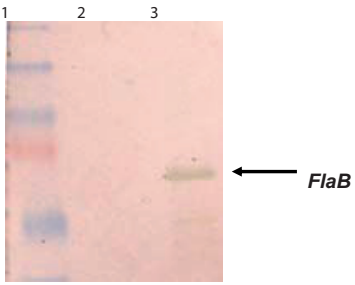
**Потвърждаване на рекомбинантните протеини**

Пречистените рекомбинантни протеини бяха доказани чрез имуноблот с моноклонални антитела, любезно предоставени от Института по медицинска микробиология към Университета в гр. Мюнхен, Германия (фиг. 10–13).

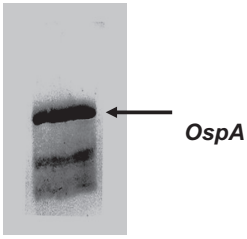



**Фиг. 10.**
Western blot
(имуноблот) на клетъчен лизат от *E. coli* трансформирани с гена *ospC*.

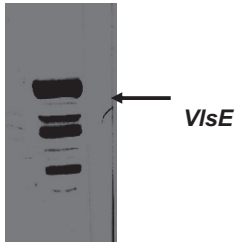
Клетъчни лизати разделени чрез SDS-PAGE
бяха блотирани върху
нитроцелулозен филтър
и инкубирани с монклонално анти-OspC антитяло.




**Фиг. 11.** Western blot (имуноблот) на клетъчен лизат от *E. coli* BL 21 трансформирани с конструкт pET TOPO/*flaB*. Клетъчни лизати разделени чрез SDS PAGE бяха блотирани върху нитроцелулозен филтър и инкубирани с моноклонално анти-FlaB антитяло. 1 – Белтъчен маркер; 2 – лизат от *E. coli* BL 21, трансформирани с вектор pET TOPO; 3 – лизат от *E. coli* BL 21, трансформирани с конструкта pET TOPO/*FlaB*.




**Фиг. 12.** Western blot (имуноблот) на клетъчен лизат от *E.coli* трансформирана с гена *ospA*. Клетъчни лизати разделени чрез SDS PAGE бяха блотирани върху нитроцелулозен филтър и инкубирани с моноклонално анти- OspA антитяло.




**Фиг. 13.**
Доказване
на рекомбинантен VlsE
протеин със специфични
моноклонални антитела
в имуноблот.

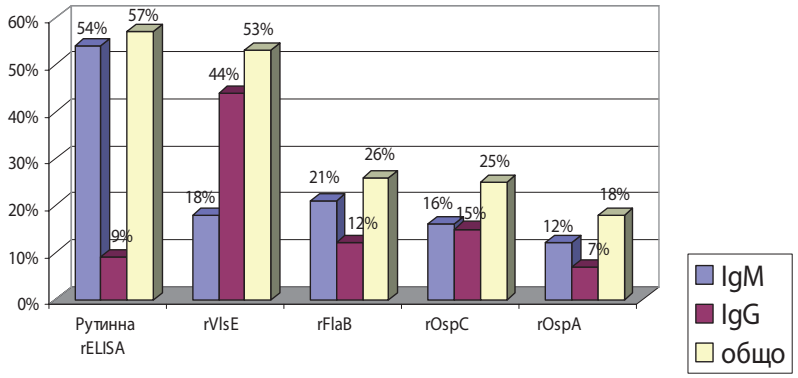
**Разработване на ELISA тестове с получените рекомбинантни *B. burgdorferi* протеини**

За да се проучи участието на отделните *B. burgdorferi* протеини в развитието на хуморалния имунен отговор при Лаймската борелиоза, бяха разработени ELISA тестове с получените рекомбинантни протеини като антигени.

Степента на **специфичност** на разработените ELISA тестове беше изследвана с 50 серумни проби от болни със заболявания, при които обичайно се наблюдават кръстосани реакции (Ебщайн-Бар инфекция, лептоспироза, сифилис, множествена склероза и ревматоиден артрит). Установена беше 100% специфичност за ELISA тестовете с rOspC и с rOspA, 98% с rVlsE и 96% с rFlaB антиген.

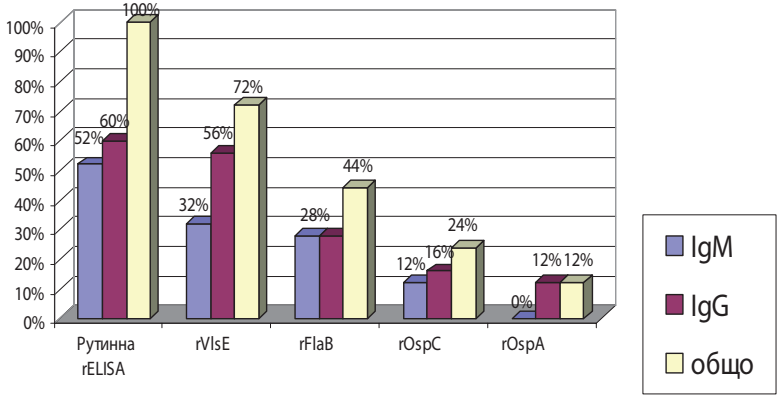
**Реактивността** на отделните рекомбинантни протеини проследихме при взаимодействие със серумни проби от болни с доказана ранна (n=68) или напреднала и късна Лаймска борелиоза (n=50).

Сред болните *с еритема мигранс (ЕМ)*, общо 39/68 (57%) бяха доказани с рутинната ELISA, използваща набор от няколко рекомбинантни борелийни протеина, от тях 37 (54%) бяха с ИгМ антитела, а едва 6 (9%) бяха с ИгГ антитела срещу *B. burgdorferi* s.l. (фиг. 14). С най-висока реактивност от изпитваните антигени беше rVlsE, който откри инфекцията при 36/68 (53%) от болните с ЕМ, като реакцията беше основно ИгГ – при 30 (44%) от болните и в по-малка степен ИгМ – при 12 (18%) от болните. rFlaB и rOspC показаха сходна степен на реактивност при болните с ЕМ (съответно 26% и 25%), като ИгМ-реактивността беше малко по-висока в сравнение с ИгГ-реактивността при rFlaB и почти без разлики между ИгМ- и ИгГ-реактивността при rOspC. Най-рядко разпознаван антиген от серумите на болните с ЕМ беше rOspA – едва 12 (18%) от серумните проби показаха реактивност срещу него, отново предимно ИгМ – при 8 (12%) от болните (фиг. 14).




**Фиг. 14**. Серумна реактивност срещу клонираните и експресирани протеини на *B. burgdorferi* при болни с ранна Лаймска борелиоза (еритема мигранс).

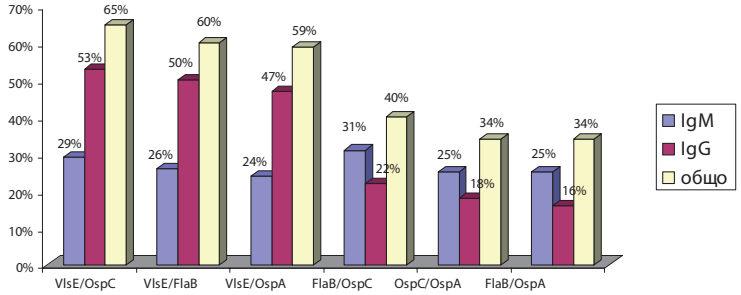
При болните *с напреднала и късна* Лаймска борелиоза реактивността към изпитваните антигени като цяло беше по-висока (фиг. 15). Реактивността отново беше най-висока към rVlsE (72%), следвана от rFlaB (44%), rOspC (24%) и rOspA (12%). Очевидно OspA не играе толкова значителна роля, колкото OspC при взаимодействието на борелиите с гостоприемника. Като правило ИгГ-реактивността беше по-честа в сравнение с ИгМ-реактивността. Особено това се отнасяше до реактивността срещу rOspA, където изцяло само ИгГ антитела бяха открити и на второ място до VlsE, където ИгГ-реактивността съставляваше 56%, а ИгМ-реактивността едва 32% от изследваните проби. При FlaB ИгМ- и ИгГ-реактивност се наблюдаваше при еднакъв брой проби.




**Фиг. 15**. Серумна реактивност срещу клонираните и експресирани протеини на *B. burgdorferi* при болни с напреднала и късна Лаймска борелиоза

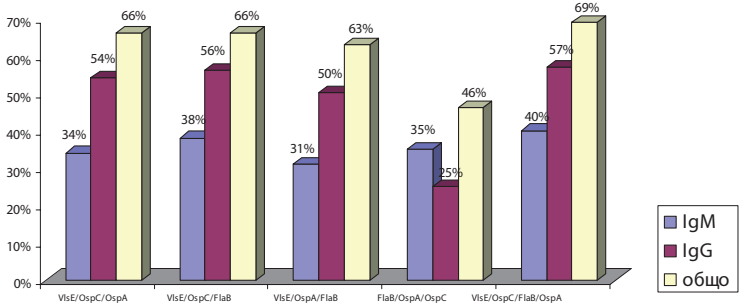
Проведените експерименти с ELISA тестове с един рекомбинантен антиген разкриха участието на отделните протеини в развитието на антитяло отговора при Лаймската борелиоза. От друга страна, те показаха, че само с един антиген не може да се разчита за надеждна диагностика, особено при напредналата и късната Лаймска борелиоза.

При болните с *ранна* Лаймска болест, най-висока реактивност с **два рекомбинантни антигена** беше постигната с комбинациите на VlsE и преди всичко VlsE/OspC, а най-ниска – с комбинациите на OspA, особено FlaB/OspA (фиг. 16). Комбинациите, включващи OspC също често откриваха специфичните антитела. Дори само с комбинирането на VlsE с OspC се постига по-висока диагностична чувствителност на теста (65%) в сравнение с международно утвърдения използван от нас за рутинна диагностика ELISA тест (Nova Lisa recombinant, NovaTec Immunodiagnostica GmbH) (57%) при изследване на серумни проби от болни с ранна Лаймска борелиоза.



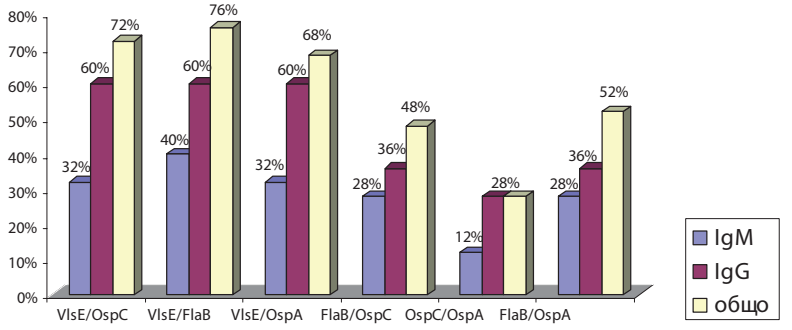

**Фиг. 16.** Серумна реактивност при болни с ранна Лаймска борелиоза срещу комбинации от два различни рекомбинантни антигена.

Минимално беше повишението в чувствителността при използване на **три рекомбинантни антигена** – 66% при прибавяне на OspA към VlsE/OspC, спрямо 65% с двойката VlsE/OspC. Прибавянето и на **четвъртия** проучван антиген повиши още малко чувствителността и тя стигна максималната си стойност – 69% (47/68 болни с ранна Лаймска борелиоза). Отново реактивността беше предимно ИгГ, независимо от ранния стадий на болестта, поради включването на VlsE антигена в 3 от 4 тройни комбинации с антигени и разбира се в четворната комбинация (фиг. 17). Постигнатата степен на чувствителност (69%) беше доста висока за ранния стадий на болестта, когато обичайно около половината болни остават недиагностицирани серологично.



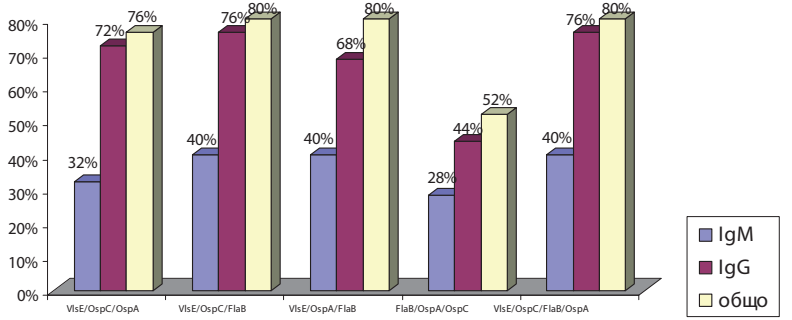

**Фиг. 17.** Серумна реактивност срещу комбинации от 3 и с всичките 4 проучвани антигена при болни с ранна Лаймска борелиоза.

В *напредналия и късния* стадий на болестта (фиг. 18), максимална реактивност с **два рекомбинантни антигена** беше достигната с VlsE/FlaB (за разлика от VlsE/OspC в ранния стадий). Основна разлика беше преимуществената ИгГ-реактивност при всички антигени и като цяло по-високия процент на реагирали серумни проби.




**Фиг. 18.** Серумна реактивност срещу комбинации от 2 рекомбинантни протеина при болни с напреднала и късна Лаймска борелиоза.

Комбинирането на **трите антигена** VlsE/OspC/FlaB или VlsE/OspA/FlaB доведе до максималната възможна чувствителност на теста – 80%. Дори комбинирането на **четирите** проучвани антигена не доведе до по-нататъшно повишаване на чувствителността (фиг. 19).




**Фиг. 19.** Серумна реактивност при болни с напреднала и късна Лаймска борелиоза срещу различни комбинации от 3 или срещу всичките 4 проучвани антигена.

Проучванията с рекомбинантните антигени водят до следните изводи:

1. Както в ранната, така и в късната фаза VlsE осигурява най-висока чувствителност на теста, докато OspA играе минимална роля като антиген.
2. Реактивността срещу VlsE дори и в ранния стадий е предимно ИгГ и в по-нисък процент ИгМ.

3. При напреднала Лаймска борелиоза реактивността към VlsE е предимно ИгГ, при FlaB и OspC е както ИгГ, така и ИгМ, докато към OspA е само ИгГ.
4. Двойката антигени VlsE/OspC показва по-висока степен на реактивност от търговския кит ELISA за диагностика на ранната Лаймска борелиоза (65% срещу 57%). Минималното повишение в реактивността при прибавяне на още един или два антигена (съответно 66% и 69%) разкрива, че тези два антигена са достатъчни за диагностика в ранната фаза на болестта.
5. В по-късните фази на инфекцията, VlsE в комбинация с FlaB осигурява максималната степен на реактивност, но поради възможността за неспецифични реакции при FlaB, е добре да се добави още един антиген – OspC или OspA. Комбинацията от три антигени е достатъчна да осигури максимална реактивност и специфичност в тази фаза.

## 4.3. Участие на различните OspC-серотипове в антитяло отговора в ранния стадий на Лаймската борелиоза

OspC е основният фактор на вирулентност при *B. burgdorferi*. Това е основният протеин, експресиран по повърхността на *B. burgdorferi* в ранния стадий на инфекцията. Известни са 21 OspC филогрупи, наричани OspC генотипове.

Изследвахме наличието на общи епитопи при 16–те най-разпространени генотипа OspC, за да уточним кои генотипове е подходящо да се включат при разработването на нови серологични тестове за диагностика на болестта. Поради тези причини изследвахме кръстосаната реактивност на OspC генотиповете с различни 4 серумни панела, което до момента не беше правено.

Първият серумен панел се състоеше от 43 серума на естествено инфектирани мишки (*Peromyscus leucopus*), а вторият – от 38 серума на естествено инфектирани кучета. Другите два панела се състояха от човешки серуми – единият включваше серуми от 40 пациента с еритема мигранс от България, а другият се състоеше от 25 серума от болни също с ранна Лаймска болест, но от САЩ. При всичките серумни панели предварително бяха доказани антитела срещу *B. burgdorferi.*

Получените резултати показаха значителни вариации в реактивността към отделните OspC генотипове, както между различните видове гостоприемници, така и вътре във всеки вид.

При естествено инфектираните с *B. burgdorferi* мишки *P. leucopus*, реактивността на ИгГ антителата се движеше от 33 % (OspC тип T) до 79 % (OspC тип L). При кучетата с Лаймска болест, ИгГ реактивността се движеше от 13 % (тип J) до 82 % (тип B). При пациентите с Лаймска болест ИгМ+ИгГ реактивността се движеше от 25 % (тип U) до 80 % (типове E и K) при българските и от 24 % (тип M) до 84 % (тип K) – при американските болни. **Нито един генотип рекомбинантен OspC (rOspC) не беше в със-**

**тояние да открие 100% от инфекциите с *B. burgdorferi*.** Максималната установена реактивност на rOspC беше 84% от инфектираните индивиди (тип K) (Табл. 11). Това означава, че ще е необходима комбинация от няколко rOspC.

При всеки серумен панел наблюдавахме как някои серуми реагираха с всички rOspC, а други не реагираха с нито един.

**Относително ниският процент (18–20%) серумни проби с антитела към всички OspC генотипове е указание за необходимостта от включване на поне два различни типа OspC в диагностичните тестове**. От друга страна, серумите без антитела към OspC (0–13%) налагат внимателно интерпретиране на негативните резултати предвид факта, че само серуми с доказана реактивност срещу *B. burgdorferi* бяха включени в проучването.

**Таблица 11.** Реактивност в проценти на серумни проби с анти-OspC антитела

| Серумен панел | % Положителни (реактивност) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | rA | rB | rC | rD | rE | rF | rG | rH | rI | rJ | rK | rL | rM | rN | rT | rU |
| Мишки *P. leucopus* | **70** | **61** | 42 | 72 | **70** | **74** | **51** | 35 | **53** | 58 | **63** | **79** | **67** | 44 | 33 | 46 |
| Кучета с Лаймска болест | **68** | **82** | 61 | 32 | **66** | **74** | 53 | 24 | **66** | 13 | **74** | **66** | **58** | 55 | 26 | 63 |
| Болни с Лаймска болест, България | **68** | **72** | **80** | **68** | **80** | **80** | **44** | 64 | **76** | 76 | **84** | **68** | 24 | **52** | 32 | **68** |
| Болни с Лаймска болест, САЩ | **65** | **68** | **68** | **48** | **80** | **78** | **75** | 60 | **70** | 60 | **80** | **73** | 35 | 43 | 40 | 25 |

Заб. С rA-rU са означени рекомбинантните OspC протеини от съответния генотип.
В по-тъмен цвят са представени максималните стойности на серумната реактивност.

**Таблица 12.** Процент серопозитивни проби при реактивност срещу двойки OspC генотипове.

| % реактивни български серуми | | | | | | | | % реактивни американски серуми | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | E | F | I | K | L | | A | B | E | **F** | I | **K** | L |
| A | 68 | 88 | 84 | 84 | 80 | 88 | 76 | A | 74 | 89 | 97 | 91 | 89 | 94 | 83 |
| **B** | | 72 | 92 | 92 | 92 | **96** | 88 | B | | 77 | 94 | 91 | 80 | 91 | 91 |
| **E** | | | 80 | 80 | 80 | 88 | 88 | E | | | 91 | **100** | 97 | **100** | 97 |
| F | | | | 80 | 80 | 88 | 88 | F | | | | 89 | 91 | 94 | 94 |
| I | | | | | 76 | 84 | 84 | I | | | | | 80 | 91 | 91 |
| K | | | | | | 84 | 88 | K | | | | | | 91 | 97 |
| L | | | | | | | 68 | L | | | | | | | 83 |

Заб. В по-тъмен цвят е представена комбинацията от OspC типове, която разпознава специфичните антитела при максимален брой пациенти.

Анализът на резултатите от възможните двойки OspC-типове разкри, че комбинирането на rOspC типове K с E или F откриваше 100% (всичките 35) български пациенти с предварително доказани антитела срещу OspC (при 5 от тях липсваха анти- OspC антитела). Комбинирането на OspC типове K и B откриваше 96 % (24/25) от американските пациенти с ранна Лаймска борелиоза (Табл. 12).

Накратко, от дискутираното дотук могат да се сумират някои изводи за участието на различните OspC генотипове в антитяло отговора на организма:

1. OspC е силно имуногенен протеин, след като на практика всички изследвани серуми имаха антитела срещу поне един генотип.
2. OspC е силно хетерогенен. Реактивността срещу отделните генотипове вариираше в доста широки граници.
3. Само 18–20% от серумите са с антитела към всички OspC типове и нито един генотип не открива антителата при всички серуми, което налага включване на повече от един генотип в диагностичния тест.
4. OspC генотипове A, B, E, F, I, K, L откриват инфекцията при всички видове изследвани гостоприемници (мишки, кучета, хора – от Европа и от САЩ). Това означава, че те притежават общи епитопи за всички OspC генотипове.
5. За практиката е важно, че отрицателният резултат от диагностичния тест с един или два, както е обичайно, OspC генотипа, не изключва заболяването, предвид възможната реактивност към други, невключени в диагностичния набор, генотипове.
6. Комбинирането на OspC генотипове K с F или E открива 100% от българските пациенти с предварително доказани антитела срещу OspC. Комбинирането на OspC типове K и B открива 96 % от американските пациенти с ранна Лаймска борелиоза. Тези данни показаха, че е налице различие в анти-OspC антитяло отговора на пациенти от Европа и САЩ. При отчитане и на тези различия, OspC типовете K, E, F и B са най-подходящите за включване в мултиантигенен диагностичен набор.

## 4.4. Възможности на VlsE C6 пептиди за серологична диагностика

C6 пептидът от VlsE антигена е имунодоминантен и силно консервативен, почти идентичен, при различните борелийни видове, причиняващи Лаймска болест, което го прави универсален при тестване на серумни проби от различни географски региони. Именно тези две твърдения проверихме на практика със серуми от български и американски пациенти с Лаймска болест.

За тази цел разработихме първите у нас пептидни ELISA тестове за доказване на антитела срещу причинителите на Лаймската борелиоза. Като антигени служеха специално синтезирани пептиди, състоящи се от 26 аминокиселини, отговарящи на С6 участъка на трите основни вида патогенни борелии от комплекса *B. burgdorferi* sensu lato.

Резултатите от изследванията са показани на Табл. 13. От получените данни става ясно, че С6 пептидът от вида ***B. burgdorferi* s.s.** открива в най-висока степен специфичните антитела при болните с Лаймска болест, при това както в българския панел, така и в американския серумен панел.

**Таблица 13.** Реактивност на пептидни С6 ELISA със серумни панели от болни с Лаймска болест в България и САЩ.

| СЕРУМЕН ПАНЕЛ | **С6 B31 (*B.burgdorferi* s.s.)** | **С6 PT7 (*B. afzelii*)** | **С6 IP90 (*B. garinii*)** |
|---|---|---|---|
| Еритема мигранс (n=38) | 30 (78,9%) | 22 (57,9%) | 20 (52,6%) |
| ИгМ+ (n=20) | 10 (50%) | 4 (20%) | 4 (20%) |
| ИгМ+/ ИгГ+ (n=22) | 16 (72,7%) | 14 (63,6%) | 12 (54,5%) |
| ОБЩО български серуми реагирали – брой (%) | 56 (70%) | 40 (50%) | 36 (45%) |
| Серуми от САЩ (n=80) реагирали – брой (%) | 63 (78,8%) | 39 (48,8%) | 36 (45%) |
| Специфичност – реактивност сифилис (n=8) ревматоиден артрит (n=8) | 1/16 (93,8%) | 2/16 (88,9%) | 0 (100%) |

С6 пептидите на *B. afzelii* и *B. garinii* показаха по-висока реактивност със серумите от болни с еритема мигранс (ЕМ) и с напреднала Лаймска борелиоза от България в сравнение с имуноблот-потвърдените случаи от САЩ.

Неспецифичната реактивност на пептидните антигени беше тествана със серуми от болни със сифилис и ревматоиден артрит. Най-ниска степен на специфичност показа С6 пептида от *B. afzelii* (88,9%), по-висока специфичност показа С6 пептида от *B. burgdorferi* s.s. (93,8%) и максимална – от *B. garinii* (100%), но като цяло и при трите пептида специфичността беше висока.

Проведените проучвания показаха, че С6 пептидите успешно могат да служат и за диагностика, след като откриват почти 80% от антителата дори в съвсем ранната фаза на Лаймската болест (еритема мигранс). Тестовете са лесни за изпълнение и, което е съществено, изключително евтини, тъй като използваният антиген съдържа само 26 аминокиселини, чиито синтез е много по-изгоден икономически от производството на рекомбинантни цели белтъци.

В резюме, могат да се направят следните по-важни изводи за възможностите на VlsE С6 пептидите:

1. Разработени са пептидни ELISA тестове с антиген от С6 региона на VlsE антигените на трите основни вида борелии, причиняващи Лаймска болест – *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* и *B. afzelii*.
2. За първи път е направено сравнение между реактивността към С6 пептида на серуми от европейски и американски болни с различни клинични прояви на болестта.
3. Установена е висока реактивност на С6 пептидите, което е в подкрепа на твърденията за висока имуногенност на този участък от молекулата на VlsE антигена.
4. Установена е по-висока реактивност на С6 пептида от *B. burgdorferi* s.s. в сравнение с С6 пептидите от *B. garinii* и *B. afzelii*, както при американските, така и при българските болни. Тази находка подкрепя данните ни от изследване заразеността на нашите кърлежи и е възможно указание за различния патогенетичен потенциал на различните видове борелии.
5. Реактивността към С6 пептидите от *B. garinii* и *B. afzelii* е по-висока при българските пациенти в сравнение с американските, което отразява разпространението на съответните видове борелии в света.
6. Различията в реактивността към С6 пептидите от различните видове борелии е в контраст с общоприетата теза, че С6 участъкът от белтъчната верига на VlsE антигените е силно консервативен. Напротив, оказва се, че с С6 пептиди от различните видове борелии се получават различни резултати.
7. С6 пептидните ELISA тестове са много подходящи за рутинна серологична диагностика на Лаймската борелиоза – с тях се откриват във висока степен антитела в различните стадии на болестта, те са лесни за изпълнение и икономически много изгодни.

## II. ЧОВЕШКА ГРАНУЛОЦИТНА АНАПЛАЗМОЗА

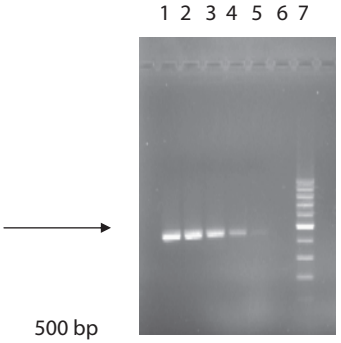
Първите проучвания върху анаплазмозата в България и едни от първите в Европа бяха направени от нас само 5 години след като заболяването беше описано за първи път в САЩ през 1994 г. Направихме първото проучване за разпространението на анаплазмозата у нас. Въведохме имуноензимен и имунофлуоресцентен тест за серологичното й доказване. Разработихме и приложихме няколко вида PCR системи за доказване на причинителя. Описахме първите случаи у нас и уточнихме клиничните и лабораторните характеристики на заболяването.

### 1. Разработване на PCR системи за откриване на *A. phagocytophilum*

За специфично откриване на *A. phagocytophilum* беше разработена и въведена PCR система с праймерите LA1 и LA6, амплифициращи 444 bp участък от *ankA* гена.

Специфичността на използваните праймерни системи беше тествана при амплификация с ДНК от различни бактериални и гъбични видове и човешка ДНК по протоколите, съответстващи на всяка от праймерните двойки. Резултатите доказаха високата специфичност на използваните праймери.

Праймерните системи бяха контролирани и по отношение на тяхната чувствителност. За целта бяха изследвани 10-кратни серийни разреждания на ДНК от *A. phagocytophilum*.




1 – 100 ng
2 – 10 ng
3 – 1 ng
4 – 100 pg
5 – 10 pg
6 – 1 pg
7 – Молекулярен маркер 100 bp Ladder, Amersham Biosciense

**Фигура 20.** Амплификация на различно количество ДНК от *Anaplasma phagocytophilum* с праймерите LA1/ LA6

Най-малкото количество ДНК от *A. phagocytophilum*, което бе амплифицирано с праймернайта двойка LA1/LA6 беше 10 pg (фиг. 20).

### 2. Изследване на кърлежи

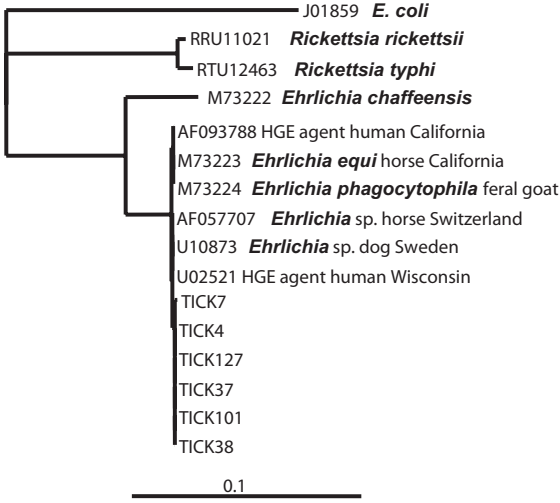
**Първите проучвания** в България и едни от първите в света за заразеност на кърлежи с анаплазми с помощта на PCR бяха направени от нас през

2000 г. Общо 202 кърлежа *I. ricinus*, събрани от парк „Борисова градина" в София бяха изследвани с PCR за носителство на борелии и анаплазми. Разпределението на заразените кърлежи по пол и стадий на развитие е отразено в табл. 14. Общо 38 (33,9%) от 112 възрастни кърлежи бяха инфектирани с *A. phagocytophilum*, а 15 (13,4%) бяха с коинфекция на анаплазми с борелии. При нимфите, от 18–те пула на 90 нимфи, при 2 се доказа *A. phagocytophilum* заедно с *B. burgdorferi.*

**Таблица 14.** Резултати от *ankA* PCR амплификацията за доказване на *A. phagocytophium* ДНК в кърлежи *I. ricinus*

| Пол и стадий | Общо | Брой (%) инфектирани кърлежи с *A. phagocytophium* |
|---|---|---|
| Женски | 62 | 19 (30.6) |
| Мъжки | 50 | 19 (38) |
| Общо възрастни | 112 | 38 (33.9) |
| Нимфи | 90 (18 пула) | 2 (2.2) |
| ОБЩО | 202 | 40 (19.8) |

Сравнението на резултатите, получени с двете PCR реакции, доказващи съответно *ankA*-гена и гена за 16S рРНК на *A. phagocytophilum,* показа много по-висок процент на положителни реакции с *ankA* PCR. От 40-те установени с *ankA* PCR ДНК проби от кърлежи, съдържащи *A. phagocytophilum*, едва 19 (47,5%) се доказаха и с 16S рРНК PCR.




**Фигура 21.** Дендрограма на секвенциите на *A. phagocytophilum* от 6 ампликон от кърлежи с 16S рРНК (ge9f/ge10r) PCR, сравнени с нуклеотидните секвенции на анаплазми, ерлихии и рикетсии от различни географски райони.

С помощта на 16S рРНК PCR бяха сравнени нуклеотидните секвенции на 6 от получените ампликони. Секвенциите показаха 99,77% – 99,89% хомоложност с изолираната в Уисконсин, САЩ, *A. phagocytophilum* (U02521). Дендрограмата е показана на фиг. 21.

Това е едно от пилотните проучвания в Европа върху заразеността на кърлежи с анаплазми и борелии. Само две проучвания в Европа преди нашето бяха фокусирани върху едновременното търсене на борелии и анаплазми в гладни кърлежи, които именно представляват опасност за хората.

**На следващия етап от проучването бяха изследвани кърлежи от Турция и Албания.** Изследвани бяха общо 210 кърлежи, свалени от домашни животни – 120 кърлежи от 3 области на Турция – Източна Анатолия, Средна Анатолия и Средиземноморски регион и 90 кърлежи от 5 района в Северна Албания и 3 района в средна Албания.

В проучването бяха включени и 96 иксодови кърлежи събрани през 2001 г. отново от парк "Борисова градина" в София с цел да се проследи заразеността на кърлежите във времето. За разлика от предишното проучване, при което беше приложена PCR техника и блот-хибридизация само за потвърждение на положителните проби, при това проучване всички проби бяха изследвани с блот-хибридизация.

Резултатите от изследванията на кърлежите от Турция и Албания са представени на табл. 15. При 6 (5%) от кърлежите от Турция и 8 (9%) от кърлежите от Албания бяха доказани анаплазми. В *Rhipicephalus sanguineus* кърлеж от Албания дори беше доказана *Ehrlichia canis* (причинител на моноцитната ерлихиоза). Четири от ампликоните с доказани анаплазми от кърлежи от Албания бяха секвенирани. Установи се, че при 3 от тях се касае за подобен на *E. chafeensis* вид (също причиняващ моноцитна ерлихиоза), а при четвъртия секвенциите отговаряха на *A. phagocytophilum*. Освен тях, 2 от ампликоните от кърлежите от Турция също бяха секвенирани, като при единия се доказа *Anaplasma ovis*, а при другия – *A. phagocytophilum*.

Кърлежите *I. ricinus* от България показаха значително по-висока степен на заразеност с анаплазми. От събраните през 2000 г. кърлежи, анаплазми бяха открити при 38% (43/112) от имаго формите и поне 7% (6/18 пула) от нимфите. Сред кърлежите от 2001 г. процентите на заразените кърлежи бяха съответно 28% от имагото и 21% от нимфите (Табл. 16). Със специфични сонди в блот беше потвърдена принадлежността на доказаните анаплазми към вида *A. phagocytophilum.* Секвенирането на 6 ампликона от 2000 г. и на 20 ампликона от 2001 г. също показа идентични секвенции с тези на *A. phagocytophilum*. Други видове *Anaplasma* или *Ehrlichia* не бяха доказани.

Проведеното проучване показа, че предимно *A. phagocytophilum* се открива в кърлежите *I. ricinus*, докато в *Rhipicephalus, Dermacentor* и *Hyalomma* се откриват и моноцитни ерлихии.

**Таблица 15.** Разпределение на заразените с анаплазми кърлежи от Турция и Албания

| | ТУРЦИЯ | | | | АЛБАНИЯ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *B. annulatus* | *D. marginatus* | *H. plumbeum* | *R. bursa* | *H. plumbeum* | *R. bursa* | *R. sanguineus* | Общо |
| | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) |
| Общ брой кърлежи | 30 | 30 | 22 | 38 | 30 | 32 | 28 | 210 |
| *Ehrlichia/Anaplasma sp.* | 1 (3) | 1 (3) | 1 (5) | 3 (8) | | 4 (13) | 4 (15) | 14 (7) |
| *E. canis* | | | | | | | 1 | 1 |

**Таблица 16.** Разпределение на заразените с анаплазми кърлежи *Ixodes ricinus* от България

| | 2000 | | | | 2001 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Женски | Мъжки | Общо имаго | Нимфи* | Женски | Мъжки | Общо имаго | Нимфи** |
| | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) |
| Общ брой кърлежи | 62 | 50 | 112 | 18 | 48 | 24 | 72 | 24 |
| Ehrlichia/Anaplasma sp. | 19 (30) | 24 (48) | 43 (38) | 6 (7) | 16 (33) | 4 (17) | 20 (28) | 5 (21) |
| A. phagocytophilum | 14 | 22 | 36 | 5 | 16 | 4 | 20 | 5 |

*18 пула по 5 нимфи; ** индивидуално изследвани нимфи

За проучване **динамиката на зараженост**та на кърлежите с анаплазми беше проведено изследване върху 1265 кърлежи, събрани от различни региони на страната в 4 последователни години от 2003 г. до 2006 г.

При изследване чрез PCR на уловените *в региона на град София* кърлежи (2003 г.–2006 г.) най-висока степен на зараженост с *A. phagocytophilum* беше намерена през 2003 г. – средно 10,17% (Табл. 17).

Женските имаго форми бяха най-силно заразени – 12,82%, изненадващо висока беше заражеността и на нимфите – 12,50%, мъжките бяха заразени в 8,00% и ларвите – в 4,55%.

**Таблица 17.** Резултати от PCR изследването на кърлежите от региона на град София

| Брой (%) заразени кърлежи *I. ricinus* с *A. phagocytophilum* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Година | Женски | Мъжки | Общо (имаго) | Нимфи | Ларви | Общо кърлежи |
| 2003 | 5/39 (12,82) | 2/25 (8,00) | 7/64 (10,94) | 4/32 (12,50) | 1/22 (4,55) | 12/118 (10,17) |
| 2004 | 1/46 (2,17) | 0/24 | 1/70 (1,43) | 0/13 | 0/28 | 1/111 (0,90) |
| 2005 | 1/52 (1,92) | 1/35 (2,86) | 2/87 (2,30) | 0/38 | 0/54 | 2/179 (1,11) |
| 2006 | 1/43 (2,33) | 1/32 (3,13) | 2/75 (2,67) | 1/26 (3,85) | 0/46 | 3 /147 (2,04) |
| Общо | 8/180 (4,44) | 4/116 (3,45) | 12/296 (4,05) | 5/109 (4,59) | 1/150 (0,66) | 18/555 (3,24) |

За основния вектор на *A. phagocytophilum* в САЩ, *I. pacificus*, данните сочат 9,9% зараженост при имагото, което добре корелира с намерените от нас резултати през 2003 г. През следващите години беше наблюдаван статистически значим спад ($p \leq 0,05$) в заражеността на кърлежите *I. ricinus.* Тези данни корелират със заражеността на кърлежите с борелии през същите години.

Установяването на 4,55% зараженост при ларвите доказва функционирането на трансовариален механизъм в трансмисията на заболяването.

Заражеността на кърлежите *от страната* с *A. phagocytophilum* е отразена на Табл. 18.

Получените резултати дават основание на второ място по важност в трансмисията на *A. phagocytophilum,* след *I. ricinus*, да се постави видът *R. bursa.* В региони, в които е най-многочислен и доминира в местната фауна (Стара Загора, Сливен, Варна) той може да поеме водещите функции на вектор за *A. phagocytophilum*. На трето място се нарежда видът *H. punctata*, който също може да се окаже компетентен вектор за причинителя на човешката гранулоцитна анаплазмоза.

**Таблица 18.** Резултати от PCR изследването за *A. phagocytophilum* на кърлежите от страната за периода 2003–2006 г, разпределени по пол и стадий на развитие

| Брой (%) заразени кърлежи с *A. phagocytophilum* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Регион** | **Година** | **Женски** | **Мъжки** | **Общо (имаго)** | **Нимфи** | **Общо кърлежи** |
| ДОБРИЧ | 2005 | 1/38 (2,63) | 0/3 | 1/41 (2,44) | 0/20 | 1/61 (1,64) |
| | 2006 | 0/35 | 0/1 | 0/36 | 0/24 | 0/60 |
| | Общо | 1/73 (1,37) | 0/4 | 1/77 (1,30) | 0/44 | 1/121 (0,83) |
| СТАРА ЗАГОРА | 2005 | 1/45 (2,22) | 1/91 (1,09) | 2/136 (1,47) | - | 2/136 (1,47) |
| | 2006 | 0/35 | 1/40 (2,50) | 1/75 (1,33) | - | 1/75 (1,33) |
| | Общо | 1/80 (1,25) | 2/131 (1,53) | 3/211 (1,42) | - | 3/211 (1,42) |
| ХАСКОВО | 2005 | 1/50 (2,00) | 0/17 | 1/67 (1,49) | - | 1/67 (1,49) |
| | 2006 | 0/15 | 0/15 | 0/30 | - | 0/30 |
| | Общо | 1/65 (1,54) | 0/32 | 1/97 (1,03) | - | 1/97 (1,03) |
| ВАРНА | 2005 | 1/52 (1,92) | 0/16 | 1/68 (1,47) | - | 1/68 (1,47) |
| МОНТАНА | 2005 | 0/20 | 0/8 | 0/28 | - | 0/28 |
| РУСЕ | 2005 | 1/44 (2,27) | 0/8 | 1/52 (1,92) | - | 1/52 (1,92) |
| ПЛОВДИВ | 2005 | 1/12 (8,33) | 0/21 | 1/33 (3,03) | 0/18 | 1/51 (1,96) |
| СЛИВЕН | 2005 | 1/36 (2,78) | - | 1/36 (2,78) | - | 1/36 (2,78) |
| СЛИВНИЦА | 2005 | 0/16 | 0/30 | 0/46 | - | 0/46 |

В резюме, от получените резултати могат да се направят следните основни изводи:

1. Първото проучване в България и едно от първите в света върху зараженост на кърлежите *I. ricinus* с *A. phagocytophilum*, събрани от растителността в София през 2000 г., показа, че около една трета от възрастните кърлежи са заразени с анаплазми, а при нимфите зараженост е по-ниска.

2. Доказването на *A. phagocytophilum* в ненапити ларви доказа функционирането на трансовариален механизъм на предаване в допълнение към трансфазалния.
3. Коинфекции на борелии и анаплазми в общия им вектор, *I. ricinus*, бяха доказани при 13,4%.
4. Изследването на кърлежи от други Балкански страни (Турция и Албания) показа по-ниска степен на заразеност с *A. phagocytophilum*, но при тях се доказа причинителя на моноцитната ерлихиоза, *E. chaffeensis*.
5. При проследяване динамиката на заразеността на кърлежите *I. ricinus* с *A. phagocytophilum* през 2003г. – 2006 г. се установи максимална заразеност през 2003 г. (10,17%) и спад през следващия период, както от региона на София, така и от регионите на останалите градове.

## 3. Изследване на гризачи

**Серологично изследване**

С ELISA бяха доказани специфични антитела при 26 (21,7%) от изследваните 120 гризачи – от тях 12 бяха от вида *R. rattus* (черен плъх), 10 *M. musculus* (домашна мишка) и 4 *A. agrarius* (полска мишка) (Табл. 19). По този начин инфекцията с *A. phagocytophilum* се нарежди на второ място по честота след тази с *B. burgdorferi*.

**Таблица 19.** Резултати от серологични и PCR изследвания върху гризачи

| Находище | Общ брой | **Доказване носителство на *A. phagocytophilum* Брой положителни/ Общ брой** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Серологичен метод ELISA | | | | | PCR метод | | | | |
| | | *R.r.* | *M.m.* | *A.ag.* | *A.s.* | *R.n.* | *R.r.* | *M.m.* | *A.ag.* | **A.s.** | **R.n.** |
| Мещица | 65 | 12/51 | 5/9 | 2/3 | 0/1 | 0/1 | 3/51 | 0/9 | 2/3 | 0/1 | 0/1 |
| Перник | 27 | 0/5 | 2/16 | 2/2 | 0/2 | 0/2 | 0/5 | 0/16 | 2/2 | 0/2 | 0/2 |
| Добрич | 12 | 0/2 | 0/5 | - | - | 0/5 | 0/2 | 0/5 | - | - | 0/5 |
| Варна | 13 | 0/2 | 3/6 | 0/1 | - | 0/4 | 0/2 | 2/6 | 0/1 | - | 0/4 |
| Монтана | 3 | - | 0/3 | - | - | - | - | 0/3 | - | - | - |
| ОБЩО | 120 | 12/60 | 10/39 | 4/6 | 0/3 | 0/12 | 3/60 | 2/39 | 4/6 | 0/3 | 0/12 |

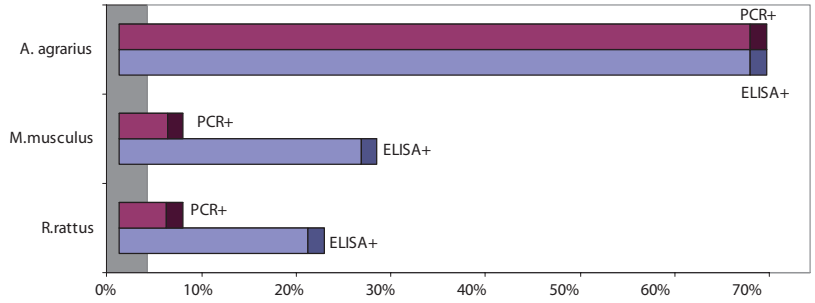
*R.r. – Rattus rattus* (черен плъх), *M.m. – Mus musculus* (домашна мишка),
*A.ag. – Apodemus agrarius* (полска мишка), *A.s. – Apodemus sylvaticus* (горска мишка),
*R.n. – Rattus norvegicus* (сив плъх).

При 7 от 26 (26,9%) гризачи със серологични данни за инфекция с *A. phagocytophilum* бяха установени коинфекции – на *A. phagocytophilum* и *B. burgdorferi* при 5 проби и на *A. phagocytophilum* и *F. tularensis* при други 2 проби.

**PCR изследване**

С помощта на PCR *A. phagocytophilum* беше доказана при общо 9 (7,5%) от изследваните гризачи, като при 3 (33,3%) от тях се откриха коинфекции – с *B. burgdorferi* в 2 проби и в една с *F. tularensis*.

Анализът на **видовия състав** на инфектираните гризачи показа 3/60 (5%) заразени *R. rattus*, 4/6 (66,7%) инфектирани *A. agrarius* и 2/39 (5,1%) заразени *M. musculus* (Фиг. 22). Интересна находка беше, че сред представителите на вида *A. agrarius* не бяха открити *B. burgdorferi* или *F. tularensis*, а единствено *A. phagocytophilum*, при това с висока честота, което предполага, че този вид може да се окаже основен резервоар на човешката гранулоцитна анаплазмоза в България.




**Фиг. 22.** Доказване на *A. phagocytophilum* инфекция в гризачи с PCR и ELISA

Едновременно положителни резултати с PCR и ELISA методите имаше при 4 от изследваните проби на гризачи.

В България и въобще в Европа няма яснота по въпроса за резероварите на *A. phagocytophilum*. Предполага участието на редица мишевидни гризачи, но доказателства засега липсват.

В резюме, основните изводи от извършените изследвания върху дребните мишевидни гризачи в България, са:

1. Направено е първото у нас и едно от първите в света проучване върху заразеността на гризачите с *A. phagocytophilum*.
2. Със серологични техники (ELISA) инфекция с *A. phagocytophilum* беше доказана при 21,7%, а с молекулярно-генетични (PCR) – при 7,5% от изследваните гризачи, което я нарежда на второ място по честота след инфекцията с *B. burgdorferi*..
3. Анализът на видовия състав на заразените гризачи разкрива много висока степен на зараженост на *A. agrarius*. *A. phagocytophilum* беше единственият предаван с кърлежи патоген, доказан в този вид гризачи, което предполага, че този вид може да се окаже основен резервоар на човешката анаплазмоза в България.

## 4. Изследване на пациенти

**Серологично изследване**

В едно от първите в света серо-епидемиологични проучвания върху ЧГА, само 5 години след описването на първите случаи на ЧГА в САЩ, потърсихме серологични данни за наличие на тази инфекция в България. Изследвахме серумни проби на 200 пациенти с ухапвания от кърлежи, при които потърсихме антитела срещу *A. phagocytophilum* с имунофлуоресцентен тест

Проверихме хипотезата, че ЧГА е ендемична в районите, ендемични за Лаймска борелиоза поради еднаквия си кърлежов вектор. От изследваните 145 болни с Еритема мигранс, патогномоничната изява на ранната Лаймска болест, антитела срещу *A. phagocytophilum* доказахме в серумните проби на 14 (9,7%) (табл. 20). При 3 (2,0%) от пробите доказахме само ИгМ антитела, при 10 (6,9%) само ИгГ антитела и при 1 (0,7%) – едновременно ИгМ и ИгГ антитела. Титрите на специфичните антитела варираха между 1:80 и 1:160 за ИгМ антителата и между 1:80 и 1:320 за ИгГ антителата.

**Таблица 20.** Антитела срещу *A. phagocytophilum* в серумните проби на болни с кърлежови ухапвания и контролна група здрави лица

| Групи болни | Брой изследвани болни | Брой серумни проби с антитела срещу *A. phagocytophilum* | % на реактивност на серум. проби срещу *A. phagocytophilum* |
|---|---|---|---|
| Еритема мигранс | 145 | 14 | 9,7 |
| Лимфаденопатия | 25 | 2 | 8,0 |
| Фебрилитет, втрисания, главоболие | 5 | 1 | 20,0 |
| Без клинична симптоматика | 25 | 1 | 4,0 |
| Здрави лица | 70 | 2 | 2,9 |
| ОБЩО | 270 | 20 | 7,4 |

Антитела срещу *A. phagocytophilum* намерихме при 1 от 25 (4%) болни без клинична симптоматика след ухапването от кърлеж, при 2 от 25 (8%) от болните, при които беше налице само увеличаване на регионалните лимфни възли след ухапването от кърлеж и при 1 от 5 (20%) от болните, развили фебрилитет, втрисане и главоболие – симптоми, характерни за клиничното протичане на ЧГА. Двама от 4 серологично реактивни болни имаха ИгМ антитела срещу причинителя на ЧГА (титри 1:80 и 1:160), а другите двама – ИгГ антитела (титър 1:640).

Допълнително, при 2 (2,9%) от 70 здрави лица, служещи като контрола, доказахме антитела срещу *A. phagocytophilum* (табл. 20).

Очевидно заболяването не е рядкост у нас, след като почти 10% от болните с Лаймска болест имат данни за коинфекция с *A. phagocytophilum*, като още по-висок е процентът на инфектираните сред болните с фебрилна реакция след ухапване от кърлеж. Нещо повече, данни за инфекция с *A. phagocytophilum* се откриват и сред тези, които са без клинични симптоми след ухапването от кърлеж, а също и при здравите лица без ухапвания от кърлежи. Заедно с високия процент на заразени иксодови кърлежи у нас, тези данни алармират за високия риск от инфектиране на хората.

На следващ етап от проучванията ни насочено бяха търсени случаи на **остра човешка анаплазмоза** сред подлежащите на изследване за Лаймска борелиоза пациенти. Целта ни беше да открием заболявания в ранен стадий и да определим вероятните случаи на коинфекция с *B. burgdorferi* sensu lato. Това бяха болни с клинична симптоматика 7–10 дни след ухапване от кърлеж:

1) с насочващи към ЧГА симптоми – фебрилитет след ухапване от кърлеж или лимфаденопатия (31 бр.),
2) с типична еритема мигранс – патогномоничната проява на ранния стадий на Лаймската борелиоза (36 бр.),
3) с едновременна изява на еритема мигранс и фебрилитет, суспектни за проява на коинфекция (7 бр.) и
4) болни със серологични данни за Лаймска борелиоза (27 бр.).

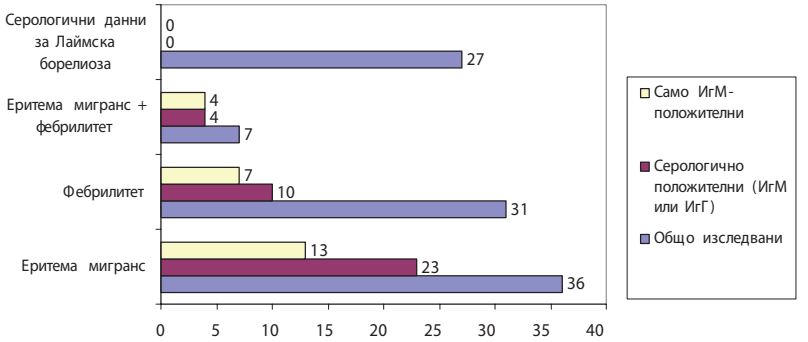
Общо при 37 (36,6%) от тези 101 пациенти бяха доказани специфични ИгМ или ИгГ антитела срещу *A. phagocytophilum* в сигнификантни или гранични стойности, а само в сигнификантни стойности – при 28 (27,7%).

При 16 (15,8%) от изследваните болни намерихме серологични данни за остра ЧГА инфекция чрез откриване на сигнификантни количества **специфични ИгМ** антитела срещу *A. phagocytophilum*, а при други 8 (7,9%) болни специфичните ИгМ антитела бяха в гранични стойности. Всички тези болни бяха изследвани серологично в рамките на един месец след началото на клинична картина с фебрилна реакция, отпадналост, главоболие или еритема мигранс след ухапване от кърлеж. При трима от болните с ИгМ антитела се доказа и паралелна синтеза на специфични антитела от клас ИгГ, свидетелстващи за вероятно подостро заболяване.

Данни за прекарана ЧГА се откриха при 13 (12,9%) болни чрез доказване на сигнификантно повишени **ИгГ антитела** срещу *A. phagocytophilum*, а при други 3 (2,97%) болни специфичните ИгГ антитела бяха в гранични стойности. Това най-вероятно е резултат на преминала инфекция.

Анализът на получените резултати в зависимост от вида на **клиничните симптоми** показа, че сред пациентите със серологични данни за настояща или преминала ЧГА (n=37), 23 бяха с еритема мигранс, 10 бяха с фебрилитет, от които единият с изразено главоболие и лимфаденопатия, 4 едновременно с ЕМ и фебрилитет 10–15 дни след ухапване от кърлеж (фиг. 23).

Паралелното протичане на ЧГА и Лаймската борелиоза по литературни данни може да бъде свързано с по-тежки клинични прояви на Лаймската болест, но няма данни за персистиране или за нелечими клинични симптоми.




**Фиг. 23.** Клинични симптоми при болните с данни за остра ЧГА инфекция

Повишаването на температурата с втрисане не е характерно за Лаймската борелиоза, но е типично за ЧГА.

**Динамика на ИгМ антитяло отговора.** Имахме възможност да проследим част от изследваните болни чрез повторно серологично изследване, един месец след първоначалното. При основната част от болните (25 бр.) се наблюдаваше тенденция към негативиране на първоначално позитивния или граничния резултат. Обратно, при 9 пациенти се доказа сероконверсия с поява на специфични антитела от клас ИгМ или дори с превключване на синтеза от клас ИгМ към клас ИгГ антитела.

Намерената от нас висока честота на остра ЧГА сред болните с еритема мигранс и фебрилитет след ухапване от кърлеж показва широкото разпространение на болестта у нас, както и факта, че тя в повечето случаи остава неразпозната. За щастие при пациенти със запазена имунологична реактивност болестта протича леко или дори безсимптомно, но навреме приложената адекватна терапия ускорява оздравяването и предотвратява евентуалните усложнения.

**PCR изследване**

PCR данни за човешка гранулоцитна анаплазмоза намерихме при 15 от изследваните 101 пациента, развили някакви симптоми след ухапване от кърлеж, с които беше проведено серологичното проучване (табл. 21). За сравнение, серологичното изследване откри само 16 пациенти с ИгМ антитела, свидетелстващи за скорошна инфекция. Това е едно указание, че при анаплазмозата PCR методът може да бъде доста показателен като диагностично средство.

Най-висок беше процентът на PCR-положителните проби при пациентите с еритема мигранс и фебрилитет – 42,9%. Това означава, че при всички пациенти, при които еритема мигранс протича с изразен фебрилитет, трябва на първо място да се мисли за ЧГА.

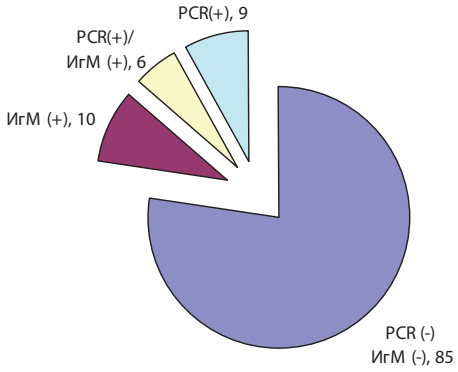
**Таблица 21.** Резултати от изследването с полимеразна верижна реакция (PCR) на кръвни проби от пациенти за наличие на *A. phagocytophilum*

| Симптоми | PCR – позитивни резултати | | |
|---|---|---|---|
| | Общ брой | от тях положителни | |
| | | брой | % |
| Фебрилитет | 31 | 8 | 25,8 |
| Еритема мигранс | 36 | 4 | 11,1 |
| Еритема мигранс + фебрилитет | 7 | 3 | 42,9 |
| Серологични данни за ранна Лаймска болест | 27 | 0 | 0 |
| ОБЩО | 101 | 15 | 14,9 |

На второ място по честота човешката гранулоцитна анаплазмоза беше потвърдена при пациенти с фебрилитет – 25,8%. Това също е значителен дял от болните, развили персистираща поне няколко дни фебрилна реакция 7–10 дни след ухапване от кърлеж.

Също така, при около една десета от болните с еритема мигранс (11,1%) се доказа коинфекция с *A. phagocytophilum* (табл. 21). Общият иксодов вектор очевидно често предава двата патогена съвместно.

Диагнозата човешка гранулоцитна анаплазмоза беше потвърдена едновременно с двата метода при 6 от 15 пациенти (40,0%) (Фиг. 24).




**Фиг. 24.** Възможности на двата метода PCR и ELISA за диагностика на ЧГА според проведеното паралелно изследване на 101 пациента със симптоми след ухапване от кърлеж.

Различията в резултатите, получени с двата метода, могат преди всичко да се свържат с различното им време на позитивиране след началото на инфекцията, както и с персистирането на специфичните антитела дори и след като етиологичният агент вече не е в кръвта на болния. След като се образуват специфичните антитела кръвта става неблагоприятна среда за свободните извън клетките анаплазми. Те обаче се запазват продължително време живи в неутрофилните левкоцити. На практика левкоцитите не могат да се справят с анаплазмите и те остават да поддържат персистираща инфекция.

За практиката е важно, че съчетаването на резултатите от PCR и ELISA разширява диагностичните възможности.

Основните обобщения от проучванията на болните с ЧГА са:

1. Направено е едно от първите в света и първото за България сероепидемиологично проучване на ЧГА сред ухапаните от кърлежи лица у нас. То показа, че заболяването е широко разпространено в България.
2. Доказването на ИгМ антитела при 16 от 101 (15,8%) пациенти с ухапвания от кърлежи доказва активността на инфекцията у нас, както и факта, че в повечето случаи тя остава неразпозната.
3. Анализът на клиничните характеристики на установените болни с остра ЧГА инфекция показа, че около 2/3 от изследваните болни с ранна Лаймска борелиоза (еритема мигранс) са заразени и с *A. phagocytophilum*, както и 1/3 от болните с фебрилна реакция след ухапване от кърлеж и около половината от болните едновременно с фебрилитет и еритема мигранс.
4. Динамиката на антитяло отговора при тези пациенти показа тенденция към негативиране на първоначално положителния или граничния серологичен резултат при почти всички болни. Откриването на късна сероконверсия, макар и при минимална част от болните, доказва необходимостта от повторно изследване.
5. PCR е надежден метод за доказване на остра ЧГА инфекция, след като с PCR бяха установени 15 от 101 (14,9%) изследвани болни с възможна остра ЧГА.
6. Високата честота на едновременно доказване на *A. phagocytophilum* и *B. burgdorferi* показва колко често са налице коинфекции след ухапване от иксодови кърлежи.
7. При болните с фебрилна реакция по време на изява на кожната лезия еритема мигранс трябва задължително да се мисли и за ЧГА.
8. Съчетаването на PCR и серологичните техники разширява диагностичните възможности при ЧГА. PCR позитивира рано в хода на болестта, преди появата на специфичните антитела, които обаче се задържат по-дълго време.

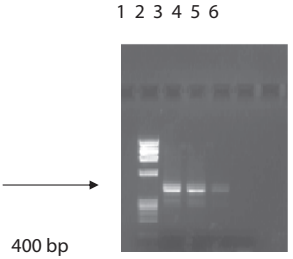
## III. ТУЛАРЕМИЯ

За да изследваме до каква степен кърлежите и гризачите в различни райони на страната са заразени с *F. tularensis* и до каква степен играят ролята съответно на вектори и резервоари на инфекцията, въведохме PCR системи за доказване на 17 kDa липопротеин на *F. tularensis* в кърлежи и органи на гризачи и серологични техники за откриване на специфичните антитела в серума на гризачи.

### 1. Оптимизиране и въвеждане на PCR системи за откриване на *F. tularenisis*

Използваните праймерни системи не показаха кръстосана (неспецифична) PCR амплификация.

Най-малкото количество ДНК от *F. tularensis*, което бе амплифицирано с праймерите TUL 4–435/863 беше 100 pg (Фиг. 25).




1 - Молекулярен маркер ФХ 174–RF-DNA, Amersham pharmacia biotech
2 – 10 ng
3 – 1 ng
4 – 100 pg
5 – 10 pg
6 – 1 pg

**Фиг. 25.** Амплификация на различно количество ДНК от *F. tularensis*, с праймерите TUL 4–435/863, амплифициращи специфичен участък от гена за 17 kDa липопротеин на *F. tularensis*

### 2. Изследване на кърлежи

Сред изследваните с PCR 1265 кърлежа, събрани в регионите на 10 града на България за периода 2003–2006 г., само сред кърлежите от региона на Сливница беше открита *F. tularensis.* Събраните през 2005 г. кърлежи показаха 8,7% заразеност с причинителя на туларемията. По-силно засегнати бяха мъжките екземпляри – 10%, в сравнение с женските – 6,25% (Табл. 22).

**Таблица 22.** Резултати от PCR изследването на кърлежите от региона на град Сливница

| **Брой (%) заразени кърлежи с *F. tularensis*** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Според видовата им структура | | Според пола им | | |
| Година | *D. marginatus* | *R. bursa* | Женски | Мъжки | Общо кърлежи |
| 2005 | 4/36 (11,11%) | 0/10 | 1/16 (6,25%) | 3/30 (10,00%) | 4/46 (8,70%) |

*F. tularensis* беше доказана само в кърлежи от вида *Dermacentor marginatus*, което потвърждава ролята му на основен вектор за *F. tularensis*

Получените от нас данни показват, че независимо от основния път за предаване на туларемията у нас, кърлежите също са заразени и могат при ухапване да предават инфекцията.

## 3. Изследване на гризачи

**Серологично изследване**

Чрез метода аглутинация бяха доказани антитела срещу *F. tularensis* при общо 18 от изследваните 120 гризачи (15%). Заразените гризачи бяха от цялата Пернишка област, което означава, че инфекцията съвсем не е ограничена само в района, в който я познаваме.

**Таблица 23.** Резултати от серологични и PCR изследвания върху гризачи

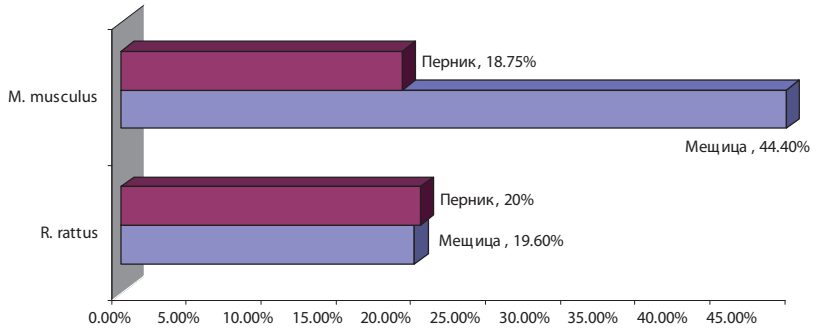
| Находище | Общ брой | **Доказване носителство на *F. tularensis* Брой положителни/ Общ брой** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Серологичен метод (аглутинация) | | | | | PCR метод | | | | |
| | | *R.r.* | *M.m.* | *A.ag.* | *A.s.* | *R.n.* | *R.r.* | ***M.m.*** | ***A.ag.*** | ***A.s.*** | ***R.n.*** |
| Мещица | 65 | 10/51 | 4/9 | 0/3 | 0/1 | 0/1 | 12/51 | 2/9 | 0/3 | 0/1 | 0/1 |
| Перник | 27 | 1/5 | 3/16 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 1/5 | 2/16 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |
| Добрич | 12 | 0/2 | 0/5 | - | - | 0/5 | 0/2 | 0/5 | - | - | 0/5 |
| Варна | 13 | 0/2 | 0/6 | 0/1 | - | 0/4 | 0/2 | 0/6 | 0/1 | - | 0/4 |
| Монтана | 3 | - | 0/3 | - | - | - | - | 0/3 | - | - | - |
| ОБЩО | 120 | 11/60 | 7/39 | 0/6 | 0/3 | 0/12 | 13/60 | 4/39 | 0/6 | 0/3 | 0/12 |

*R.r. – Rattus rattus* (черен плъх), *M.m. – Mus musculus* (домашна мишка), *A.ag. – Apodemus agrarius* (полска мишка), *A.s. – Apodemus sylvaticus* (горска мишка), *R.n. – Rattus norvegicus* (сив плъх).

Съществува потенциален риск за хората в доста по-широк ареал, в който причинителят на туларемията е разпространен, индикатор за което е зразеността на гризачите и на кърлежите. Установената заразеност на гризачите в района на Мещица беше 21,5% (14/65), а в района на Перник – 14,8% (4/27) (Табл. 23).

Анализът на видовата структура показа, че заразените гризачи бяха само от видовете *R. rattus* и *M. musculus.* Средната заразеност на *R. rattus* беше 19,6% (11/56), а на *M. musculus* 28% (7/25). (фиг. 26).

При 6 от 18 заразени с *F. tularensis* гризачи бяха открити серологични данни за коинфекции – *F. tularensis* и *B. burgdorferi* при 4 проби, а *F. tularensis* и *A. phagocytophilum* – при 2 проби.



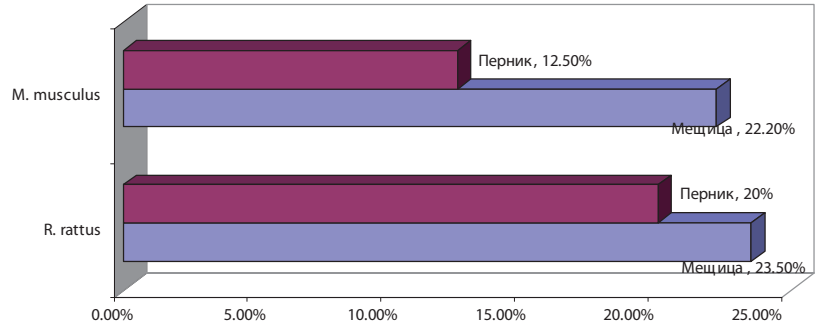

**Фиг. 26.** Сравнителни данни за заражеността на гризачите със серологични техники

Високата степен на заразеност на гризачите в региона не само с причинителя на туларемията, но и с причинителите на Лаймската болест и човешката гранулоцитна анаплазмоза поддържа огнищата и на тези кърлежово-предавани инфекции и създава предпоставки за възникване на коинфекции при хората.

**PCR изследване**

Изследванията с PCR на дребните мишевидни гризачи потвърдиха, че в района на епидемията от туларемия, инфекцията с *F. tularensis* беше на второ място по честота след *B. burgdorferi* в дивите гризачи. Средната заразеност на гризачите в района на Мещица беше 21,5% (14/65), а на Перник – 11,1% (3/27) (Табл. 23).

Видовият състав на заразените с *F. tularensis* гризачи включваше само *R. rattus* и *M. musculus*. Средната заразеност на *R. rattus* в двата района беше 23,2% (13/56), а на *M. musculus* 16% (4/25). Зараженост на двата вида по региони е представена на фиг. 27.




**Фиг. 27.** Сравнителни данни за зараженост на гризачите с PCR

Бяха доказани 4 случая на коинфекции: на *F. tularensis* и *B. burgdorferi* при 3 от изследваните гризачи и при един – на *F. tularensis* и *A. phagocytophilum.*

Световните данни от проучванията на епидемиите от туларемия показват, че на всеки 4–5 години се наблюдава рязко увеличаване броя на заболелите, което е свързано с цикличното нарастване числеността на гризачите, възприемчиви към тази инфекция. Изследванията показват, че повишаване честотата на инфекциите сред гризачите с причинителя на туларемията може да се използва като маркер, предсказващ увеличаване броят на заразените сред хората.

Основните изводи, които могат да се направят от резултатите, получени при изследване на кърлежи и гризачи за инфекция с *F. tularensis*, са следните:

1. Само кърлежите от района на гр. Сливница бяха заразени с *F. tularensis.* В кърлежите от останалите региони на страната *F. tularensis* не беше открита. Средната заразеност на кърлежите от района на гр. Сливница, установена с PCR беше 8,7%.
2. *F. tularensis* беше открита само в кърлежи от вида *Dermacentor marginatus*, което потвърждава ролята му на основен вектор.
3. Установена беше инфекция с *F. tularensis* сред гризачите в цялата област Перник. Средната заразеност на гризачите, установена със серологични методи, беше 21,5% в Мещица, Перник – 14,8%; с PCR заразеността беше сходна – 21,5% и 11,1% съответно.
5. Анализът на видовата структура показа, че заразените гризачи бяха само от видовете *R. rattus* и *M. musculus.* Средната заразеност, установена със серологични техники и с PCR, беше съответно – 10,6% и 23,2% при *R. rattus*, а при *M. musculus* 28% и 16%.
6. Проведените от нас проучвания на практика илюстрираха връзката между високата заразеност на гризачите и нарастване броя на заболелите от туларемия.

## IV. РИКЕТСИОЗИ

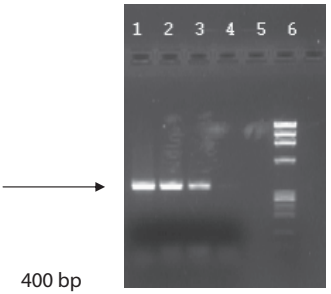
За нашата страна с основно значение са рикетсиозите от групата на петнистите трески. Широкото им разпространение, заедно с нарастване броя на заболелите от Марсилска треска през последните години, показват актуалността на тези инфекции и налагат по-детайлното им проучване.

В нашите изследвания се спряхме на изследвания върху кърлежи и гризачи, които да разкрият какво е циркулирането на рикетсиите в природата. За целта разработихме и приложиме PCR метод, основаващ се на доказването на специфичен участък от 16S рРНК на *Rickettsia* spp.

## 1. Разработване на PCR системи за откриване на рикетсии от групата на петнистите трески

Лабораторната специфичност на използваните праймерни системи беше тествана при амплификация с чуждовидова ДНК. Резултатите показаха висока специфичност на използваните от нас праймери.

По отношение на тяхната чувствителност, най-малкото количество ДНК от *Rickettsia sp.*, което беше възможно да се амплифицира с праймерите Rick 16S For, B-Rick 16S Rev беше 100 pg (фиг. 28).




1 - 10 ng
2 – 1 ng
3 – 100 pg
4 – 10 pg
5 – 100 fg
6 – Молекулярен маркер ФХ 174–RF-DNA, Amersham pharmacia biotech

**Фиг. 28.** Амплификация на различно количество ДНК от *Rickettsia sp.*, с праймерите Rick 16S For/ B-Rick 16S Rev, амплифициращи специфичен участък от гена за 16S рРНК

## 2. Изследване на кърлежи

**Начални проучвания на кърлежи *I. ricinus* от 2000–2001 г.**

В проучването бяха включени 202 кърлежа, събрани от Борисовата градина в София през 2000 г. и 96 кърлежи, събрани от същото място, но през 2001 г.

Установена беше висока честота на заразеност с рикетсии при в кърлежите *I. ricinus*. Рикетсии бяха доказани в 68% (76/112) от възрастните кърлежи и 19 % (17/90) от нимфите, събрани през 2000 г. (Табл. 24). Последващата видова идентификация показа, че при 59 % (45/76) от заразените с рикетсии възрастни кърлежи се касаеше за *R. helvetica*, при 58 % (44/76) инфектиращият вид беше *Rickettsia* IRS3, а 17 % (13/76) бяха заразени с двата вида рикетсии. Сред нимфите, при 65% (11/17) от заразените с рикетсии се откриваше *R. helvetica*, при 88% (15/17) – видът *Rickettsia* IRS3, а при 53% (9/17) се откриваха и двата вида рикетсии.

Малко по-ниска беше честотата на заразеност с рикетсии сред иксодовите кърлежи, събрани през 2001 г. Рикетсии се доказаха при 49 % (35/72) от изследваните възрастни кърлежи и 17 % (4/24) от нимфите (Табл. 24). Като правило, мъжките екземпляри бяха много по-често заразени с рикетсии.

**Таблица 24.** *Rickettsia* в кърлежите *Ixodes ricinus* от България

| | 2000 | | | | 2001 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Женски Бр. (%) | Мъжки Бр. (%) | Общо имаго Бр. (%) | Нимфи* Бр. (%) | Женски Бр. (%) | Мъжки Бр. (%) | Общо имаго Бр. (%) | Нимфи** Бр. (%) |
| Общ брой кърлежи | 62 | 50 | 112 | 18 | 48 | 24 | 72 | 24 |
| *Rickettsia* | 37 (59) | 39 (78) | 76 (68) | 17 (19) | 15 (31) | 20 (83) | 35 (49) | 4 (17) |
| *R. helvetica* | 25 | 20 | 45 | 11 | 5 | 12 | 17 | |
| *Rickettsia* species IRS3 | 17 | 27 | 44 | 15 | 9 | 10 | 19 | 4 |
| Двойна инфекция с рикетсии | 5 | 8 | 13 | 9 | | 2 | 2 | |

*18 пула по 5 нимфи, ** поединично изследвани нимфи

**Таблица 25**. Разпределение на доказаните рикетсии в кърлежите от Турция и Албания

| | ТУРЦИЯ | | | | АЛБАНИЯ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *B. annulatus* | *D. marginatus* | *H. plumbeum* | *R. bursa* | *H. plumbeum* | *R. bursa* | *R. sanguineus* | Общо |
| | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) | Бр. (%) |
| Общ брой кърлежи | 30 | 30 | 22 | 38 | 30 | 32 | 28 | 210 |
| *Rickettsia* | 12 (40) | 16 (53) | 10 (45) | 19 (50) | 18 (60) | 7 (22) | 15 (54) | 97 (46) |
| *R. helvetica* | | 1 | 1 | 1 | | 2 | 1 | 6 |
| *Rickettsia* species IRS3 | | | | | 12 | 2 | | 14 |
| *R. conorii* | 1 | 10 | | 8 | 7 | 1 | 3 | 30 |
| Двойна инфекция | | 1 | | | 1 | | | 2 |

**Изследване на кърлежи от България 2003–2006 г.**

Проследихме заражеността на кърлежите от региона на **София** в 4 последователни години. Установената средна заразеност на кърлежите за периода 2003–2006 г. вариераше между 25,70% и 29,73% (Табл. 26).

**Изследване на кърлежи от Турция и Албания**

Изследвани бяха общо 210 кърлежи, свалени от домашни животни през 2001 г. – 120 кърлежи от 3 области на Турция и 90 кърлежи от 5 района в Северна Албания и 3 района в средна Албания.

Резултатите от изследванията на кърлежите от Турция и Албания са представени на табл. 25. Почти половината (46 %) от тези кърлежи съдържаха рикетсии. Видова идентификация беше направена за *R. conorii*, *R. helvetica* и вида *Rickettsia* species IRS3 с помощта на видово-специфични сонди. *R. conorii* се доказваше най-често, на практика при всеки един от изследваните видове кърлежи от Турция и Албания. Видът *Rickettsia* IRS3 беше намерен само сред кърлежите *H. plumbeum* и *R. bursa* от Албания. *R. helvetica* пък беше намерена във всеки един вид от изследваните кърлежи с изключение на *Boophilus anulatus*.

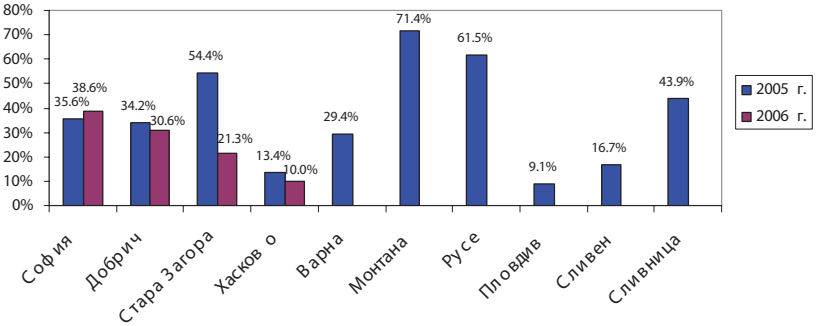
Прави впечатление приблизително еднаквата степен на заразеност на кърлежите от различните географски райони през една и съща година, независимо от видовото им разнообразие.

Относителният дял на заразените с рикетсии кърлежи, за разлика от заразените с борелии и анаплазми, остана постоянен, без статистически значими различия в годините на изследване, 2003–2006 г. ($p>0,05$). Най-висока степен на заразеност беше намерена при мъжките екземпляри.

**Таблица 26.** Резултати от PCR изследването на кърлежите от региона на град София

| Брой (%) заразени кърлежи *I. ricinus* с *Rickettsia sp.* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Година | Женски | Мъжки | Общо (имаго) | Нимфи | Ларви | Общо кърлежи |
| 2003 | 14/39 (35,90) | 10/25 (40,00) | 24/64 (37,50) | 11/32 (34,38) | 0/22 | 35/118 (29,66) |
| 2004 | 17/46 (36,96) | 10/24 (41,67) | 27/70 (38,57) | 6/13 (46,15) | 0/28 | 33/111 (29,73) |
| 2005 | 18/52 (34,62) | 13/35 (37,14) | 31/87 (35,63) | 14/38 (36,84) | 1/54 (1,85) | 46/179 (25,70) |
| 2006 | 17/43 (39,53) | 12/32 (37,50) | 29/75 (38,67) | 10/26 (38,46) | 0/46 | 39/147 (26,53) |

На фиг. 29 е направено сравнение в заразеността на кърлежите от различни региони през 2005–2006 г. Представените данни показват, че заразеността на кърлежите с рикетсии е стабилно висока през годините, много по-висока от тази с борелии, анаплазми и *F. tularensis*.




**Фиг. 29.** Сравнителни данни за заразеността на кърлежите през 2005–2006 г. от 10 различни региона на България

Рикетсии бяха доказани във всички включени в проучването видове кърлежи: *R. bursa, I. ricinus, H. punctata, D. marginatus, H. plumbeum*, което разкрива многообразието на видовата структура на кърлежите, участващи в трансмисията на рикетсиозите от групата на петнистите трески в България.

## 3. Изследване на гризачи

От общо 120 гризачи изследвани за заразеност с *Rickettsia spp.*, PCR-положителни проби бяха установени само сред гризачите от Добрич и Перник (Табл. 27).

Заразени с рикетсии от групата на петнистите трески се оказаха 6 (5 %) от изследваните гризачи, всички от вида *M. musculus.* Това определи високата степен на заразеност на вида *M. musculus* – 15,4% (6/39).

**Таблица 27.** Резултати от PCR изследвания върху гризачи

| Находище | Общ брой | *Rickettsia – позитивни* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PCR метод | | | | |
| | | *R. r.* | *M. m.* | *A. ag.* | *A. s.* | *R. n.* |
| Мещица | 65 | 0/51 | 0/9 | 0/3 | 0/1 | 0/1 |
| Перник | 27 | 0/5 | 4/16 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |
| Добрич | 12 | 0/2 | 2/5 | - | - | 0/5 |
| Варна | 13 | 0/2 | 0/6 | 0/1 | - | 0/4 |
| Монтана | 3 | - | 0/3 | - | - | - |
| ОБЩО | 120 | 0/60 | 6/39 | 0/6 | 0/3 | 0/12 |

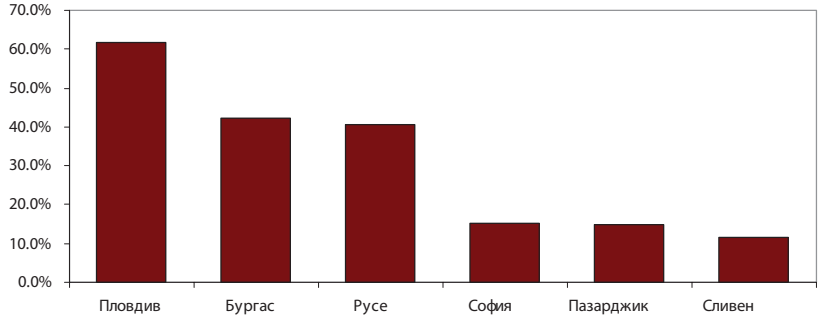
*R. r.* – *Rattus rattus* (черен плъх), *M. m.* – *Mus musculus* (домашна мишка), *A. ag.* – *Apodemus agrarius* (полска мишка), *A. s.* – *Apodemus sylvaticus* (горска мишка), *R. n.* – *Rattus norvegicus* (сив плъх)

## 4. Изследване на пациенти

Серологични изследвания за Марсилска треска проведохме върху пациенти с неясен фебрилен синдром като част от целия набор изследвания за изясняване етиологията на острите фебрилни състояния в България.

Общо 527 болни от 7 области в страната участваха в проучването, като от тях бяха изследвани общо 836 серумни проби с ELISA (Panbio, Австралия).

Специфични антитела срещу *Rickettsia conorii* бяха намерени при 179 (34%) от изследваните 527 болни. Подобна находка илюстрира изключително широкото разпространение на болестта в България.




**Фиг. 30.** Относителна честота на откриване на Марсилска треска сред болните с неясен фебрилен синдром от различни региони на България.

С най-висока честота Марсилска треска беше открита сред пациентите с неясен фебрилен синдром от региона на Пловдив – 61,8% (81/131) изследваните болни, Бургас – 42,2% (49/116) и Русе – 40,5% (15/37) (фиг.30). С по-ниска честота Марсилска треска беше доказана при болните с фебрилитет от регионите на София – 15,3% (11/72), Пазарджик – 14,8% (19/128) и Сливен – 11,4% (4/35).

Обобщено, основните находки и произтичащите от тях изводи могат да се сумират така:

1. Заражеността на кърлежите с рикетсии беше по-висока от заражеността им с другите кърлежово преносими бактериални патогени – *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* и *F. tularenisis*.
2. В кърлежите *I. ricinus* бяха доказани главно считаните до неотдавна за апатогенни *R. helvetica* и IRS3.
3. Около половината от кърлежите, свалени от домашни животни в Турция и Албания, бяха носители на рикетсии, главно *R. conorii*. Видовият им състав обаче не включваше вида *I. ricinus.*

4. Проследяването на заразеността с рикетсии на българските кърлежи *I. ricinus* показа стабилно висока степен на заразеност през годините на проучването (2003–2006).
5. Анализът на видовия състав на заразените кърлежи показа максимална степен на заразеност на *Rhipicephalus bursa* и *Dermacentor marginatus*, но рикетсии бяха доказвани във всички изследвани видове кърлежи.
6. Гризачите бяха заразени с рикетсии в значително по-ниска степен от кърлежите (средно 5%). Основно заразен беше видът *M. musculus*, което подсказва ролята на този вид като резервоар на рикетсиите.
7. Проучване върху болни с неясен фебрилен синдром разкри висока честота на инфекция с *R. conorii.* С най-висока честота, Марсилска треска беше доказана сред болните в регионите на Пловдив, Бургас и Русе.

## V. КОИНФЕКЦИИ

### 1. Коинфекции при кърлежи

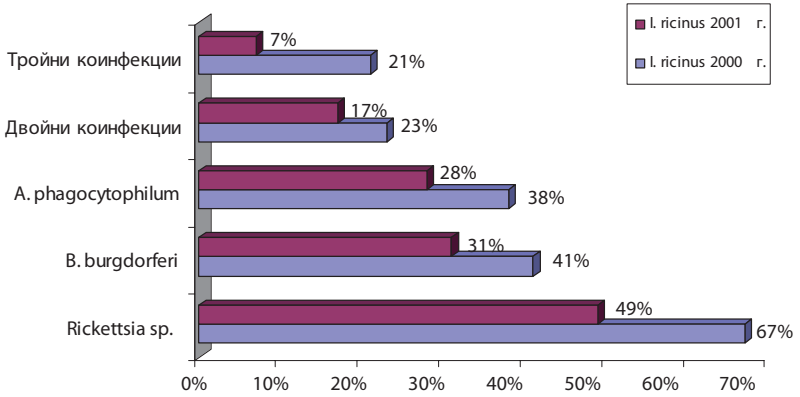
Високата степен на заразеност на българските кърлежи с различни бактериални патогени обуславя съществуването на коинфекции в тях, което предопределя възможност за едновременната им трансмисия по време на едно единствено ухапване от кърлеж.

**При първото проучване в страната** през 2000 г. за заразеност на кърлежи с борелии и анаплазми с помощта на PCR, бяха доказани коинфекции с борелии и анаплазми при 15 (13,4%) от изследваните 112 имаго форми и при 2 (2,2%) от нимфите (Табл.28).

**Таблица 28.** Резултати от *ankA* и *fla* PCR амплификациите за доказване на *A. phagocytophium*. и *B. burgdorferi* sensu lato ДНК в кърлежи *I. ricinus*

| Пол и стадий | Общо | Брой (%) кърлежи, инфектирани с: | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *A. phagocytophium* | *B. burgdorferi s.l.* | *A. phagocytophilum и B. burgdorferi s.l.* |
| Женски | 62 | 19 (30.6) | 20 (32.3) | 8 (12.9) |
| Мъжки | 50 | 19 (38) | 16 (32) | 7 (14) |
| Общо имаго | 112 | 38 (33.9) | 36 (32.1) | 15 (13.4) |
| Нимфи | 90 (18 пула) | 2 (2.2) | 9 (10) | 2 (2.2) |
| Общо | 202 | 40 (19.8) | 45 (22.3) | 17 (8.4) |

Това проучване е сред първите в Европа, доказващи едновременна инфекция с борелии и анаплазми в кърлежи. Степента на коинфектираност, установена от нас (13,4%), беше по-висока от съобщаваната до момента за Европа. Това първоначално проучване беше разширено върху кърлежи, събрани и през следващата година, като освен борелии и анаплазми, изследване се провеждаше и за носителство на рикетсии в кърлежите. Обхванати бяха общо 298 кърлежа, събрани в две последователни години – 2000 г. и 2001 г. Високата заразеност с рикетсии на изследваните кърлежи *I. ricinus* предопредели високата честота на коинфекциите. Коинфекции с два от патогените бяха намерени при 23% и 17% от възрастните кърлежи съответно от 2000 г. и 2001 г. При нимфите коинфекциите с два патогена бяха съответно 7% и 4%. Установени бяха и тройни коинфекции при възрастните кърлежи – съответно 21 % и 7 % (фиг. 31).




**Фиг. 31.** Инфекции и коинфекции с *Rickettsia* spp., *B. burgdorferi* sensu lato и *A. phagocytophilum* в кърлежи *I. ricinus*.

Подобни данни са указание за възможността от заразяване с няколко предавани с кърлежи патогени при едно ухапване от кърлеж и за промяна в клиничната картина на всяко от причиняваните от тях заболявания в случай на едновременна инфекция с два (или повече) патогена.

**В проучване на кърлежи през периода 2003–2006г.** сред изследваните от нас 1265 кърлежа от 5 вида от регионите на 10 града в страната бяха установени четири вида двойни инфекции: *B. burgdorferi + Rickettsia sp., A. phagocytophilum + Rickettsia sp. , F. tularensis + Rickettsia sp.*и *B. burgdorferi + A. phagocytophilum* (Табл. 29). Установени бяха и тройни инфекции с *B. burgdorferi + A. phagocytophilum + Rickettsia sp.*

Най-често срещана сред кърлежите беше коинфекцията с *B. burgdorferi* и *Rickettsia sp.* В региона на Сливница беше установена коинфекция с *Rickettsia sp.* и *F. tularensis* при 2,78% (1/36) от кърлежите *D. marginatus*, като засегнати бяха само мъжките кърлежи.

**Таблица 29.** Коинфекции сред кърлежите

| | Брой (%) заразени кърлежи | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *I. ricinus* | | | *D. marginatus* | *R. bursa* |
| | женски | мъжки | нимфи | | |
| София 2003 | B+R – 4/39 (10,26)<br>A+R – 2/39 (5,13)<br>B+A – 3/39 (7,69) | B+R – 1/25 (4,00)<br>B+A – 1/25 (4,00) | A+R – 1/32 (3,13) | | |
| София 2004 | B+R – 2/46 (4,35) | 0 | 0 | | |
| София 2005 | B+R – 2/52 (3,85)<br>B+A+R – 1/52 (1,92) | B+R – 1/35 (2,86) | 0 | | |
| София 2006 | B+R – 1/43 (2,33) | 0 | 0 | | |
| Добрич 2006 | 0 | 0 | B+R – 1/24 (4,17) | | |
| Стара Загора 2005 | | | | | B+R – 1/125 (0,8) |
| Сливница 2005 | | | | F+R – 1/36 (2,78) | |

Легенда: B-*Borrelia burgdorferi*, A-*Anaplasma phagocytophilum*, R- *Rickettsia SFG*, F-*Francisella tularensis*

## 2. Коинфекции при гризачи

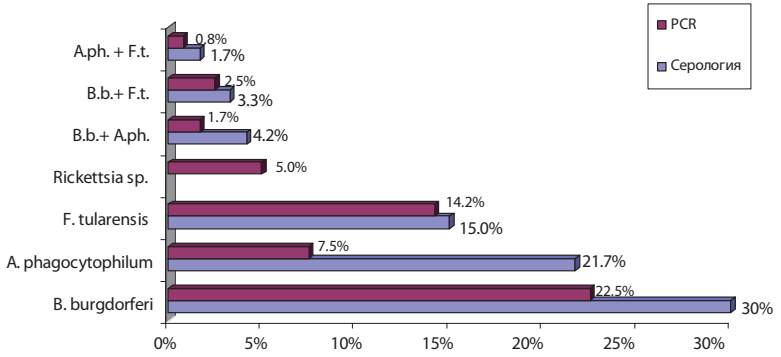
След като борелии и анаплазми споделят общи вектори, техните резервоари до голяма степен също ще се припокриват. Това предопределя възможността за пренасяне на коинфекции от общите резервоари.

Установените коинфекции при изследванията на 120 гризачи са илюстрирани на фиг. 32. Гризачите бяха изследвани серологично и с молекулярно-генетични техники за заразеност с причинителите на Лаймската борелиоза, човешката гранулоцитна анаплазмоза, туларемията и рикетсиозите от групата на петнистите кърлежови трески.

**Серологичните изследвания** показаха наличие на коинфекции при 11 от изследваните гризачи (9,2%) (фиг. 32). От тях, при 5 се доказа коинфекция на *A. phagocytophilum* и *B. burgdorferi*, при 4 се установи коинфекция на *B. burgdorferi* и *F. tularensis*, и в 2 на *A. phagocytophilum* и *F. tularensis*. Всички гризачи с коинфекция на *F. tularensis* с борелия или анаплазма произхождаха от региона на Перник.

Чрез **полимеразно-верижна реакция** коинфекции бяха потвърдени при 6 от изследваните гризачи (5%) (фиг. 32). Установени бяха три типа коинфекции – на *B. burgdorferi* и *A. phagocytophilum* при 2 гризача, на *B. burgdorferi* sensu lato и *F. tularensis* в 3 от изследваните гризачи и на *A. phagocytophilum* и *F. tularensis* в един от гризачите.

Комбинирането на различни методи за диагностика позволява по-цялостно разкриване на състоянието на проблема сред дивите гризачи.

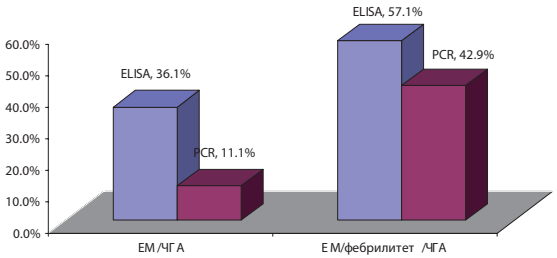



**Фиг 32.** Относителен дял на заразените гризачи и на откритите у тях коинфекции с кърлежово преносими бактериални патогени, установени серологично и с PCR.

## 3. Коинфекции при пациенти

Пациенти изследвахме за коинфекция само с борелии и анаплазми. Приложихме серологични (ELISA и имунофлуоресцентен тест) и молекулярно-генетични (PCR) техники.

Серологични данни за остра ЧГА (специфични ИгМ антитела) намерихме при 13 (36,1%) от изследваните 36 болни с еритема мигранс. С PCR доказахме генома *A. phagocytophilum* в кръвта на 4 (11,1%) от тези пациенти (фиг.33). Подобна находка категорично потвърждава възможността за коинфекция с двата патогена, *B. burgdorferi* и *A. phagocytophilum.*




**Фиг. 33.** Доказване на коинфекция с *B. burgdorferi* и *A. phagocytophilum* при болни с еритема мигранс.

При болните с еритема мигранс и фебрилитет, ЧГА е още по-вероятна. При 4 (57,1%) от 7 такива болни намерихме ИгМ антитела срещу *A. phagocytophilum,* а при 3 (42,9%) беше доказана *A. phagocytophilum* в кръвта (фиг.33).

Получените от нас серологични резултати, както и разработените от нас PCR системи за изследване на пациенти, потвърждават наличието на коинфекции с двата инфекциозни агента при лица след кърлежови ухапвания.

По-съществените изводи и обобщения от проучването на коинфекциите са следните:

1. Високата степен на заразеност на българските кърлежи с различни бактериални патогени обуславя съществуването на коинфекции в тях, което предопределя възможността за едновременната трансмисия на два (или повече) патогена.
2. Едно от първите проучвания в Европа върху заразеността на кърлежите *I. ricinus* с борелии и анаплазми, проведено от нас през 2000 г., установи коинфекции с двата патогена при 13,4% от имаго кърлежите.
3. Много по-често се откриват коинфекции в кърлежите, когато се включат и рикетсиите – 17–23% честота на коинфекциите. Най-често срещана беше коинфекцията *Rickettsia* sp./*Borrelia burgdorferi*, доказана при 7,8% от кърлежите, следвана по честота от коинфекцията *Rickettsia* sp./*Anaplasma phagocytophilum* – при 3,1% от кърлежите и *Rickettsia* sp./*Francisella tularensis*, установена при 2,78% от кърлежите само от вида *Dermacentor marginatus.*
4. Коинфекциите в кърлежите са свързани с коинфекции в техните гостоприемници, най-често дребните мишевидни гризачи. Със серологични техники установихме коинфекции при 9,2% от гризачите. С PCR коинфекции бяха потвърдени при 5% от гризачите.
5. Коинфекциите при гризачите и кърлежите обуславят възникването на коинфекции и при хората, което крие възможността за промяна в клиничната картина на всяко едно от предаваните с кърлежи заболявания.
6. Коинфекции на Лаймска борелиоза с ЧГА бяха установени със серологични техники при 36,1%, а с PCR – при 11,1% от изследваните болни с ранна Лаймска борелиоза (еритема мигранс).
7. При болните с еритема мигранс и фебрилитет, ЧГА е още по-вероятна. С PCR доказахме *A. phagocytophilum* при 42,9% от тези болни, а ИгМ антитела срещу *A. phagocytophilum* установихме при 57,1% от тях. Ето защо всеки случай на Лаймска борелиоза с атипично клинично протичане, особено с ясно изразен фебрилитет, насочва вниманието към евентуална едновременно протичаща анаплазмоза.

## РАЗДЕЛ ВИРУСНИ ИНФЕКЦИИ: ККХТ, ХТБС и КЕ

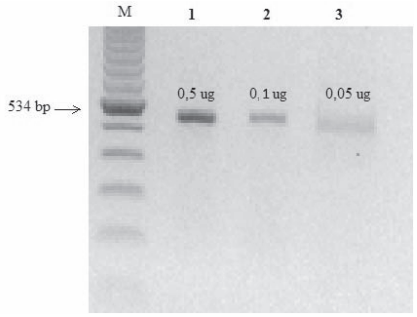
Кримската Конго хеморагична треска (ККХТ), хеморагичната треска с бъбречен синдром (ХТБС) и кърлежовият енцефалит (КЕ) са остри тежки инфекции със засягане и увреждане на редица органи и системи, които изискват надеждна, точна и бърза диагностика, каквато липсваше у нас. Ето защо разработихме Nested и Real time RT-PCR системи за откриване на вирусите, причинители на всяко едно от тези заболявания. Въведохме модерни ELISA тестове и имуноблот за серологична диагностика. Проведохме проучвания с въведените методи върху генетичните характеристики на вирусите – причинители на тези инфекции и върху разпространението им в България.

## I. КРИМСКА КОНГО ХЕМОРАГИЧНА ТРЕСКА

### 1. Разработване на RT-PCR системи за откриване на вируса на ККХТ

Разработени бяха праймерни системи, насочени към **малкия, средния и големия** сегмент РНК на вируса, причиняващ ККХТ. Сравнена беше специфичността и чувствителността на различните праймерни двойки.

Чувствителността на PCR системите беше определена на 0,05 μg, независимо от използваната праймерна система (фиг. 34).



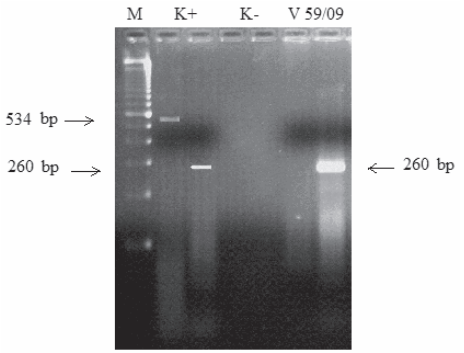

**Фиг. 34.** Амплификация на серийни разреждания на РНК от положителна контрола – РНК от вируса на ККХТ V 42/81, старт М – Маркер (100 bp DNA Ladder); старт 1 – 0,5 μg РНК; старт 2 – 0,1 μg РНК; старт 3 – 0,05 μg РНК.

### 1.1. Nested RT-PCR за откриване вируса на ККХТ

#### Nested RT-PCR за откриване на малкия (S) сегмент РНК на вируса на ККХТ

Използваните праймерни двойки F2–R3 и F3–R2 амплифицираха фрагменти на гена, кодиращ нуклеопротеина от вируса на ККХТ.

Разработената nested RT-PCR веднага започна да се прилага за доказване на вируса на ККХТ в клинични материали от болни, където доказа своята ефективност. На фиг. 35 е представена визуализацията на амплификационните продукти от двата цикъла при провеждане на nested RT-PCR с контролния ваксинален ККХТ щам и щам V 59/09 от пациент със съмнение за ККХТ. Специфичните ампликони с размер 260 bp при втория цикъл, доказват наличието на вируса на ККХТ в кръвта на изследвания пациент.



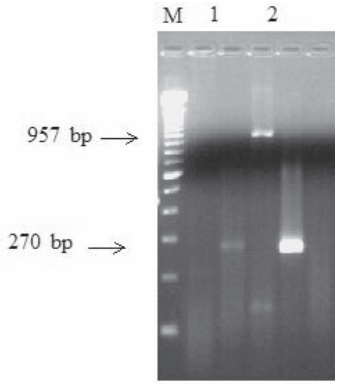

**Фиг. 35.** Гел-електрофореза на амплифицирани секвенции от региона на S-сегмента на РНК от вируса на ККХТ при пациент чрез праймерните системи F2–R3/ F3–R2. Старт М – Маркер (100 bp DNA Ladder); Старт К+ – Положителна контрола (ваксиналния ККХТ щам) – първи цикъл RT-PCR (вляво), втори цикъл nested-PCR (вдясно); Старт К- – Отрицателна контрола; Старт V 59/09 – проба от пациент със съмнение за ККХТ.

**Nested RT-PCR за откриване на средния (M) сегмент РНК на вируса на ККХТ**

Конструирани бяха две праймерни двойки Fow1641–Rev2598 и Fow1641–Rev1911, амплифициращи фрагменти на гена, кодиращ двата повърхностни гликопротеина G-1 и G-2 от вируса на ККХТ. Резултатът от втория цикъл на амплификация, ампликон с големина 270 bp, беше ясно видим на гел-елетрофорезата. РНК от средния М-сегмент на ККХТ вируса беше доказвана дори при отсъствие на видим PCR продукт от първия цикъл

С помощта на тази nested RT-PCR бяха изследвани контролните вирусни щамове V 53/05 и V 42/81 (ваксиналния щам) (фиг. 36).

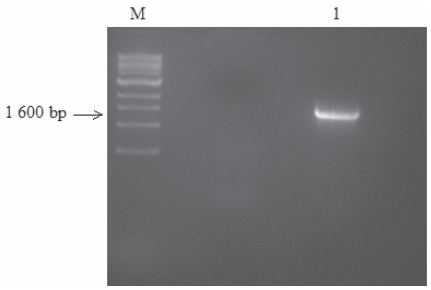
Разработената nested RT-PCR успешно започна да се прилага за откриване на вирусния геном в клинични материали от болни, включително ретроспективно.




**Фиг. 36.** Гел-електрофореза на продуктите от амплификацията на РНК от М-сегмента на вируса на ККХТ чрез nested RT-PCR. Старт М – Маркер (100 bp DNA Ladder). Стартове 1, ККХТ вирус V 53/05 – специфични ампликони с размер от 957 bp при първия цикъл, невидими в дадения случай (вляво) и 270 bp при втория цикъл (вдясно). Стартове 2, ККХТ вирус V 42/81 – видими специфични PCR продукти при първия (вляво) и втория цикъл (вдясно).

**Едностъпков RT-PCR за доказване на големия (L) сегмент РНК на вируса на ККХТ**

Разработена беше едностъпкова RT-PCR система, която откриваше специфичен участък от големия сегмент на генома на ККХТ вируса. Конструираната за целта праймерна двойка CCHFV_L1819F – CCHFV_L3419R амплифицира фрагмент на гена, кодиращ РНК-зависимата РНК полимераза на вируса на ККХТ (фиг. 37).



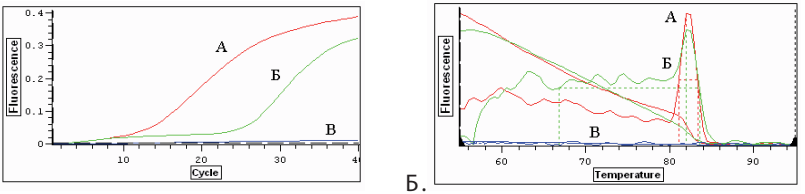

**Фиг. 37.** Гел-електрофореза на продукта от амплификацията на РНК от L-сегмента на вируса на ККХТ чрез едностъпков RT-PCR. Старт М – Маркер (1000 bp DNA Ladder). Старт 1 – Специфичен ампликон с размер от 1600 bp, доказващ наличието на вируса на ККХТ в контролната проба – ваксиналния щам V 42/81.

## 1.2. Real time RT-PCR за откриване на вируса на ККХТ

### Real-time RT-PCR за откриване на малкия (S) сегмент РНК от вируса на ККХТ

Амплификационните реакции бяха провеждани с помощта на Script One-Step RT-PCR Kit With SYBR® Green I (BIO-RAD, САЩ), следвайки протокола на производителя. Приложени бяха праймерните системи F2–R3, намерени за ефективни при конвенционалните варианти на RT-PCR.

На фиг. 38 са представени кривите на нарастване на флуоресцентното излъчване (фиг. 38 А) и анализа на кривите на топене (фиг. 38 Б) на ваксиналния щам V42/81, служещ като контрола и ККХТ щам от болен V 59/09 при Real-time RT-PCR за доказване на малкия сегмент на вируса с праймерната двойка F2–R3. Анализът на кривите на топене на получените амплификационни продукти доказва тяхната специфичност. Липсваха допълнителни пикове от неспецифични продукти.

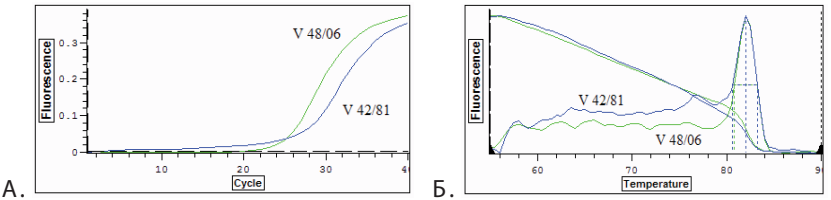



**Фиг. 38.** Real-time RT-PCR за доказване на вируса на ККХТ при пациент V59/09. (**А.**) Пропорционално нарастване на флуоресцентното излъчване при амплификацията с праймерната двойка F2–R3. Положителна контрола – (А). Проба от пациент – V 59/09 – (Б). Отрицателна контрола – (В). (**Б.**) Сравнение на кривите на топене на PCR продуктите, получени при амплификация на специфичната вирусна РНК.

Разработената SYBR Green RT-PCR система за доказване на малкия сегмент на вируса на ККХТ се оказа много ефективен метод за откриване на вируса в клинични материали. Методът позволи бърза и надеждна диагностика още в първите дни от изявата на ККХТ, което улесни подхода и терапията при тези болни.

### Real time RT-PCR за откриване на средния (М) сегмент РНК от вируса на ККХТ

За доказване на средния сегмент от вируса на ККХТ беше разработена и въведена SYBR Green real-time RT-PCR с праймерната двойка Fow1641–Rev2598. На фиг. 39 е представено доказването на специфичния 957 bp амплификационен продукт от средния М сегмент на вируса на ККХТ от контролния ваксинален щам V42/81 и вирус от кръвта на пациент V 48/06.




**Фиг. 39.** SYBR Green Real-time RT-PCR за доказване на средния сегмент на вируса на ККХТ с праймерната двойка Fow1641–Rev2598. **(А)** Пропорционално нарастване на флуоресцентното излъчване при амплификациите на образуваните ампликони от ККХТ вируса от кръвта на пациент V 48/06 и от ваксиналния ККХТ щам V 42/81; **(Б)** Специфичност на амплификационните продукти чрез анализ на кривата на топене.

С метода nested RT-PCR диагнозата може да се потвърди или отхвърли в рамките на 2 работни дни. С real-time RT-PCR диагнозата може да се постави в рамките на няколко часа след получаване на клиничните материали при амплификация само с първата праймерна двойка и откриване на минимални количества специфично флуоресцентно излъчване по време на амплификацията след сравнение на кривата на топене на PCR-продукта.

В резюме, от въвеждането на молекулярно-вирусологични методи за модернизиране на диагностиката на ККХТ, могат да се направят следните основни изводи:

1. Разработени са първите у нас nested RT-PCR системи за откриване на малкия (S) и средния (M) и едностъпкова RT-PCR система за откриване на големия (L) сегмент РНК на вируса на ККХТ. Конструирани са необходимите праймери, които осигуряват висока чувствителност и абсолютна специфичност. Уточнени са условията за амплификация и амплификационните режими.
2. Оптимизираните RT-PCR се прилагат успешно за доказване на вируса на ККХТ в клинични материали от болни, както и за ретроспективни анализи.
3. Разработени са първите в България Real time RT-PCR системи за доказване на вируса на ККХТ на основата на конструираните за nested RT-PCR праймерни двойки, доказали своята ефективност. Уточнени са протоколите за амплификация и амплификационните режими.
4. Real time RT-PCR системите позволяват надеждна и много бърза диагностика при изследване на клинични материали от болни със съмнение за ККХТ. Високата им специфичност се постига при сравняване кривите на топене с положителната контрола. Бързината на теста се дължи на амплификацията само с първата праймерна двойка и отпадане на процедурите по визуализацията на продуктите.

## 2. Генетична характеристика на ККХТ вирусите, циркулиращи в България

С цел проучване на генетичните характеристики на циркулиращите в България ККХТ вируси, получените при амплификационните процедури PCR-фрагменти бяха секвенирани. Получените секвенции бяха сравнени с известните до момента и така за първи път беше направен филогенетичен анализ на доказаните в българските пациенти вируси на ККХТ.

Първите проучвания върху филогенетичните отнасяния на вирусите, причиняващи ККХТ в България, бяха направени върху 6 вирусни щама от пациенти с ККХТ, инфектирани в периода 2002–2003 г. С nested RT-PCR с двете праймерни двойки F2–R3 и F3–R2 бяха амплифицирани фрагменти от S сегмента на ККХТ вирусния РНК геном. PCR-продуктите бяха секвенирани. Нуклеотидните секвенции бяха изпратени в базата данни на GenBank под номера AY550253–AY550258. След алиниране на българските секвенции с известните в GenBank, беше построено филогенетично дърво (фиг.40).

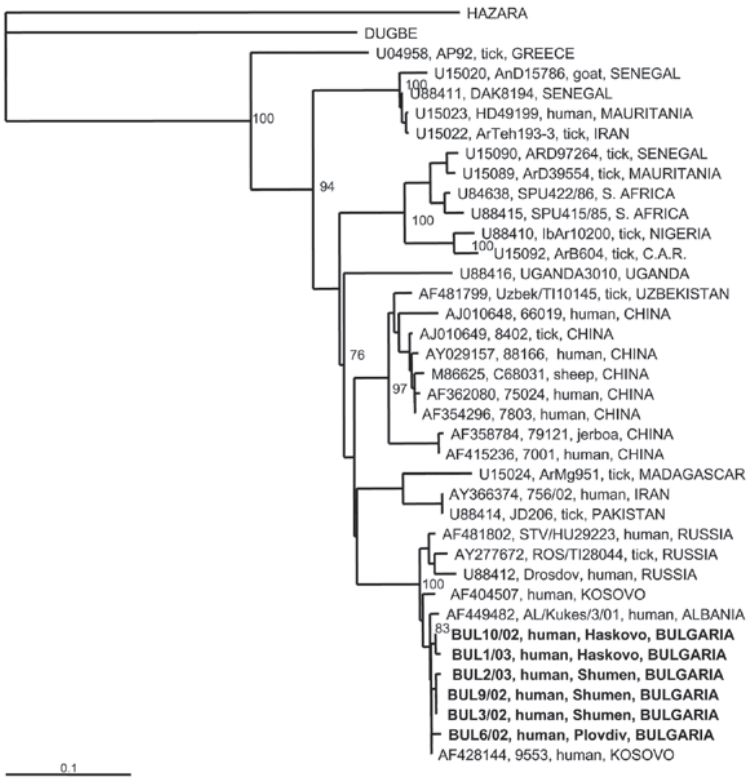
Шестте български щама попадаха в един клъстер с много висока степен на хомоложност помежду си – от 98,4% до 100% на нуклеотидно ниво. Установено беше, че българските ККХТ щамове са с висока степен на хомоложност с тези от Косово и Албания, с генетични различия 2% и 1,2% съответно. Всички щамове от Балканите попадат в един клон с тези от Европейската част на Русия.

Европейската група е монолитна, с минимални генетични различия, но се различава съществено от изолатите в другите континенти (Азия и Африка). Единственото изключение е гръцкият щам AP92, изолиран от кърлежи *R. bursa* през 1975 г., който формира самостоятелен клон (с генетично различие от българските щамове 24%). Филогенетичното проучване на българските щамове показа, че щамовете в даден регион са почти идентични.

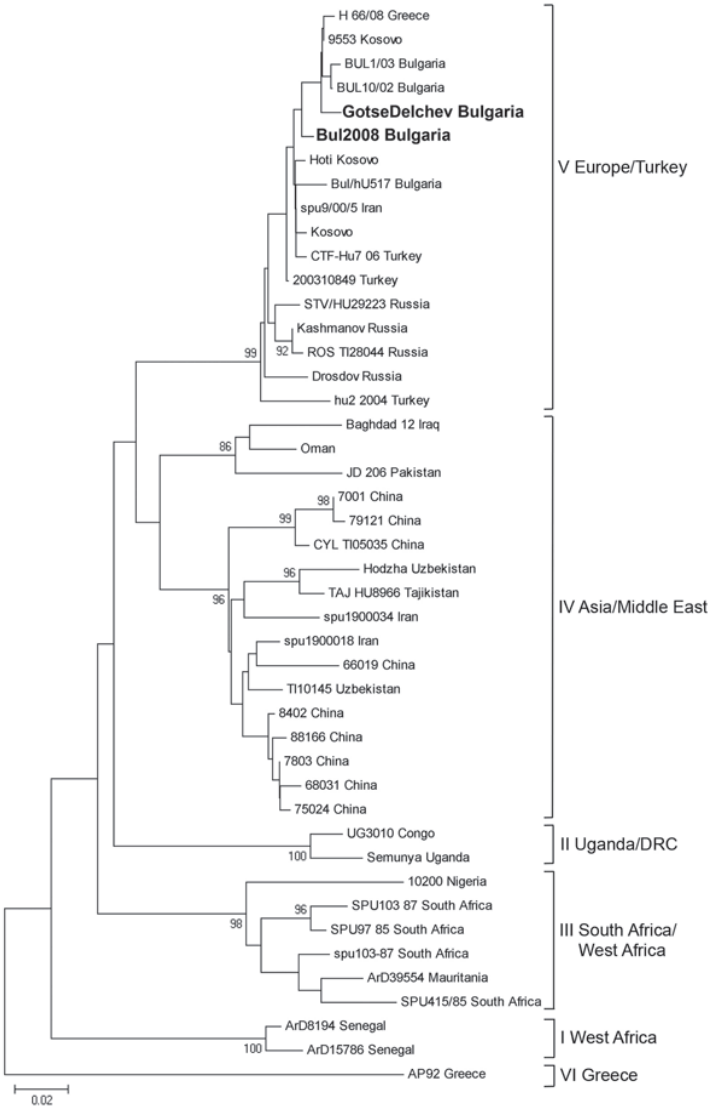
Проследена беше **генетичната вариабилност** на щамове ККХТ от България в течение на времето. Пет години по-късно, през пролетта на 2008 г., беше идентифициран етиологичният агент на епидемичен взрив в гр. Гоце Делчев, област Благоевград. Болните бяха клинично неясни, проявата на ККХТ – много нетипична. При двама от болните успешно амплифицирахме специфичен РНК участък от S-сегмента на ККХТ вируса с въведения RT-PCR тест. Пречистените продукти от PCR-амплификациите на ККХТ вирусната РНК от кръвта на двамата болни бяха секвенирани и изпратени в GenBank под номера FJ160262 и FJ445749. На построеното филогенетично дърво (фиг. 41) тези секвенции попадаха в Европейско-Турския клон. Генетичното различие между двата щама беше 1,15% на нуклеотидно ниво, но на аминокиселинно ниво бяха идентични. Спрямо предишните проучени български изолати от 2002–2003 г., тези два щама показаха 96,4%-98,8% генетично сходство. Различията им спрямо изолата от Косово 9553/2001 бяха съответно 0,8% и 2,0%, а от Гръцкия щам 66/08 – 1,2% и 2,4%.

Може да се направи заключението, че **ККХТ вирусите еволюират сравнително бавно**, поради което между щамовете в даден регион се регистрират минимални генетични различия във времето.

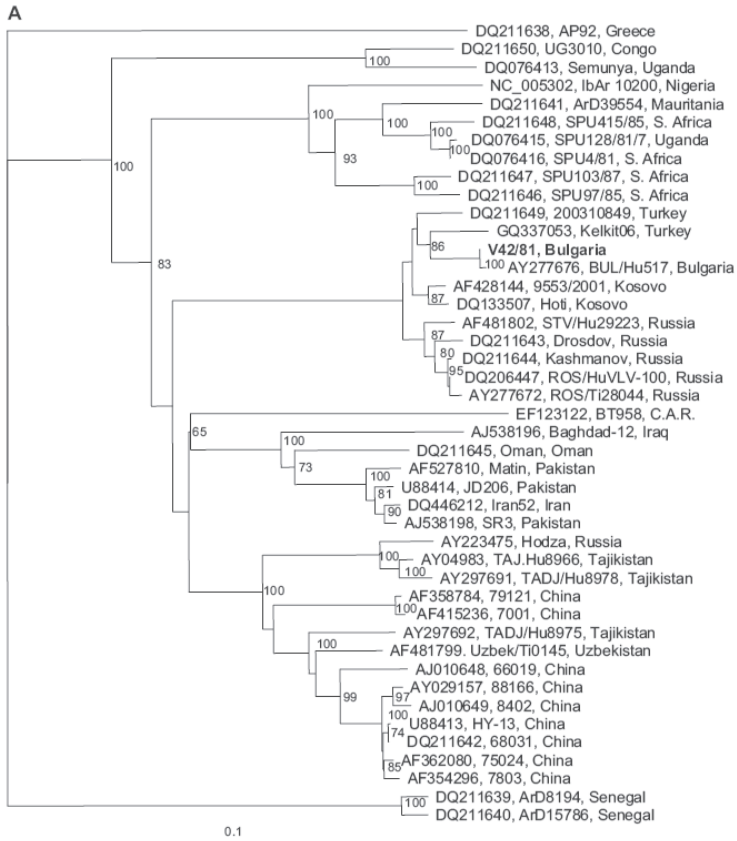
Уникалната българска ваксина срещу ККХТ съдържа инактивиран ваксиналния щам V42/81, изолиран от кръвта на пациент през 1981 г. **Генетичната характеристика на ваксиналния щам** беше проучена чрез секвениране на целия S-сегмент, целия M-сегмент и частично на L-сегмента на вирусния РНК геном. Целият S-сегмент се оказа с дължина 1673 нуклеотида, а кодираният от него протеин – с 482 аминокиселини. M-сегментът беше 5353 нуклеотида, с една отворена рамка на четене (ORF) от 1688 аминокиселини. От L-сегмента беше секвениран участък от 474 bp. Секвенциите бяха изпратени в GenBank под номера GU477489, GU477490 и GU477491. Секвенциите бяха алинирани със съответните в GenBank с Clustal W и беше направен филогенетичен анализ с DNAdist, Neighbor and Consense програмата на PHYLIP софтуера.




**Фиг. 40.** Филогенетично дърво, построено на основата на 260 bp фрагмент от малкия S-сегмент от РНК на ККХТ вирусите, показващо клъстера със секвенциите от проучването на 6–те български ККХТ вирусни изолата. Генетичните линии и сублинии бяха потвърдени чрез 100 повторения (bootstraps), а хоризонталните дистанции са пропорционални на нуклеотидните различия. Щам Hazara беше използван за разклоняване на дървото и обособен като извънгрупов.

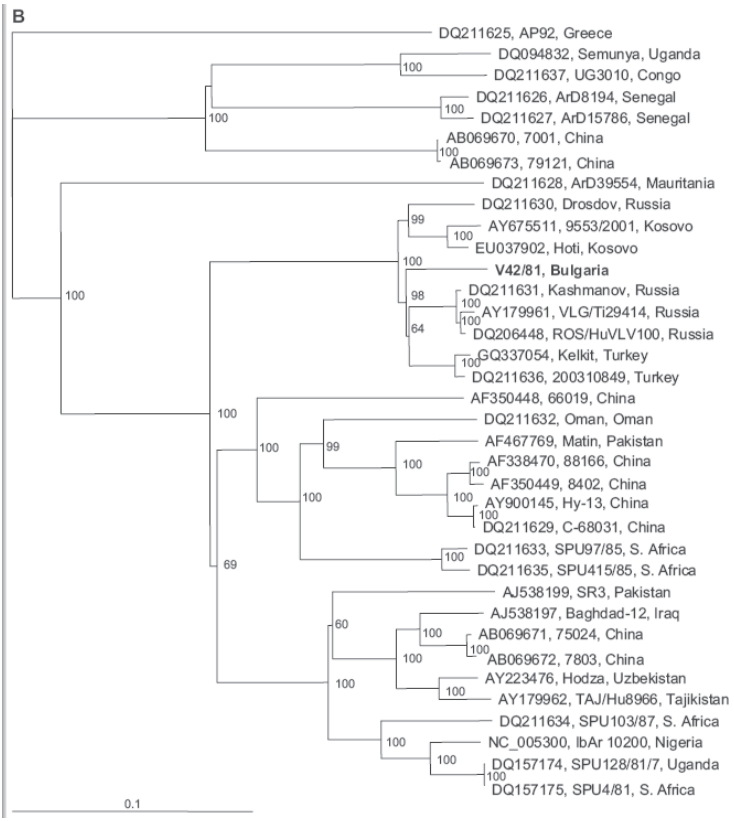



**Фиг. 41.** Филогенетично дърво, построено на основата на 260 bp фрагмент от малкия S-сегмент от РНК на ККХТ вирусите, показващо секвенциите от проучването на двата ККХТ вирусни изолата от епидемичния взрив в Гоце Делчев през 2008 г. Генетичните линии и сублинии бяха потвърдени чрез 100 повторения (bootstraps), а хоризонталните дистанции са пропорционални на нуклеотидните различия. Гръцкият щам AP92 беше използван за разклоняване на дървото и обособен като извънгрупов.




**Фиг. 42.** Филогенетично дърво, основано на:
(A) ORF на S-РНК сегмента на ККХТ вируса; (B) ORF на M-РНК сегмента на ККХТ вируса; (C) 474 bp фрагмент на L-РНК сегмента на ККХТ вируса. Генетичните линии и сублинии бяха потвърдени чрез 100 повторения (bootstraps), а хоризонталните дистанции са пропорционални на нуклеотидните различия. Гръцкият щам AP92 беше използван за разклоняване на дървото и обособен като извънгрупов.

Филогенетичните дървета, демонстриращи генетичното родство на ваксиналния щам V42/81 съответно по цялата отворена рамка на четене (ORF) на S- и M-РНК сегментите и частичния L-РНК сегмент са показани на фиг. 42 A, B, C. При трите филогенетични анализа щам V42/81 попада в една група с изолираните в Югоизточна Европа, Русия и Турция щамове (Европейско-Турска група).

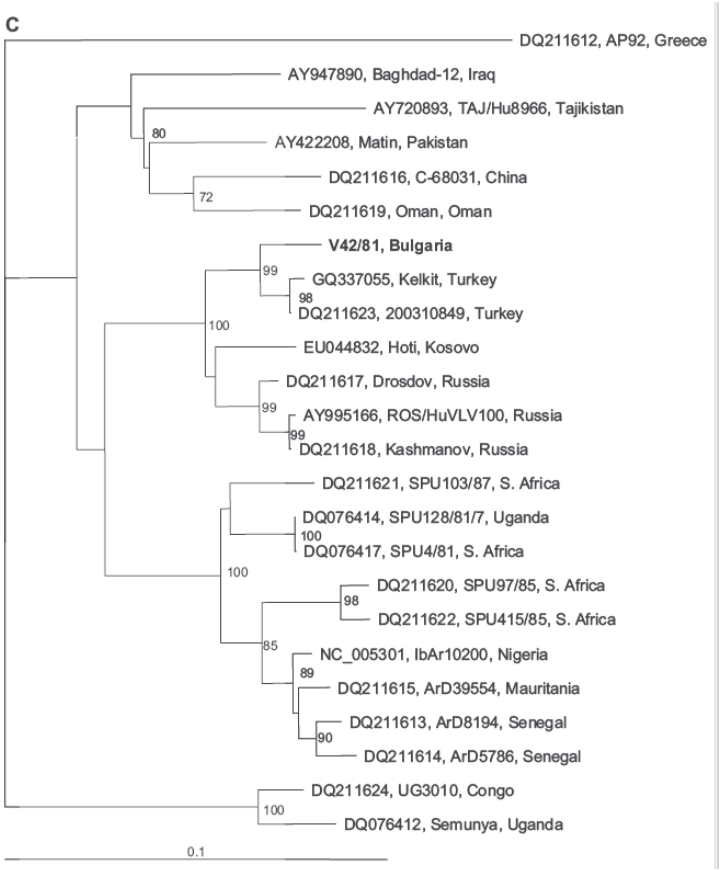



**Фиг. 42**B

Генетичните различия на щам V42/81 спрямо щамовете, изолирани в Косово, Русия и Турция бяха 2%-2,9% в S-сегмента и 5,6%-7,1% в M-сегмента на нуклеотидно ниво и съответно 0,8%-1,8% и 5,4%-7,4% на аминокиселинно ниво. По секвенциите на S-сегмента, ваксиналният щам V42/81 генетично е най-близо до щам Bul/Hu517, изолиран от пациент през 1978 г. и до щам BUL6/02, изолиран от пациент през 2002 г. (фиг 42 A).

По отношение на L-РНК сегмента, щам V42/81 отново попадаше в един клъстер с щамовете от Турция, а щамовете от Косово и Русия оформяха друг генетично близък клъстер (фиг 42 C).

По отношение на M-сегмента картината беше малко по-различна – максимално беше сходството с изолираните в Русия щамове и след тях с тези от Косово и Турция (фиг 42 B). Трябва да се има предвид, че M-сегментът на ККХТ вирусния геном е най-силно изложен на имунна селекция и пренареждане.




**Фиг. 42**C

С това могат да се обяснят различията. Различията са между съседни клъстери, но не и групи, което показва, че пренаражданията са минимални

След филогенетичния анализ на вируси, изолирани през 2002–2003 г., генетичната вариабилност на нашите ККХТ вируси беше проследена чрез анализ на три други вирусни щама, изолирани от пациенти съответно през 2005, 2006 и 2009 г. (V 53/05; V 48/06 и V 59/09), които също бяха амплифицирани в областта на S-, M- и L- РНК сегментите на вируса на ККХТ. Филогенетичният анализ на S-сегмента потвърди принадлежността на трите български ККХТ изолата към линия V, отнасяща се към групата на Европейско-Турската географска линия. Българските щамове бяха с много висок процент на хомоложност помежду си и с минимални различия от щамовете, изолирани от Шумен и Хасково през 2002/2003 г.

Накратко, в резултат от проучванията върху генетичната вариабилност на циркулиращите в България ККХТ щамове можем да заключим следното:

1. Още първото проучване на български ККХТ вируси, извършено от нас през 2003 г., показа, че българските ККХТ щамове са с висока степен на хомоложност помежду си и филогенетично са най-близо до тези от Косово и Албания. Попадат в един клон с тези от Европейската част на Русия.
2. Последвалите проучвания на ККХТ щамове, изолирани от кръвта на пациенти през следващите години, разкриха генетичната стабилност на причиняващите ККХТ в България вируси. Предвид минималните генетични различия между тях в течение на времето, може да се заключи, че ККХТ вирусите еволюират сравнително бавно.
3. Пълното секвениране на S-сегмента на вирусната РНК на ваксиналния щам V 42/81 показа, че е с обща дължина 1673 нуклеотида и кодира протеин с големина 482 аминокиселини. Пълното секвениране на М-сегмента показа дължина от 5353 нуклеотида, кодиращ протеин от 1688 аминокиселини.
4. Филогенетичният анализ на ваксиналния щам V42/81, съответно по отношение на малкия, средния и големия му РНК сегмент показа, че той попада в една група с изолираните в Югоизточна Европа, Русия и Турция щамове (Европейско-Турска група).

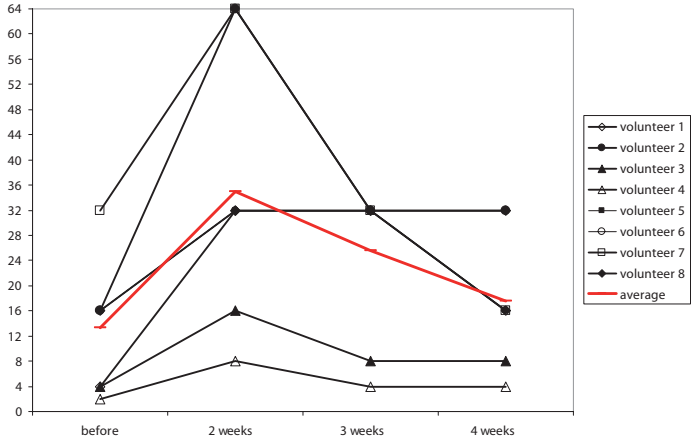
## 3. Проучвания върху антитяло отговора срещу българската ККХТ ваксина

Проследена беше продукцията на антитела срещу вируса на ККХТ след ваксиниране с българската ваксина срещу ККХТ при 12 лица. От тях 8 бяха многократно имунизирани и реимунизирани (група 1), а 4 лица бяха с незавършен цикъл на имунизация (група 2) – направени бяха само първата и втората доза от ваксината (ден 0 и 30). Лицата от група 1 бяха изследвани преди поредната бустер-доза и трикратно след това през едноседмични интервали. Лицата от група 2 бяха изследвани 3 седмици преди и 3 седмици след последната, завършваща имунизацията доза (1 година след първата). Изследванията бяха проведени паралелно с РСК и ELISA.

Резултатите са представени на следващите фигури.

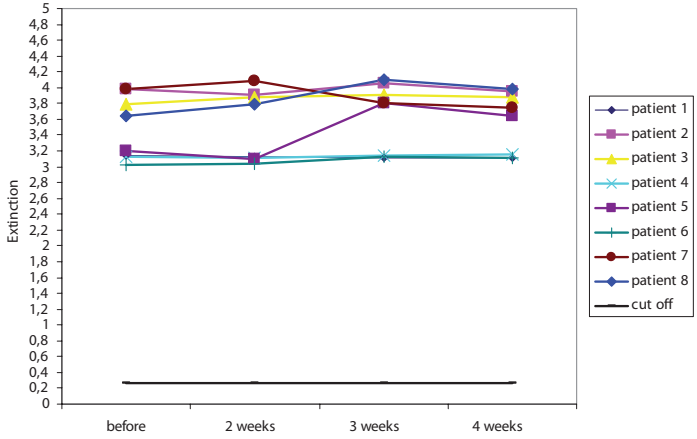
**Група 1.** Всички лица от група 1 имаха сигнификантно повишено ниво на специфичните антитела, което илюстрира ефективността на ваксината. Проследяването на динамиката на антитяло отговора показа различия при изследване с РСК и с ELISA.

С **Реакция свързване на комплемента** (РСК) бяха намерени изходни титри от 1:2 до 1:16 преди поредната бустер-доза, а след нея титрите на специфичните антитела се повишиха от 1:8 до 1:64 (фиг. 43).




**Фиг. 43**. Резултати от изследването с РСК за доказване на антитела срещу вируса на КККТ при ваксинираните лица от група 1. Нива на антителата преди поредната ре-имунизация и на едноседмични интервали след нея.

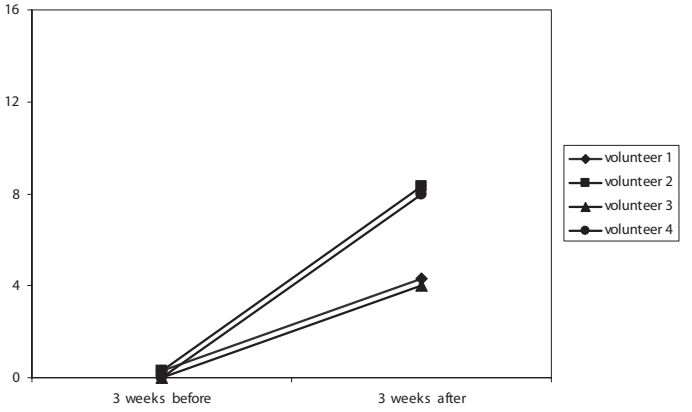
Резултатите от **ELISA** показаха много високи нива на специфичните антитела дори преди поредната бустер-доза, които не показаха съществена динамика след ре-имунизацията (фиг. 44). При всички изследвани лица бяха доказани само ИгГ, но не и ИгМ антитела. По-големият брой положителни резултати с ELISA може да се свърже със способността на метода да открива широк спектър антитела, а не само комплемент-свързващите като РСК.




**Фиг. 44**. Резултати от изследването с ELISA за доказване на антитела срещу вируса на КККТ при ваксинираните лица от група 1. Нива на антителата преди поредната ре-имунизация и на седмични интервали след нея.

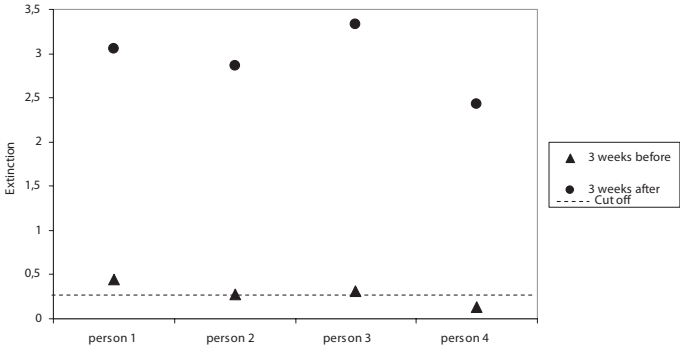
**Група 2.** При четиримата доброволци от втората група изследвани лица беше намерено рязко повишаване в нивата на специфичните антитела при изследване и с двата серологични метода.

С **РСК** не бяха доказани антитела срещу вируса на ККХТ непосредствено преди последната доза, необходима за завършване на ваксинирането. Три седмици след последната доза при двама бяха доказани титри 1:4 и при другите двама 1:8 (фиг. 45).




**Фиг. 45**. Резултати от изследването с РСК за доказване на антитела срещу вируса на ККХТ при непълно ваксинираните лица от група 2. Нива на антителата 3 седмици преди и 3 седмици след последната ваксинална доза.

Изследването с **ELISA** доказа наличие на антитела, но в много ниски нива при двама от доброволците, при един антителата бяха в гранични стойности и при един не се доказаха изобщо преди последната ваксинална доза. Три седмици след нея при четиримата доброволци се доказаха много високи нива на специфичните антитела (фиг. 46).




**Фиг. 46**. Резултати от изследването с ELISA за доказване на антитела срещу вируса на ККХТ при непълно ваксинираните лица от група 2. Нива на антителата 3 седмици преди и 3 седмици след последната ваксинална доза.

Липсата или минималните нива на специфичните антитела при лицата с незавършен ваксинационен процес показват, че последната, трета доза, 1 година след първата, е абсолютно необходима за изграждане на необходимия имунитет.

Предприетите проучвания върху антитяло отговора след ваксиниране на доброволци показаха наличието на сигнификантни нива на специфичните антитела при ваксинираните лица.

Основните изводи, които се налагат от проведените проучвания върху имуногенността на българската ваксина срещу ККХТ, са:

1. Резултатите от проследяването на антитяло отговора при многократно ваксинирани доброволци показаха наличие на специфични антитела във високи титри, както преди, така и след поредната ре-имунизация, т.е. налице е стабилен хуморален отговор на организма.
2. При ваксинирани лица с незавършен цикъл на имунизация, антителата са в минимални количества и се повишават след завършване на имунизационния процес.
3. Възможностите на ELISA за доказване на специфичните антитела срещу вируса на ККХТ бяха по-големи в сравнение с тези на РСК, което е свързано с по-широкия спектър на антителата, които ELISA открива.

## 4. Проучвания върху разпространението на вируса на ККХТ сред домашни животни в ендемично огнище

Домашните животни са резервоар на вируса на ККХТ. Инфекцията при тях по правило е безсимптомна или с минимална изява. Поддържайки вируса в себе си, те заразяват нападащите ги кърлежи, които предават вируса на човека.

Направихме проучване върху домашни животни от ендемично огнище – района на гр. Айтос (селата Тополица и Карагеоргиево). Взехме серумни проби от общо 392 животни – крави, овце, магарета и кози. Точният им брой е отразен в табл. 30. Разработени бяха въпросници за необходимата информация относно вида, възрастта, пола и произхода на животните. Приложихме ELISA тест с антиген от ККХТ вирусен щам IbAr 10200 (NAMRU #3) и антивидов серум, конюгиран с пероксидаза.

**Таблица 30.** Серопревалиране на ККХТ вируса в домашни животни в района на гр. Айтос

| | Крави | Овце | Магарета | Кози |
|---|---|---|---|---|
| Общ брой изследвани | 127 | 242 | 8 | 15 |
| Брой положителни | 90 | 179 | 4 | 9 |
| Процент на положителните | 71% | 74% | 50% | 60% |

ИгГ антитела срещу вируса на ККХТ доказахме средно при 72% от изследваните домашни животни (282/ 392) (Табл. 30). При овцете този процент беше най-висок – 74%, а най-нисък беше при магаретата – 50%.

Анализът на данните за възрастовата структура на изследваните животни показа, че около половината от животните на възраст до една година вече са имали среща с вируса на ККХТ, като след 2–годишната им възраст процентът на серологично положителните нараства над 80% (Табл. 31).

**Таблица 31.** Възрастово разпределение на заразените с вируса на ККХТ домашни животни в околностите на гр. Айтос

| | < 1 год. | 1 год. | 2 год. | 3 год. | 4 год. | 5–6 год. | 7+ год. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Общо изследвани | 21 | 92 | 70 | 47 | 57 | 44 | 48 |
| % ИгГ положителни | 28% | 48% | 80% | 87% | 79% | 93% | 90% |

Всички животни бяха местни, т.е. родени в България, нямаше вносни животни. Ето защо резултатите от това изследване са показател за риска, който съществува за хората от региона. Последните регистрирани случаи на ККХТ в тези две села са от преди 10 години, но очевидно огнището е активно. Трябва се има предвид възможността заболяването да е далеч почесто в района, но да протича като неясно фебрилно състояние, поради което и да не се регистрира официално.

Нашите изследвания разкриха високия потенциален риск за хората от региона, независимо от липсата на клинични случаи в последните години.

## 5. Проучвания върху разпространението на вируса на ККХТ сред хората в България

Серумни проби от общо 1018 здрави кръводарители или болни с други заболявания от 13 населени места (области) в България, бяха изследвани за наличие на ИгГ антитела срещу вируса на ККХТ. Подробно данните за броя изследвани лица от всяка област и намерените при това резултати са представени на Табл. 32. В пет от областите доказахме циркулиране на вируса на ККХТ. Средният процент на серопревалиране на ККХТ след изследваната популация беше 3,2% (32 сероположителни от 1018 изследвани лица).

В зависимост от процента на серологично положителните спрямо общия брой на изследваните лица в дадена област, се оформиха три основни категории области:

1) области с висок процент на серопревалиране – с пример област Бургас. При изследване на 200 лица бяха намерени 17 серологично положителни, т.е. 8,5%.
2) области с умерено висока степен на серопревалиране – областите Кърджали, Хасково и Пазарджик, при които относителният дял на серологично положителните беше съответно 6%, 4.6% и 5.8%.
3) области с ниска степен на серопревалиране – областите Сливен, Русе, Благоевград, в които серологично положителните съставляваха 2% и 1% от общия брой изследвани лица.

**Таблица 32.** Серопревалиране на КХТ сред хората в различни области на България

| Област | Брой изследвани лица | Брой/ % полож. | Данни за ухапване от кърлеж | | Отглеждане на животни | | Контакт с животни | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | При серо(+) Брой/ % | При серо(-) Брой/ % | При серо(+) Брой/ % | При серо(-) Брой/ % | При серо(+) Брой/ % | При серо(-) Брой/ % |
| Бургас | 200 | 17/8,5% | 6/ 35,3% | 28/ 15,3% | 7/41,2% | 20/ 10,9% | 5/29,4% | 56/ 30,6% |
| Сливен | 50 | 1/ 2% | 1/ 100% | - | - | 11/ 22,4% | 1/ 100% | 14/ 28,6% |
| Стара Загора | 36 | 0 | 0 | 6/ 16,7% | - | 7/19,4% | - | 11/ 30,6% |
| Шумен | 50 | 0 | 0 | 8/ 16% | - | 11/ 22% | - | 15/ 30% |
| Смолян | 46 | 0 | 0 | 8/ 17,4% | - | 10/ 21,7% | - | 15/ 32,6% |
| Ямболl | 60 | 0 | 0 | 9/ 15% | - | 12/ 20% | - | 12/ 20% |
| Кърджали | 50 | 3 / 6 % | 2/ 66,7% | 8/ 17% | 1/ 33,3% | 10/ 21,3% | 1/ 33,3% | 14/ 29,8% |
| Пазарджик | 52 | 3/ 5,8 % | 1/ 33,3% | 8/ 16,3% | 1/ 33,3% | 10/ 20,4% | - | 15/30,6% |
| София | 116 | 0 | 0 | 17/ 14,7% | - | 16/ 13,8% | - | 34/ 29,3% |
| Плевен | 50 | 0 | 0 | 9/ 18% | - | 11/ 22% | - | 14/ 28% |
| Русе | 100 | 2 / 2% | 1/ 50% | 15/ 15,3% | 1/ 50% | 22/22,4% | 1/ 50% | 32/ 32,7% |
| Хасково | 108 | 5/ 4,6% | 3/ 60% | 17/ 15,7 % | 2/ 40% | 19/ 18,4% | 3/ 60% | 26/ 25,2% |
| Благоевград | 100 | 1 / 1% | 1/ 100% | 16/ 16,2% | 1/ 100% | 22/22,2% | 1/ 100% | 31/ 31,3% |
| ОБЩО | 1018 | 32/3,1% | 15/ 46,9% | 149/ 15,1% | 13/40,6% | 181//18,4% | 12/37,5% | 289/ 29,3% |

В областите: София, Стара Загора, Шумен, Ямбол, Смолян, Плевен не бяха открити серологично положителни за ККХТ лица.

Нямаше различия в серопревалирането между мъже и жени – 3,6% срещу 2,3% (p>0.05). Нямаше различия и между отделните възрастови групи.

Анализът на рисковите фактори сред серологично положителните за ККХТ лица показа категорично, че живеещите в област Бургас (OR 5.41, 95% CI 2.33–12.57), заетите с отглеждането на животни (OR 3.26, 95% CI 1.42–7.5), и хората с анамнеза за ухапвания от кърлежи (OR 4.94, 95% CI 2.16–11.29), са изложени на значително по-голям риск от заразяване с вируса на ККХТ, т.е. това са рисковите фактори за инфектиране с вируса на ККХТ.

В заключение, направеното проучване върху серопревалирането на ККХТ в България, разкри циркулацията на вируса и оформилите се ендемични огнища, които са с различна активност и ефективност. То показа и какъв голям дял могат да имат безсимптомните или малосимптомните инфекции с вируса на ККХТ.

## II. ХАНТАВИРУСИ

Хеморагичната треска с бъбречен синдром (ХТБС) е вирусна хеморагична треска с висок леталитет, при която обаче не кърлежите, а заразените гризачи играят основна роля за разпространението на вируса.

В Европа три вида хантавируси се свързват с предизвикването на ХТБС: Пумала (PUUV), Добрава (DOBV) и Саарема (SAAV). Вирусите Пумала и Саарема се свързват с по-леки форми на заболяването и се описват като *епидемична нефропатия* в страни от Централна и Северна Европа. Вирусът Добрава причинява по-тежка инфекция, *хеморагична треска с бъбречен синдром*, и се описва в страни от Централна и Югоизточна Европа. У нас, обаче, липсваха молекулярно-вирусологични проучвания, потвърждаващи циркулирането на определен тип или типове хантавируси. Освен това, рутинната серологична диагностика се опираше само на реакция свързване на комплемента (РСК), с която се изпускат голяма част от антителата, което води до фалшиво-отрицателни резултати.

### 1. Оптимизиране на серологичната диагностика на хантавирусните инфекции в България

С въвеждането на ELISA не само разширихме диагностичния обхват на серологичната диагностика, но стана възможно и определяне на типа хантавирус при хантавирусна инфекция. Допълнително, тези реакции бяха прецизирани с въвеждане на имуноблот тестове за потвърдителна диагностика.

Проведени бяха изследвания с поливалентни и типово-специфични ELISA тестове, както и с имуноблот за потвърждаване или отхвърляне на ELISA-позитивните резултати.

Сравнени бяха възможностите на въведените методи с тези на рутинно използваната до момента РСК. Общо 44 серумни проби от болни, суспектни за хантавирусна инфекция, бяха тествани паралелно с РСК, поливалентна ELISA, типово-специфична ELISA и имуноблот.

Двата теста, ELISA и РСК, показаха 75% (33/44) съвпадение на резултатите. РСК-положителните резултати бяха потвърдени от ELISA при 16/23 (69,6%) от изследваните проби. Допълнително, 4/21 (19%) от отрицателните чрез РСК проби бяха намерени за положителни с ELISA (Табл. 33).

С типово-специфична ELISA се доказа реактивност към хантавирус тип Добрава. На практика всички изследвани серуми, отчетени като ELISA-положителни бяха с антитела само срещу хантавирус тип Добрава.

**Таблица 33**. Сравнителни възможности на ELISA и РСК за откриване на антитела срещу хантавируси

| Резултати | РСК положителни | РСК отрицателни | Общо |
|---|---|---|---|
| ELISA положителни | 16 | 4 | 20 |
| ELISA отрицателни | 7 | 17 | 24 |
| ОБЩО | 23 | 21 | 44 |

На следващия етап беше изследвана серумната реактивност чрез имуноблот (lineblot) тест. Имуноблотът не потвърди само 2 от 20 (10%) ELISA-позитивни проби. Общо имуноблот тестът показа същата реактивност като ELISA при 24 от 26 (92,3%) изследвани проби (табл. 34).

**Таблица 34.** Сравнителни възможности на ELISA и имуноблот за откриване на антитела срещу хантавируси

| Резултати | Имуноблот положителни | Имуноблот отрицателни | Общо | Предсказуемост на |
|---|---|---|---|---|
| ELISA положителни | 18 | 2 | 20 | положителната ELISA реакция 18/20 – 90% |
| ELISA отрицателни | 0 | 6 | 6 | отрицателната ELISA реакция 6/6 – 100% |
| ОБЩО | 18 | 8 | 26 | |

Аналогичните сравнения между възможностите на РСК и имуноблот тестовете показаха, че 7 от 23 (30,4%) от РСК-положителните резултати не можаха да се потвърдят с имуноблот, т.е. били са фалшиво-положителни, а 2 от 3 РСК-отрицателни резултати всъщност са били фалшиво-отрицателни, след като с имуноблот се доказаха специфични антитела. Общо имуноблот тестът показа същата реактивност като РСК при 17 от 26 (65,4%) изследвани серумни проби (Табл. 35).

**Таблица 35.** Възможности на РСК и имуноблот за откриване на антитела срещу хантавируси

| Резултати | Имуноблот положителни | Имуноблот отрицателни | Общо | Предсказуемост на |
|---|---|---|---|---|
| РСК положителни | 16 | 7 | 23 | положителната РСК реакция 16/23 – 70% |
| РСК отрицателни | 2 | 1 | 3 | отрицателната РСК реакция 1/3 – 33% |
| ОБЩО | 18 | 8 | 26 | |

С имуноблот всички изследвани серуми показаха реактивност към антигените само на хантавируси Добрава и Хантаан; липсваше реактивност към хантавирус Пумала.

Предсказуемостта на положителната реакция от ELISA (positive predictive value) беше 90%, а на положителната реакция от РСК – 69,6%. Потвърждаването на отрицателните реакции от ELISA и РСК беше съответно 100% и 33,3% (Табл. 34 и 35).

Причината за тези различия се крие в откриването само на комплемент-свързващите антитела с РСК и много по-широкия спектър на антителата, откривани с ELISA. Освен това, с ELISA антителата се откриват много по-рано в хода на болестта.

Основните изводи от проведените проучвания са:

1. Направените сравнителни изследвания показаха, че ELISA тестовете притежават по-високи чувствителност и специфичност от РСК, което ги прави по-подходящи при доказване на антитела срещу хантавирусите.
2 Висок процент от ELISA-позитивните резултати се потвърждава с имуноблот (90%), без да се изпускат действително положителни случаи, докато с РСК се генерират значителен процент фалшиво-положителни резултати (около 1/3 от случаите) и около 2/3 от негативните резултати всъщност се оказват положителни.
3. Със серологични техники беше установено широко превалиране на хантавирус Добрава в нашата страна. На следващ етап, това беше потвърдено с помощта на RT-PCR и секвениране на амплифицираните продукти.

## 2. Разработване на RT-PCR системи за откриване на хантавируси

Разработени бяха праймерни системи, насочени към малкия и към средния сегмент на РНК-генома на хантавирус Добрава. Сравнена беше специфичността и чувствителността на различните праймерни двойки.

Всички изпитвани от нас праймерни двойки откриваха вирусна РНК в концентрация 0,05 μg/μl. Неспецифична PCR амплификация не беше наблюдавана.

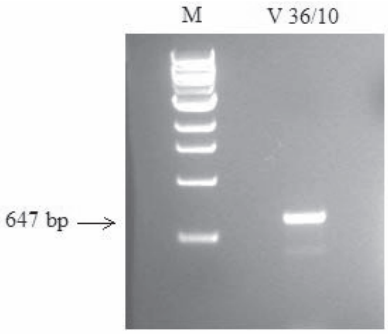
## 2.1. Едностъпкова и nested RT-PCR за откриване на хантавируси

За откриване на **малкия сегмент** РНК на хантавирус Добрава бяха разработени, изпитани и приложени едностъпкова и nested RT-PCR системи.

*Едностъпковата RT-PCR* се основаваше на праймерната двойка Fow451–Rev1098. На основата на тази едностъпкова RT-PCR беше разработена и двустъпкова (nested RT-PCR) с външна двойка праймери, както при едностъпковата, и вътрешна двойка праймери – конструираните от нас Fow562 и Rev852.

За целите на *nested RT-PCR* бяха приложени праймерните двойки MS120C-MS1170R и MS364C-MS963R. Продуктът от първия цикъл на амплификацията с пръмерите MS120C-MS1170R беше амплифициран с втората праймерна двойка – вътрешните праймери MS364C-MS963R

За откриване на **средния сегмент** РНК беше въведена и приложена nested RT-PCR система. Първият цикъл на амплификация се извършваше с праймерната двойка MM1470C-MM2029R, а вторият – с вътрешните праймери MM1674C-MM1990R..



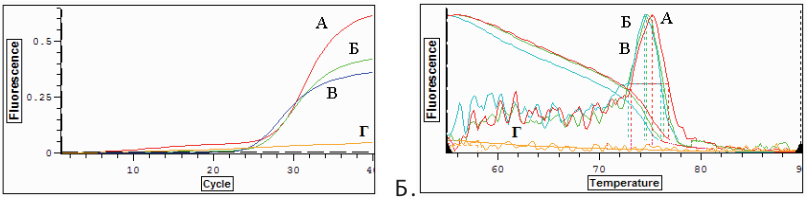

**Фиг. 47.** Гел-електрофореза на амплифицирани секвенции от региона на S-сегмента на РНК от хантавирус DOBV чрез праймерната система Fow451–Rev1098. Старт М – Маркер (1000 bp DNA Ladder); старт V 36/10 – Специфични ампликони с размер 647 bp от лаб.No. V 36/10.

С RT-PCR бяха изследвани контролни вирусни щамове и клинични материали. Провеждането на едностъпковата система RT-PCR беше последвано от nested RT-PCR. На фиг. 47 е представена гел-електрофорезата на ампликон, получен от амплификацията на РНК, екстрахирана от кръвта на пациент V36/10 с ХТБС, взета на 10-ти ден от началото на заболяването.

## 2.2. SYBR Green real time RT-PCR за доказване на РНК от S-сегмента на DOBV

Амплификационните реакции бяха провеждани с помощта на Script One-Step RT-PCR Kit With SYBR® Green I (BIO-RAD, САЩ), следвайки протокола на производителя. Приложена беше конструираната от нас праймерна двойка Fow451–Rev1098. Изпробвани и оптимизирани бяха различни амплификационни програми за Real-time RT-PCR.

На фиг. 48 са представени резултатите от изследване кръвта на двама болни с Real-time RT-PCR реакция – пропорционално нарастване на флуоресцентното излъчване и анализ на кривите на топене на получените ампликони.




**Фиг. 48.** SYBR® Green Real-time RT-PCR за откриване малкия сегмент РНК на хантавирус Добрава при пациенти с ХТБС. **А.** Пропорционално нарастване на флуоресцентното излъчване при амплификация на образуваните ампликони. **Б.** Анализ и сравнение на кривата на топене на PCR продукти, получени при амплификация на: (А) Положителна контрола. (Б) Проба от пациент Vs 113/09. (В) Проба от пациент Vs 116/09. (Г) Отрицателна контрола.

Доказаните с Real time RT-PCR пациенти бяха изследвани и потвърдени чрез конвенционален RT-PCR за наличие на хантавирус DOBV.

От направените изледвания могат да се направят следните изводи:

1. Конвенционалните RT-PCR с праймерните двойки Fow451–Rev1098/ Fow562–Rev852 и MS120C-MS1170R/ MS364C-MS963R за откриване на малкия РНК сегмент и MM1470C-MM2029R/ MM1674C-MM1990R за доказване на средния РНК сегмент са подходящи за откриване на хантавирусна РНК.
2. Модифицираните и адаптирани от нас Real-time RT-PCR системи са бързи, специфични и чувствителни молекулярни методи за доказване на хантавируси при пациенти с ХТБС. Методите са удобни за поставяне на диагнозата в острата фаза на заболяването.

## 3. Проучвания върху гризачи

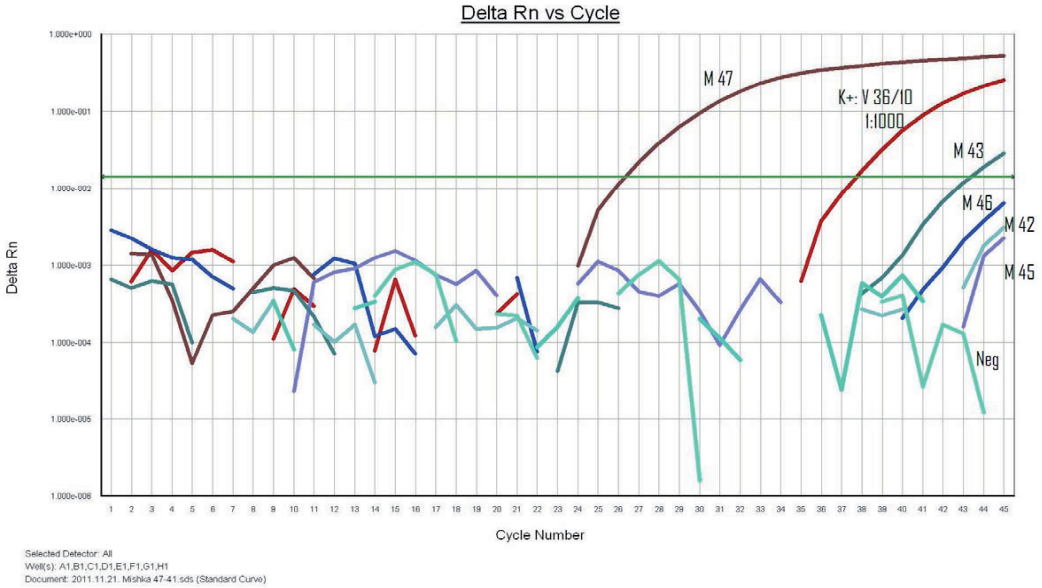
Разработени бяха TaqMan Real time RT-PCR тестове специално за доказване на хантавируси в гризачи, предвид по-високата специфичност на реакцията. Използвани бяха сонди, които съдържаха флуорофора FAM и гасител MGB (Minor Groove Binding).

С разработените TaqMan тестове започнахме проучване върху мишевидни гризачи до каква степен са заразени с хантавируси, с кои видове и в кои райони на страната. Събрани бяха общо 203 дребни бозайници – представители на видовете *Apodemus agrarius, Apodemus sylvaticus, Apodemus flavicollis, Mus musculus, Microtus arvalis, Rattus rattus, Crocidura suaveolens*. Проучванията продължават и в момента. От първите 94 изследвани гризача, при 5 се доказа наличие на хантавирус Добрава (5.3%) и при нито един не се откри хантавирус Пумала. Четири от заразените гризачи бяха от вида *A. flavicollis* и един – от вида *A. agrarius*. Това са първоначални данни, които обаче показват, че видът *A. flavicollis* вероятно играе важна роля като резервоар на Добрава вируса. Предстои изясняване и на другите възможни резервоари на хантавирусите в България. Заразените гризачи са от района на гр. Пещера, известен като ендемичен за КХТ.

На фиг. 49 са представени кривите на флуоресцентното излъчване от положителни и отрицателни проби. Вижда се ранното позитивиране на пробата от гризач с номер PLV 047.

От заразените гризачи бяха екстрахирани РНК проби от няколко органи – далак, черен дроб, бял дроб, бъбрек, както и от кръв. За да изследваме сравнително до колко всеки един от тези органи може да съдържа и поддържа вируса, направихме паралелни изследвания в Real time RT-PCR с РНК от различните органи. Установихме, че вирусът се доказва предимно в далак и бъбрек и в по-ниска степен в кръв и бял дроб на гризачите. По литературни данни, най-подходящи материали от гризачи са далак и бял дроб. Очевидно обаче, бъбрекът на гризачите, подобно на хората, поддържа интензивна инфекция продължително време.

В заключение, провежданите и в момента проучвания върху капацитета на дребните мишевидни гризачи като резервоари на хантавирусни инфекции показват, че видът *A. flacicollis* играе важна роля в поддържането на хантавирус Добрава в нашата страна. Освен това, сравнителните изследвания върху откриваемостта на хантавируса в различните органи и кръвта на гризачите разкриват, че вирусът се задържа предимно в далака и бъбреците на гризачите, което ги прави особено подходящи за изолиране на РНК от тях при проучванията.

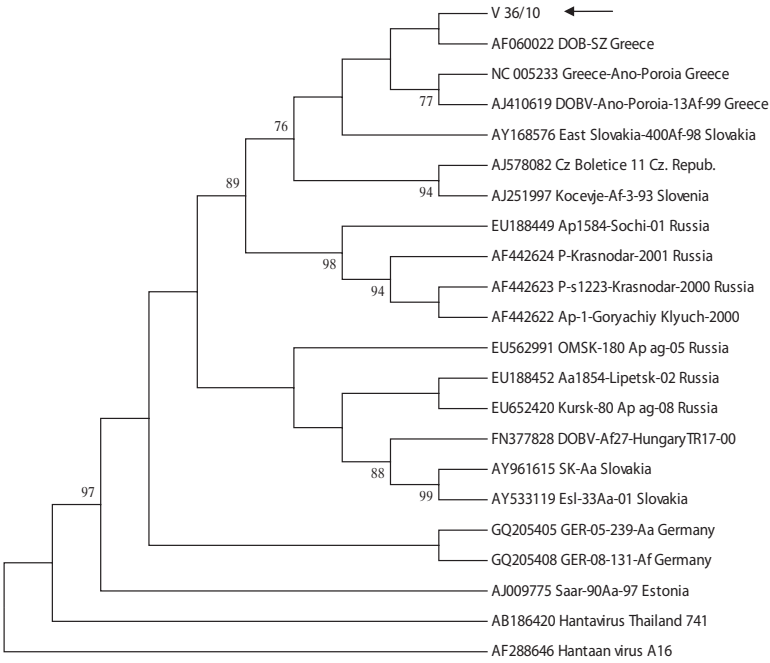



**Фиг. 49.** Real-time RT-PCR с TaqMan сонда за детекция на хантавирус DOBV при гризачи. Анализ и сравнение на кривата на топене при PCR продукти, получени при амплификация на специфична вирусна РНК, екстрахирана от положителна контрола – пациент V36/10, проба от мишка PLV 047 с по-висока виремия и от гризач PLV 043 с по-ниска виремия от контролната и отрицателна контрола.

## 4. Генетична характеристика на хантавируси добрава, циркулиращи в България

За първи път беше направен генетичен анализ на хантавируси, причиняващи хеморагична треска с бъбречен синдром в България.

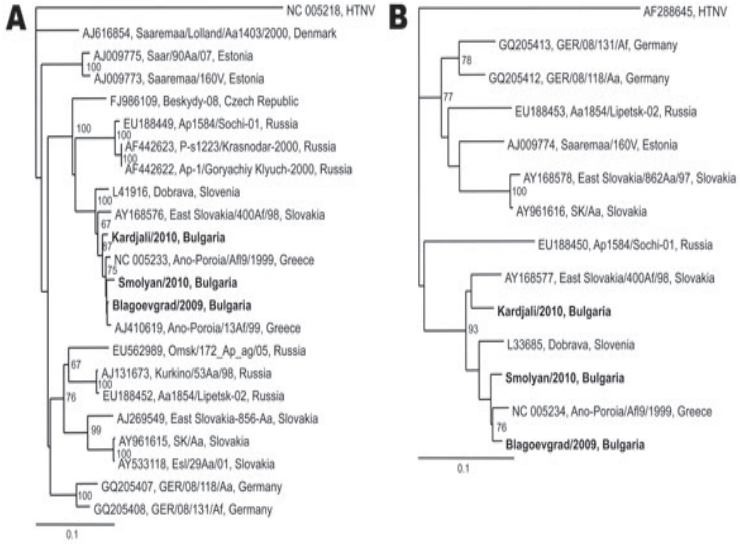
Секвенирането на получените PCR продукти при амплификацията на **S-сегмента** на РНК от българския щам V 36/10 показа най-висока степен на хомоложност с хантавирусите Добрава, циркулиращи в Гърция – съответно 97% и 100% по отношение на нуклеотидните последователности и кодираните аминокиселини (фиг. 50). Съпоставянето на V 36/10 с щам, циркулиращ в Словакия, показа различие от 4% на база нуклеотидна последователност и без разлики по отношение на аминокиселинна последователност.




**Фиг. 50.** Филогенетично дърво, създадено въз основа на 647 bp фрагмент от малкия S-сегмент на V 36/10, спрямо данните за хантавируси публикувани в базата данни на GenBank. Генетичните линии и сублинии бяха потвърдени чрез 1000 повторения (bootstraps), а хоризонталните дистанции са пропорционални на нуклеотидните различия. Щамовете Hantavirus Thailand 741 (AB186420) и Hantaan virus A16 (AF288646) бяха използвани за разклоняване на дървото и обособени като извънгрупови щамове.

При трима други пациенти с тежка форма на ХТБС, завършила фатално при двама от тях – V113/09, V8/10 и V29/10, съответно от областите Благоевград, Кърджали и Смолян, беше направено секвениране на ампликоните от **S- и M-сегментите** на вирусната РНК. Инфекция с хантавирус Добрава беше потвърдена чрез nested RT-PCR за S-сегмента (праймерна система MS120C-MS1170R/MS364C-MS963R) и за M-сегмента (праймерна система MM1470C-MM2029R/MM1674C-MM1990R). Секвенирани бяха ампликоните, получени при амплифициране на фрагменти, както от малкия, така и от средния геном на хантавируса (фиг. 51). Получените секвенции бяха изпратени под номера HQ174468–HQ174473 в GenBank.

Резултатите от сравнението на секвенциите с известните до момента показаха, че по отношение на S сегмента, с най-голяма степен на хомоложност на нуклеотидно и аминокиселинно ниво са хантавируси Ano Poroia. Също близък беше хантавирус AY168576 от Източна Словакия.




**Фиг. 51.** Филогенетични дървета, създадени въз основа на: А) 599 bp фрагмент от малкия (S) сегмент и В) 317 bp фрагмент на средния (M) фрагмент на българските хантавируси V113/09, V8/10 и V29/10, спрямо данните за хантавируси публикувани в базата данни на GenBank. Хантаан вирус (AF 288645 HTNV) беше използван за разклоняване на дървото и обособен като извънгрупов. Генетичните линии и сублинии бяха потвърдени чрез 100 повторения (bootstraps), а хоризонталните дистанции са пропорционални на нуклеотидните различия.

По отношение на М сегмента, с най-висока хомоложност с българските щамове бяха щамовете в Североизточна Гърция, Източна Словакия и Словения. Генетичните различия между българските щамове бяха 1,2%-2,1% в S-сегментите и 2,2%-7,4% в М-сегментите.

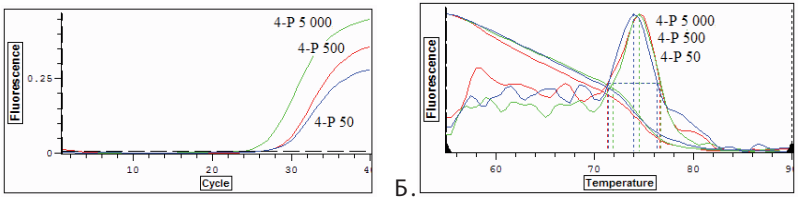
Доказаните до момента с RT-PCR методи хантавируси в кръв от наши болни с ХТБС принадлежат единствено към тип Добрава. Характерно за него е, че циркулира на Балканите и Турция и причинява особено тежка форма на ХТБС. В съседните ни страни циркулира и тип Пумала, който за сега не е доказан в български пациенти. Предвид по-лекото заболяване, което причинява, възможно е пациентите просто да се пропускат, което означава, че в ендемичните райони, независимо от тежестта на заболяванията при фебрилен синдром с хеморагии и засягане на бъбреците, трябва да се има предвид хантавирусна инфекция.

## III. КЪРЛЕЖОВ ЕНЦЕФАЛИТ

Кърлежовият енцефалит е най-значимата арбовирусна инфекция в Европа. България не е ендемичен район за кърлежов енцефалит и официално отсъства от картата със световното разпространение на заболяването. Отделни заболявания след консумация на сурово козе мляко са били наблюдавани или доказвани ретроспективно, а вирусът на кърлежовия енцефалит е доказан в хемоцитите на няколко вида къprлежи. Всичко това показва, че вирусът, причиняващ заболяването циркулира и в нашата страна, но вероятно инфекцията е много рядка или не се познава и диагностицира. За модернизиране на диагностиката и за провеждане на проучвания, въведохме молекулярно-вирусологични (RT-PCR) и серологични (ELISA) техники.

### 1. Разработване на Real-time RT-PCR за откриване на вируса на кърлежовия енцефалит

Разработена беше Real time RT-PCR методика с праймерната двойка Fow3374–Rev4106, амплифицираща 733 bp фрагмент от цялостния геном на вируса на кърлежовия енцефалит.




**Фиг. 52.** SYBR Green Real-time RT-PCR за доказване на вируса на кърлежовия енцефалит. **А.** Нарастване на флуоресцентното излъчване при амплификациите на образуваните ампликони **Б.** Специфичност на амплификационните продукти от контролни РНК с концентрация 5 000, 500 и 50 копия/мл.

Провеждането и отчитането на реакциите бяха извършени с амплификационни програми на Script One-Step RT-PCR Kit With SYBR® Green I. Резултатите от оптимизираните протоколи са посочени на фиг. 52.

За положителна контрола служеше РНК от Европейския субтип К23 на вируса на кърлежовия енцефалит в различни концентрации – 5000, 500 и 50 РНК копия/мл. Резултатите от проведените изследвания показаха, че успешно беше амплифициран генетичен материал от вируса на кърлежовия енцефалит. Наблюдавана беше характерна зависимост между количеството на вирусния товар и нарастването на флуоресцентното излъчване по време на различните цикли. При по-ниска концентрация на вирусите, нарастването на флуоресцентното излъчване се наблюдаваше на по-късен етап от амплификацията. В същото време, при отчитане специфичността на амплификационните продукти се доказа, че всички проби отговаряха на един и същ амплификационен продукт.

## 2. Оптимизиране на серологичната диагностика и проучвания върху разпространението на кърлежовия енцефалит в България

Модернизирането на серологичната диагностика позволи насочено откриване на болни с кърлежов енцефалит в България**.**

Трябва да се има предвид, че при кърлежовия енцефалит значението на надеждната серологична диагностика е много голямо, тъй като с RT-PCR най-често диагнозата не може да се постави, поради бързото изчистване на вируса от кръвта на болните, преди да бъдат предприети изследванията.

От друга страна, с рутинно прилаганата до момента реакция за свързване на комплемента се изпускат голяма част от антителата, поради което се пропуска и диагнозата. Ето защо, въвеждането на ELISA разшири диагностичния обхват. Благодарение на оптимизираната серологична диагностика бяха доказани 4 случая на кърлежов енцефалит у нас през последните две години, всеки от които представя различни прояви на инфекцията. При първия случай протичането беше предимно с фебрилна реакция при минимална неврологична симптоматика. При втория случай беше налице остър менингоенцефалит с бифазно протичане. При третия случай, активна туберкулоза усложни кърлежовия енцефалит. Четвъртият случай беше на фебрилно заболяване с менингеални прояви.

Кърлежовият енцефалит е заболяване, което при основната част (до 90%) от болните протича безсимптомно или с минимална клинична проява. При не повече от 10% от заболелите е налице само фебрилна реакция и неспецифични прояви на токсо-инфекциозен синдром, поради което и най-често не се диагностицира. По-малко от 1% от заболелите развиват неврологична симптоматика – менингит или менинго-енцефалит, които трябва да насочат вниманието и към възможна диагноза кърлежов енцефалит, дори и при липса на анамнеза за ухапване от кърлеж. Независимо, че страната ни не е ендемичен район за тази инфекция, не трябва да се пренебрегва възможността да се касае именно за кърлежов енцефалит при пациенти с прояви на вирусен менингит.

## 3. Проучвания върху пациенти с неясен фебрилен синдром

Фебрилните състояния, при които не може да се открие етиологичният причинител, представляват сериозен диагностичен проблем, който поражда затруднения при терапевтичното поведение.

При такива пациенти направихме проучване върху възможността да се касае за кърлежов енцефалит, хантавирусни инфекции или Кримска Конго хеморагична треска. Изследванията бяха проведени в периода 2008–2011 г. в сътрудничество с Американския военно-медицински институт в гр. Кайро, Египет. Общо 527 болни от 7 области в страната участваха в проучването, като от тях бяха изследвани общо 836 серумни проби.

Серологични данни за ранна инфекция с вируса на *кърлежовия енцефалит*, т.е. ИгМ антитела, бяха намерени при 13/527 (2,5%) от болните. Подобна находка наистина е стряскаща, предвид пълното подценяване на заболяването у нас. Анализът на заболяемостта по региони показа, че от всички изследвани региони има доказани случаи, но предимно те са от региона на Пловдив 4/13 (30,8%) и Пазарджик 2/13 (15,4%). Подробното разпределение по региони и относителният дял на заболелите спрямо общият брой на изследваните болни във всеки регион са отразени на Табл. 36.

Проучването върху разпространението на *хантавирусните инфекции* сред болните с фебрилен синдром в България показа, че те заемат един значителен дял. Общо при 74/527 (14%) от болните бяха доказани специфични ИгМ антитела срещу хантавируси. По региони, водещото място беше за Пловдивски регион, където бяха доказани 31/74 (42%) от откритите случаи, следван от регионите на Бургас (18 болни, 24% от случаите), София (9 болни, 12%), Пазарджик и Сливен (по 7 болни, 9,5%). За Пловдив и Пазарджик, известни като ендемични райони за ХТБС, находката не е изненадваща. За София също може да се обясни предвид факта, че болни от цялата страна постъпват в инфекциозните отделения в София. Находката за хантавируси в регионите на Сливен и Бургас е много интересна. Сливен и Бургас са известни ендемични райони за Кримска Конго хеморагична треска, но случаи на хеморагична треска с бъбречен синдром, т.е. хантавирусни инфекции, не са регистрирани. Възможно ли е освен ККХТ и другата вирусна хеморагична треска, разпространена у нас, да се среща и в този регион – на този въпрос ще отговорят насочените проучвания, както върху пациенти, така и върху резервоарите на двете инфекции, които се провеждат в момента, както със серологични, така и с молекулярно-генетични методи.

Данни за инфекция с вируса на *Кримската Конго хеморагична треска* (ККХТ) бяха открити при 21 (3,98%) от изследваните болни с неясен фебрилен синдром, т.е като причина на фебрилен синдром тази инфекция е много по-рядка от хантавирусните инфекции в нашата страна. Вероятно това е свързано с манифестната клинична картина и по-доброто познаване на болестта от лекарите. Почти половината от случаите бяха открити в региона на Бургас – общо 10 / 21 (47,6%). В Пловдивски регион бяха открити 5 (23,8%) и по 2 (9,5%) в районите на Сливен и София окръг. Относителният дял на откритите случаи спрямо общия брой на изследвани е посочен на Табл. 36.

**Таблица 36.** Болни с неясен фебрилен синдром, при които са установени данни за ранна инфекция с вируса на кърлежовия енцефалит, хантавирусни инфекции или Кримска Конго хеморагична треска.

| | Кърлежов енцефалит | | Хантавирусни инфекции | | Кримска Конго хеморагична треска | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| РЕГИОНИ | Общ брой | % | Общ брой | % | Общ брой | % |
| Бургас (n=116) | 1 | 0,9% | 18 | 5,5% | 10 | 8,6% |
| Пазарджик (n=128) | 2 | 1,6% | 7 | 5,5% | 1 | 0,8% |
| Плевен (n=8) | 1 | 12,5% | 0 | - | 0 | - |
| Пловдив (n=131) | 5 | 3,8% | 31 | 23,7% | 5 | 3,8% |
| Русе (n=37) | 1 | 2,7% | 2 | 5,4% | 1 | 2,7% |
| Сливен (n=35) | 1 | 2,9% | 7 | 20% | 2 | 5,7% |
| София (n=72) | 2 | 2,8% | 9 | 12,5% | 2 | 2,8% |
| ОБЩО (n=527) | 13 | 2,5% | 74 | 14,0% | 21 | 3,98% |

В резюме, от извършените проучвания могат да се направят следните по-важни обобщения:

1. Въведена е съвременна серологична диагностика за потвърждаване на кърлежовия енцефалит в България, която позволи насочено откриване на болни.
2. Анализирани са клиничните особености, лабораторните показатели и епидемиологичната анамнеза при откритите случаи на кърлежов енцефалит.
3. Проучванията върху пациентите с неясен фебрилен синдром откриха инфекция с вируса на кърлежовия енцефалит при 2,5%, хантавирусни инфекции при 14% от болните и ККХТ – при 4% от изследваните 527 болни.

# 5. РЕЗЮМЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ. ИЗВОДИ

Натрупаните в резултат на тези многогодишни проучвания данни могат да се обобщят в няколко основни направления, като се направят следните изводи:

## I. Молекулярно-генетични методи за етиологична диагностика

1. С разработените PCR тестове *B. burgdorferi* се доказва преди образуването на специфичните антитела и позитивирането на серологичните тестове. Апробираният PCR за откриване на *A. phagocytophilum* е надежден метод за доказване на остра анаплазмоза, сравним по възможности с доказването на ИгМ антитела срещу *A. phagocytophilum* с ELISA. Съчетаването на PCR и серологичните техники съществено разширява диагностичните възможности. Въведени и оптимизирани са PCR методи за откриване на *F. tularensis* и рикетсии от групата на петнистите трески.
2. Разработените оригинални nested и Real time RT-PCR системи позволяват надеждна и бърза диагностика при изследване на клинични материали от болни със съмнение за ККХТ, хантавирусни инфекции и кърлежов енцефалит.

## II. Генетични характеристики на циркулиращите в България вируси, причиняващи хеморагични трески

3. За първи път е установено, че вирусите, причиняващи Кримска Конго хеморагична треска в България са с висока степен на хомоложност помежду си, филогенетично попадат в един клон с тези от Европейската част на Русия и еволюират сравнително бавно.
4. Провежданите за първи път у нас изследвания за хантавируси с молекулярно-вирусологични техники откриват до момента само хантавирус Добрава, известен с това, че причинява тежка форма на хантавирусната инфекция. Единствено хантавирус Добрава се установява до момента при болните с ХТБС и при изследваните мишевидни гризачи.

## III. Нови подходи в серологичната диагностика на предаваните с кърлежи и сродни инфекции

5. Разработени са ново поколение ELISA тестове с рекомбинантни антигени и е проучено участието на основните *B. burgdorferi* протеини в имунния отговор на организма в хода на Лаймската борелиоза. Изследвана е реактивността срещу 16 отделни серотипа на един от антигените (OspC).

6. Разработени са пептидни ELISA тестове с антиген от IR6 (C6) региона на VlsE антигените на трите основни вида борелии, причиняващи Лаймска болест в Европа. За първи път е установена различна реактивност към C6 пептидите от различните видове борелии, което е в контраст с общоприетата теза, че C6 участъкът е силно консервативен.
7. Апробирани са ELISA и имуноблот тестове за диагностика на хантавирусните инфекции. Въведена е модерна серологична диагностика на кърлежовия енцефалит в България, която позволи насочено откриване на болни.

## IV. Серо-епидемиологични проучвания

8. Едно от първите в света и първото за България серо-епидемиологично проучване за човешка гранулоцитна анаплазмоза показа , че заболяването е широко разпространено у нас, като приблизително 10% от болните с Лаймска борелиоза имат серологични данни за инфекция и с *A. phagocytophilum*;по-висок е процентът сред болните, развили фебрилна реакция след ухапване от кърлеж.
9. Проведеното за първи път в България серо-епидемиологично проучване върху разпространението на ККХТ сред здрави лица и болни с други заболявания показа наличие на три основни категории области в България – с висока, умерено висока и ниска степен на серопревалиране.
10. Проучванията върху пациентите с неясен фебрилен синдром откриха инфекция с вируса на кърлежовия енцефалит при 2,5% от изследваните болни, хантавирусни инфекции – при 14% от болните и ККХТ – при 4%.

## V. Вектори на предаваните с кърлежи патогени

11. Първите у нас проучвания върху заразеността на кърлежи с PCR доказаха наличието на трансфазален и трансовариален път на предаване на борелиите сред кърлежите и доминиране на вида *B. afzelii* в заразените кърлежи. Кърлежи от видовете *R. bursa*, *D. marginatus* и *H. punctata* вероятно играят ролята на потенциални вектори в предаването на инфекцията.
12. Едно от първите в света проучвания върху заразеността на кърлежите *I. ricinus* с *A. phagocytophilum* показа висока степен на заразеност на кърлежите с анаплазми и коинфекции с борелии в над 10% от кърлежите. Кърлежи от видовете *H. punctata* и *R. bursa* се очертават като второстепенни вектори на инфекцията.
13. *F. tularensis* е установена само в кърлежи от вида *Dermacentor marginatus*, което потвърждава ролята му на основен вектор. Заразеността на кърлежите с рикетсии е по-висока от заразеността им с другите кърлежово преносими бактериални патогени. Максимална степен на заразеност се доказа при видовете *Rhipicephalus bursa* и *Dermacentor marginatus*, но рикетсии бяха установени във всички изследвани видо-

ве кърлежи. Високата степен на заразеност на българските кърлежи с различни бактериални патогени обуславя съществуването на коинфекции в тях, което предопределя възможност за едновременната трансмисия на два (или повече) патогена.

## VI. Резервоари на предаваните с кърлежи и сродни инфекции

14. Изследвана е заразеността на гризачите с борелии, анаплазми и *F. tularensis*. *A. agrarius* (полската мишка) се очертава като основен резервоар на човешката анаплазмоза в България според първите у нас и едни от първите в света проучвания с молекулярно-генетични и серологични техники. Проведените проучвания върху заразеността на гризачи с *F. tularensis* на практика илюстрираха връзката между високата заразеност на гризачите и нарастване броя на заболелите от туларемия.
15. Доказването на специфични антитела срещу вируса на ККХТ в серумите на 50–70% от изследваните домашни животни в ендемичен регион е показател за потенциално високия риск за хората. Проучвания с TaqMan real time RT-PCR върху капацитета на дребните мишевидни гризачи като резервоари на хантавирусни инфекции доказват, че видът *A. flacicollis* играе основната роля в поддържането на хантавирус Добрава в нашата страна.

# ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ. ПРИНОСИ

## I. НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. Проведени са първите у нас оригинални насочени проучвания с PCR върху заразеността на кърлежите с борелии. Установеното доминиране на *B. afzelii* в изследваните кърлежи при известното доминиране на невроборелиозата, свързана с *B. garinii*, сред късните прояви на Лаймската болест, подкрепят нашата хипотеза за по-висок патогенетичен потенциал на *B. garinii.*
2. За първи път у нас са изследвани възможностите на PCR и серологичните техники за доказване на *B. burgdorferi* в тъканите на гризачи, които определят подхода за комбинираното им приложение в различните етапи на инфекцията. PCR е основна алтернатива на серологичното изследване в съвсем ранния стадий на болестта преди етиологичното лечение.
3. При пациенти с Лаймска борелиоза най-подходящ материал за изследване с PCR е кожната биопсия от лезията еритема мигранс, което обаче е инвазивна процедура. Алтернативно, борелии могат да се докажат в кръвта и дори в урината на болните. Процентът на доказване на борелии в урината е сравним с този при изследване на кръв.
4. Независимо от кожната локализация на инфекцията при еритема мигранс, доказването на борелиите в кръвта на болния говори за ранна хематогенна дисеминация. Ранното антибиотично лечение бързо изчиства борелиите от кръвта на болните и те не могат да се докажат с PCR дори и скоро след началото на етиологичното лечение.
5. При болните с ранна Лаймска борелиоза VlsE протеинът на *B. burgdorferi*, приложен дори и самостоятелно като антиген в ELISA, може да постигне сходна чувствителност с рутинния търговски кит ELISA с няколко рекомбинантни антигена. Реактивността срещу VlsE дори и в ранния стадий е предимно ИгГ и в по-нисък процент ИгМ.
6. В ранния стадий на Лаймската болест FlaB и OspC антигените показват сходна степен на реактивност, но около 2 пъти по-ниска като цяло от реактивността към VlsE. OspA е с най-ниска реактивност, както в ранния, така и в напредналите стадии на Лаймската болест.
7. При болните с напреднала и късна Лаймска борелиоза VlsE и FlaB антигените показват по-висока реактивност в сравнение с ранната фаза на болестта. Реактивността към VlsE е предимно ИгГ, при FlaB и OspC е както ИгГ, така и ИгМ, докато към OspA е само ИгГ.
8. Както в ранната, така и в късната фаза VlsE осигурява най-висока чувствителност на теста, докато OspA играе минимална роля като антиген.
9. Двойката антигени VlsE/OspC показва по-висока степен на реактивност от търговския кит ELISA за диагностика на ранната Лаймска борелиоза (65% срещу 57%). Минималното повишение в реактивността при прибавяне на още един или два антигена (съответно 66% и 69%)

разкрива, че тези два антигена са достатъчни за диагностика в ранната фаза на болестта.

10. В по-късните фази на инфекцията, VlsE в комбинация с FlaB осигурява максималната степен на реактивност, но поради възможността за неспецифични реакции при FlaB, е добре да се добави още един антиген – OspC или OspA. Комбинацията от три антигени е достатъчна да осигури максимална реактивност и специфичност в тази фаза.
11. OspC е силно хетерогенен протеин на *B. burgdorferi*. Установената реактивност срещу отделните OspC-генотипове, според първите подобни проучвания, варира в доста широки граници. Само 18–20% от серумите на болни с ранна Лаймска борелиоза имат антитела към всички OspC типове и нито един генотип не открива антителата при всички серуми, което налага включване на повече от един генотип в диагностичния тест.
12. За първи път е установено, че OspC типовете K, E, F и B са най-подходящи за включване в мултиантигенен диагностичен набор, след като комбинирането на OspC генотипове K с F или E открива 100% от българските пациенти с предварително доказани антитела срещу OspC. Комбинирането на OspC типове K и B открива 96 % от американските пациенти с ранна Лаймска борелиоза.
13. Установена е висока реактивност на C6 пептидите, което е в подкрепа на твърденията за висока имуногенност на този участък от молекулата на VlsE антигена.
14. В контраст с общоприетата теза, че C6 участъкът е силно консервативен, установихме, че с C6 пептиди от различните видове борелии се получават различни резултати.
15. За първи път е направено сравнение между реактивността към C6 пептида на серуми от европейски и американски болни. Установена е повисока реактивност на C6 пептида от *B. burgdorferi* s.s. в сравнение с C6 пептидите от *B. garinii* и *B. afzelii*, както при американските, така и при българските болни. Реактивността към C6 пептидите от *B. garinii* и *B. afzelii* е по-висока при българските пациенти в сравнение с американските, което отразява разпространението на съответните видове борелии в света.
16. Сравнението на двете използвани PCR системи за доказване генома на *A. phagocytophilum* разкрива много по-големите възможности на *ankA* PCR в сравнение с 16S рРНК PCR.
17. Секвенциите на 6 от българските щамове *A. phagocytophilum* показват 99,77–99,89% хомоложност с типовия щам *A. phagocytophilum* от САЩ.
18. Доказването на *A. phagocytophilum* в ненапити ларви доказва функционирането на трансовариален механизъм на предаване в допълнение към трансфазалния.
19. Анализът на клиничните характеристики на установените болни с остра анаплазмоза показва, че около 1/3 от болните с фебрилна реакция

след ухапване от кърлеж и около половината от болните едновременно с фебрилитет и еритема мигранс са заразени с *A. phagocytophilum*.

20. Високата честота на едновременно доказване на *A. phagocytophilum* и *B. burgdorferi* показва колко често са налице коинфекции след ухапване от иксодови кърлежи. При болните с фебрилна реакция по време на изява на кожната лезия еритема мигранс трябва задължително да се мисли за Лаймска борелиоза и за анаплазмоза.
21. Съчетаването на PCR и серологичните техники разширява диагностичните възможности при анаплазмоза. PCR позитивира рано в хода на болестта, преди появата на специфичните антитела, които обаче се задържат по-дълго време.
22. Кърлежите от вида *Dermacentor marginatus* играят ролята на основен вектор за *F. tularensis*, след като инфекцията беше установена само в този вид кърлежи.
23. Опитно беше установено, че високата заразеност на гризачите води до нарастване броя на заболелите от туларемия.
24. Заразеността на иксодовите кърлежи с рикетсии е по-висока от заразеността им с другите кърлежово преносими бактериални патогени – *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* и *F. tularenisis*.
25. Проучени са възможностите за коинфекции в кърлежи и гризачи. Едно от първите проучвания в Европа върху заразеността на кърлежите *I. ricinus* с борелии и анаплазми установи коинфекции с двата патогена при 13,4% от кърлежите. Много по-често се откриват коинфекции в кърлежите, когато се включат и рикетсиите.
26. Коинфекциите при гризачите и кърлежите обуславят възникването на коинфекции и при хората, което крие възможността за промяна в клиничната картина на всяко едно от предаваните с кърлежи заболявания.
27. Първите проучвания на български ККХТ вируси, изолирани от кръв на пациенти през 2003–2009 г. разкриха високата им степен на хомоложност и генетичната стабилност на ККХТ вирусите.. Филогенетичният анализ показва, че те попадат в една група с изолираните в Югоизточна Европа, Русия и Турция щамове (Европейско-Турска група).
28. Пълното секвениране на S-сегмента на вирусната РНК на ваксиналния ККХТ вирусен щам V 42/81 показа, че е с обща дължина 1673 нуклеотида и кодира протеин с големина 482 аминокиселини. Пълното секвениране на M-сегмента показа дължина от 5353 нуклеотида, кодиращ протеин от 1688 аминокиселини.
29. Real time RT-PCR с TaqMan сонди са най-подходящите методи за откриване на хантавируси в гризачите, а от тук и за оценка на риска за хората. Проведените сравнителни изследвания показаха, че хантавирусите се задържат предимно в далака и бъбреците на гризачите, и в по-малка степен в белите дробове и кръвта.
30. За първи път е изследвано разпространението на различните видове хантавируси в България. Установено е доминиране на хантавирус Добрава чрез секвениране на циркулиращи в страната вирусни щамове.

31. Проведените за първи път мащабни проучвания върху пациенти с неясен фебрилен синдром в България откриват инфекция с вируса на кърлежовия енцефалит при 2,5% от изследваните 527 болни, хантавирусни инфекции – при 14% от болните и ККХТ – при 4%.

## II. НАУЧНИ ПРИНОСИ ОРИГИНАЛНИ ЗА БЪЛГАРИЯ

1. Първите у нас проучвания върху заразеността на кърлежи с PCR доказаха наличието на трансфазален и трансовариален път на предаване на борелиите сред кърлежите.
2. Доказани бяха коинфекции с два вида борелии. Установено беше почестото комбиниране на *B. valaisiana* с *B. afzelii* и на *B. lusitaniae* с *B. garinii.*
3. Първото у нас мащабно проучване върху заразеността на кърлежите от различни региони на страната показа максимална заразеност с борелии на кърлежите от София, Пловдив, Стара Загора, Хасково и Монтана, с динамика през годините и вариации между различните стадии и форми на кърлежите.
4. Установена беше заразеността на гризачите с борелии – в зависимост от прилагания метод между 22,5% и 30% (съответно с PCR и ELISA).
5. Извършени са първите в България проучвания с молекулярно-генетични методи върху заразеността на кърлежи с *Anaplasma phagocytophilum*. Установено е, че около една трета от възрастните кърлежи са заразени с анаплазми, а при нимфите заразеността е по-ниска.
6. Установяването на *A. phagocytophilum* само в кърлежи *H. punctata* в някои райони на България свидетелства за потенциалната му роля като вероятен основен вектор на инфекцията. Видът *R. bursa* се очертава като второстепенен вектор.
7. Направено е първото у нас и едно от първите в света проучване върху заразеността на гризачите с *A. phagocytophilum*. Със серологични техники (ELISA) инфекция с *A. phagocytophilum* беше доказана при 21,7%, а с молекулярно-генетични (PCR) – при 7,5% от изследваните гризачи, което я нарежда на второ място по честота след инфекцията с *B. burgdorferi*..
8. Анализът на видовия състав на заразените гризачи разкрива много висока степен на заразеност на *A. agrarius* (полската мишка). *A. phagocytophilum* беше единственият предаван с кърлежи патоген, доказан в този вид гризачи, което предполага, че този вид може да се окаже основен резервоар на човешката анаплазмоза в България.
9. Направено е едно от първите в света и първото за България проучване за инфекция с *A. phagocytophilum* сред ухапаните от кърлежи лица у нас. То показа, че заболяването е широко разпространено в България. Приблизително 10% от болните с Лаймска борелиоза имаха серологични данни за инфекция и с *A. phagocytophilum*. По-висок е процентът (20%) на ЧГА сред болните, развили фебрилна реакция след ухапване от кърлеж. Откриването на специфичните антитела и при здрави лица, потвърждава циркулацията на *A. phagocytophilum* в България.

10. Само кърлежите от района на гр. Сливница бяха заразени с *F. tularensis*. В кърлежите от останалите региони на страната *F. tularensis* не беше открита. Средната заразеност на кърлежите от района на гр. Сливница, установена с PCR беше 8,7%.
11. Установена беше инфекция с *F. tularensis* сред гризачите не само в района Мещица, но и цялата област Перник. Средната заразеност на гризачите, установена със серологични методи, беше 21,5% в Мещица, а около Перник – 14,8%; с PCR заразеността беше сходна – 21,5% и 11,1% съответно.
12. С помощта на PCR за първи път у нас беше изследвана в динамика заразеността с рикетсии на кърлежи *I.ricinus*; установи се стабилно висока степен на заразеност през годините.
13. Анализът на видовия състав на заразените с рикетсии кърлежи показа максимална степен на заразеност на *Rhipicephalus bursa* и *Dermacentor marginatus*, но рикетсии бяха доказвани във всички изследвани видове кърлежи.
14. Гризачите бяха заразени с рикетсии в значително по-ниска степен от кърлежите (средно 5%). Видът *M. musculus* беше със значително по-висока (15,4%) от средната степен на заразеност, което подсказва ролята на този вид като резервоар на рикетсиите.
15. Със серологични техники бяха установени коинфекции при 9,2% от гризачите, изследвани за *B. burgdorferi, A. phagocytophilum* и *F. tularensis*. С PCR коинфекции бяха потвърдени при 5% от гризачите. Гризачите от района на Перник бяха заразени във висока степен не само с *F. tularensis*, но и с борелии и анаплазми.
16. Коинфекции на Лаймска борелиоза с анаплазмоза при пациенти бяха установени със серологични техники при 36,1%, а с PCR – при 11,1% от изследваните болни с ранна Лаймска борелиоза (еритема мигранс).
17. Проучен е антитяло отговора след ваксиниране с българската ККХТ ваксина. При многократно ваксинирани доброволци са налице специфични антитела във високи титри, както преди, така и след поредната ре-имунизация, т.е. налице е стабилен хуморален отговор на организма. При ваксинирани лица с незавършен цикъл на имунизация, антителата са в минимални количества и се повишават след завършване на имунизационния процес. Получените резултати показват, че българската ваксина срещу ККХТ е силно имуногенна, стимулирайки продукцията на специфични антитела срещу вируса на ККХТ.
18. Сравнени са възможностите на ELISA и PCK за доказване на специфичните антитела срещу вируса на ККХТ. Установени са предимства на ELISA тестовете.
19. Проведени са серологични проучвания с ELISA върху домашни животни от ендемичен за ККХТ район, които показват висока степен на заразеност с вируса на ККХТ (над 50%). Почти половината от домашните животни се заразяват с вируса на ККХТ до края на първата година от живота си, а след втората си година заразени са вече 80% от домашните животни.

20. Въз основа на проучвания върху серопревалирането на КККТ сред здрави и болни от други заболявания в България могат да се очертаят три групи райони в страната с риск от заболявания сред хората – с висок, умерено висок и нисък риск.
21. Разпределението на диагностицираните случаи с неясен фебрилен синдром показа, че с най-висока честота кърлежовият енцефалит е открит в региона на Плевен (12,5%) и Пловдив (3,8%), хантавирусните инфекции – в регионите на Пловдив (23,7%) и Сливен (20%), а КККТ – в регионите на Бургас (8,6%) и Сливен (5,7%).

## III. НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. Разработени са PCR системи за доказване на *B. burgdorferi* в клинични материали, в кърлежи и органи на гризачи.
2. Сравнителните възможности на PCR и ELISA в съвсем ранния стадий на Лаймската болест са в полза на изследването с PCR. С PCR се доказва етиологичният агент преди образуването на специфичните ИгМ антитела и позитивирането на серологичните тестове. След 20–30 ден от началото на болестта, когато се образуват сигнификантни количества антитела, диагностичната стойност на PCR отстъпва пред възможностите на серологичните техники.
3. Разработени са ново поколение оригинални ELISA тестове с рекомбинантни *B. burgdorferi* протеини, които могат да се използват не само като диагностично средство, но и за проучвания върху участието на отделните протеини в имунния отговор на организма.
4. Отрицателният резултат от диагностичния тест с един или два OspC генотипа, както е обичайно, не изключва заболяване от Лаймска болест, предвид възможната реактивност към други генотипове, невключени в диагностичния набор.
5. Разработени са пептидни ELISA тестове с антиген от IR6 (C6) региона на VlsE антигените на трите основни вида борелии, причиняващи Лаймска болест – *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* и *B. afzelii*.
6. C6 пептидните ELISA тестове са много подходящи за рутинна серологична диагностика на Лаймската борелиоза – с тях се откриват във висока степен антитела в различните стадии на болестта, те са лесни за изпълнение и икономически много изгодни.
7. Разработени са PCR тестове за откриване на *Anaplasma phagocytophilum* в клинични материали, кърлежи и гризачи.
8. PCR е надежден метод за доказване на остра анаплазмоза при пациенти, след като с PCR бяха установени 15 от 101 (14,9%) изследвани болни с възможна остра ЧГА, срещу 37 болни установени серологично, от които 16 бяха с ИгМ антитела, т.е. възможностите на двата метода в ранната фаза на инфекцията са доста сходни.
9. Проучване върху болни с неясен фебрилен синдром разкрива висока честота на инфекция с *R. conorii.* С най-висока честота, Марсилска треска беше доказана сред болните в регионите на Пловдив, Бургас и Русе.

10. Разработени са едностъпкови и nested RT-PCR, както и real time RT-PCR системи, за откриване на малкия (S), средния (M) или големия (L) сегмент РНК на вируса на ККХТ, които успешно се прилагат за доказване на вируса на ККХТ в клинични материали от болни, както и за ретроспективни анализи.
11. Направените сравнителни изследвания показаха, че ELISA тестовете притежават по-високи чувствителност и специфичност от РСК, което ги прави по-подходящи при доказване на антитела срещу хантавирусите.
12. Висок процент от ELISA-позитивните резултати се потвърждава с имуноблот (90%), без да се изпускат действително положителни случаи, докато с РСК се генерират значителен процент фалшиво-положителни резултати (около 1/3 от случаите) и около 2/3 от негативните резултати всъщност се оказват положителни.
13. Разработени са оригинални едностъпкови и nested RT-PCR за откриване на малкия и средния сегмент на хантавирусната РНК. Оптимизирани са real time RT-PCR системи за откриване на хантавирусна РНК, с които се постига бърза и специфична етиологична диагностика на хантавирусните инфекции в страната.
14. Разработена е Real time RT-PCR система за откриване на вируса на кърлежовия енцефалит. Оптимизирана е серологичната диагностика на кърлежовия енцефалит в България.
15. Оптимизирането на етиологичната диагностика на кърлежовия енцефалит позволява надеждно доказване на клинични случаи, не само с енцефалитни прояви, но и само с менингитни и дори само с фебрилитет. Анализирани са клиничните особености, лабораторните показатели и епидемиологичната анамнеза при откритите случаи на кърлежов енцефалит.

# СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ
## ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА НАУЧНАТА СТЕПЕН
## Доктор на медицинските науки

1. **Христова И**, B. Wilske, U. Hauser. Серологична диагностика на Еритема мигранс с ELISA, ИФТ и рекомбинантен Уестърн блот. Инфектология 33, **1996**, 4, 23-26.
2. **Christova I**, M. Polianova, L. Durmishev, G. Georgieva, L. Froloshka. Characterization of Bulgarian Borrelia burgdorferi strains. Probl. Inf. Parasit. Dis. 24, **1997**, 1, 16–18.
3. **Christova I**, J.Tzvetanov. Isolation and electron microscopy examination of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. Probl. Inf. Parasit. Dis. 24, **1997**, 2, 30–31.
4. **Христова И**. Имуноензимен метод за откриване на антитела към антигените на *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Информационен журнал на НЦЗ-ПБ, бр.2, **1997**, 2, 13–16.
5. **Christova I,** S. Hohenberger, C. Zehetmeier, B. Wilske. First characterization of *Borrelia burgdorfer*i sensu lato from ticks and skin biopsy in Bulgaria. Med. Microbiol. Immunol. 186, **1998**, 171–175. **IF 1,500**$_{(1998)}$Цитирания 7.
6. **Христова И**. Проучвания върху микробиологичната диагностика, хуморалния имунен отговор и антигенните особености на причинителите на Лаймската борелиоза у нас. Дисертация за присъждане на образователната и научна степен "Доктор", София, **1998** г.
7. **Christova I.**, JS Dumler. Human granulocytic ehrlichiosis in Bulgaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60, **1999**, 58–61. **IF 1,932**$_{(1999)}$ Цитирания 36
8. **Христова И**, К. Бакърджиев. Първи случай на човешка гранулоцитна ерлихиоза в България. Инфектология 38, **2001**, 1, 30–31.
9. Комитова Р., Л. Ангелов, **И. Христова**, Г. Чапкънов. Случай на Лайм кардит. Инфектология 38, **2001**, 2, 32–35.
10. **Christova I..**, J. van de Pol, S. Yazar, E. Velo, L. Schouls. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group rickettsiae in ticks from Southeastern Europe. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22, **2003**, 535–542. **IF 1.477**$_{(2003)}$ Цитирания 46.
11. **Christova I**., E. Tasseva, D. Russimova. Serodiagnosis of Lyme borreliosis in Bulgaria: Comparison of the two most commonly used commercial ELISA kits and the in house ELISA. Probl. Inf. Parasit. Dis. 30, **2002**, 1, 16–19.
12. **Христова И**., Е. Тасева. Случай на борелиен лимфоцитом. Инфектология 39, **2002**, 2, 44–45.
13. Комитова Р, Л. Ангелов, **И. Христова**, М. Мурджева, Г. Генев, Т. Ракаджиева. Еритема мигранс в България – основни характеристики. Инфектология, 40, **2003**, 1, 25–29.

**14. Христова И**, Е. Тасева, I. van de Pol, L. Schouls. Борлелии, ерлихии и рикетсии в български кърлежи от вида *Ixodes ricinus*. Инфектология, 40, **2003**, 1, 19–22.

**15. Christova I.,** R. Komitova. Clinical and epidemiological features of Lyme borreliosis in Bulgaria. Wien. Klin. Wochenschr. 116, **2004**, 1–2, 42–46. **IF 0.901**$_{(2004)}$ Цитирания 15.

16. Papa A., **I. Christova**, E. Papadimitriou, A. Antoniadis. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Bulgaria. Emerg. Infect. Dis. 10, **2004**, 8, 1465–1467. **IF 5.643**$_{(2004)}$ Цитирания 57.

**17. Christova I**, Tz. Velinov, T. Kantardjiev, A. Galev. Tularemia outbreaks in Bulgaria. Scand. J. Infect. Dis. 36, **2004**, 11–12, 785–789. **IF 1.141**$_{(2004)}$ Цитирания 27.

**18. Christova I.** T. Gladnishka. Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. Ann. Agric. Environ. Med. **2005**, 12, 149–152. **IF 1.051**$_{(2005)}$ Цитирания 16.

19. Gladnishka T, E. Tasseva, **I. Christova**, M. Nikolov, S. Lazarov. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplsma phagocytophilum* and spotted fever group rickettsiae in ticks from the region of Sofia, Bulgaria (Acari: Parasitiformes: Ixodidae). European Arachnology **2005**. (Deltzhev C. & Stoev P. eds). Acta zoologica bulgarica, suppl. No.1, 339–343.

**20. Христова И**., Е.Тасева, Т.Гладнишка. Човешката гранулоцитна анаплазмоза в България, сп. Инфектология XLIV, **2007**, 3, 20–23.

21. Гладнишка Т., **Христова И**. Тасева Е., Ненова Р. Серологични и молекулярно-генетични данни за инфекция с *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* и *Francisella tularensis* в диви гризачи, сп. Инфектология, XLIV, **2007**, 4, 18–21.

22. Гладнишка Т, Е. Тасева, **И. Христова**, PCR диагностика на *Borrelia burgdorferi* sensu lato при пациенти с ранна Лаймска борелиоза. Инфектология XLIV, **2007**, 32–34.

**23. Christova I**., T. Gladnishka, E. Tasseva. A case of Lyme carditis with atrioventricular block and review of the literature. Probl. Inf. Parasit. Dis. 35, **2007**, 1, 21–22.

**24. Христова И**, Е.Тасева, Т.Гладнишка, К. Бакърджиев, Р. Комитова, П. Илиева, Л. Андонова, Г. Горанова, К. Йорджева, Н. Балникова. Човешката гранулоцитна анаплазмоза в България – потвърдени случаи и обзор на литературата. Медицински преглед 44, **2008**, 2, 63–67.

25. Kalvatchev N, **I. Christova**. One step RT-PCR for rapid detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. Biotechnology 22, **2008**, 3, 864–866. **IF 0.291**$_{(2009)}$.

**26. Христова И**., М. Лесева, Г. Милошев. Клониране, експресия и доказване на рекомбинантни *Borrelia burgdorferi* протеини – OspA OspC. Инфектология XLV, **2008**, 3, 16–19.

**27. Христова И**., М. Лесева, Г. Милошев, Шулте-Спехтел У, Хизо-Теуфел С, Б. Вилске. Рекомбинантна експресия в *Escherichia coli* на *Borrelia burgdorferi* протеините VlsE и DbpA. Инфектология XLV, **2008**, 3, 33–36.

28. Кълвачев Н, **И. Христова**. Изследване на пациенти съмнителни за Кримска-Конго хеморагична треска (КККТ) чрез RealTime PCR. Инфектология XLVI, **2009**, 1, 4–6.
**29. Christova I**, E. Tasseva, J. Nacheva, T. Kovacheva, I. Trifonova, T. Gladnishka, V. Ivanova. Antibody response follow-up after vaccination of humans with Bulgarian Crimean Congo hemorrhagic fever virus vaccine. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences. 63, **2010**,12, 1815–1822. **IF 0.219**$_{(2010).}$
30. Кълвачев Н, **И. Христова**. Изследване на пациенти, съмнителни за Кримска-Конго хеморагична треска (КККТ) чрез RealTime RT-PCR. Инфектология XLVII, **2010**, 1, 3–5.
31. Комитова Р, **И. Христова**, С. Желязкова, М. Маринова, И. Боев. Кримска-Конго хеморагична треска в Южна България. Медицински преглед, 46, **2010**, 3, 55–60.
32. Кълвачев Н, **И. Христова**. Възможности на имунодиагностичните методи РСК и ELISA за откриване на антитела срещу вируса на Кримската-Конго хеморагична треска в човешки серуми. Инфектология XLVII**, 2010**, 1, 30–32.
33. Trifonova I., **I. Christova**, T. Gladnishka, E. Taseva, V. Ivanova. Cloning and expression of OspC (Outer surface protein) from Borrelia burgdorferi sensu stricto. Probl. Inf. Parasit. Dis., 38, **2010**, 1, 9–10.
34. Trifonova I., **I. Christova**, T. Gladnishka, E. Taseva, V. Ivanova. Human serum reactivity against Borrelia OspC, OspA, FlaB and VlsE protein antigens in early and disseminated Lyme borreliosis. Probl. Inf. Parasit. Dis., 38, **2010**, 1, 11–14.
**35. Christova I**, Ivanova V, Trifonova I., T. Gladnishka, E. Taseva, V. Ivanova. Comparison of a complement fixation assay, ELISA and immunoblot for serologic diagnosis of hantavirus infections in Bulgaria. Probl. Inf. Parasit. Dis., 38, **2010**, 47–48.
36. Трифонова И, И. Христова, Т. Гладнишка, Е. Тасева, В. Иванова. Сравнение възможностите на ELISA метод с цялоклетъчен и рекомбинантни OspC и FlaB антигени за диагностика на ранна Лаймска борелиоза. Инфектология. XLVII, 2, **2010**, 24–27.
37. Кълвачев Н, Л. Андонова, М. Тихолова, Т. Червенякова, **И. Христова**. Система SYBR Green I Real-time RT-PCR за доказване и анализ на инфекция, причинена от вируса на Кримската Конго хеморагична треска. Наука Инфектология Паразитология 1, **2011**, 1, 16–21.
**38. Христова И,** И. Диков, Л. Андонова, Е. Тасева, Н. Кълвачев, Ш. Попал, Р. Михайлова, М. Пишмишева, И. Балтаджиев, М. Славова, К. Плочев. Четири случая на кърлежов енцефалит в България. Наука Инфектология Паразитология 1, **2011**, 1, 43–45.
39. Keshtkar-Jahromi M, JH Kuhn, **I Christova**, SB Bradfute, PB Jahrling, S Bavari. Crimean-Congo hemorrhagic fever: Current and future prospects of vaccines and therapies. Antiviral Res 90, **2011**, 2, 85–92. **IF 4.439**$_{(2010)}$ Цитирания 3.
40. PapaA, E. Papadimitriou, **I. Christova**. The Bulgarian vaccine Crimean-Congo haemorrhagic fever virus strain. Scand. J. Infect. Dis. 43, **2011**,3, 225–229. **IF 1.562**$_{(2010)}$ Цитирания 2.

Общ IF – 20.156 Общ брой цитирания – 209

# УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. Кримска-Конго хеморагична треска. Съвременни подходи за диагностика, епидемиология, превенция, терапия. Участници – консорциум с представители от Швеция, Белгия, Франция, Германия, Гърция, Турция, Албания, България, Южна Африка, Словения, САЩ и Израел. Ръководител от българска страна – доц. д-р Ива Христова. Финансиране: Седма Рамкова Програма на ЕС. Период: 2010–2013 г.
2. Разработване и сравнителни проучвания на видово-специфични IR6–VlsE пептидни ELISA за диагностика на Лаймската борелиоза. Ръководител – доц.д-р Ива Христова. Финансиране: Фонд „Научни изследвания", МОН. Договор Д002–357/2008. Период: 2009–2011 г.
3. Сървейланс на причинителите на неясните остри фебрилни състояния в България. Съвместен проект на НЦЗПБ с NAMRU#3, Египет. Ръководител от българска страна – доц. д-р Ива Христова. Период: 2008–2011 г.
4. Проучвания върху дребните мишевидни бозайници като резервоари на хантавируси в България. Съвместен проект на НЦЗПБ с NAMRU#3, Египет. Ръководител от българска страна – доц. д-р Ива Христова. Период: 2011–2012 г.
5. Природо-огнищни инфекции при гризачи със значение за човешката патология – еколого-епидемиологични проучвания и географско разпространение в България. Финансиране: МОН. Съвместен проект с ПУ „П. Хилендарски". Ръководител от страна на НЦЗПБ – доц. д-р Ива Христова. Период 2011–2013 г.
6. Разработване на имуноензимен тест с рекомбинантни Borrelia burgdorferi антигени за по-специфична серологична диагностика на Лаймската борелиоза в България. Договор Л-1509/2005. Финансиране: Фонд „Научни изследвания", МОН. Период: 2006–2008 г. Ръководител на проекта – доц. д-р Ива Христова, дм.
7. Разработване на комплексен подход за доказване с генетични методи на причинителите на предаваните с кърлежи инфекции. Договор Л-1302/2003. Финансиране: Фонд „Научни изследвания", МОН. Период: 2004–2006 г. Ръководител на проекта – н.с. д-р Ива Христова, дм.
8. Клинико-лабораторни и еколого-епидемиологични проучвания върху човешката гранулоцитна ерлихиоза в България. Договор Л-909/99. Финансиране: Фонд „Научни изследвания", МОН. Период: 1999–2001 г. Ръководител на проекта –н.с.д-р Ива Христова, дм.
9. Проучвания върху морфологичните, антигенни и генетични особености на щамове от комплекса Borrelia burgdorferi, причиняващи Лаймската борелиоза в България и приложението им в серологичната диагностика на болестта. Договор Л-441/94. Финансиране: Фонд „Научни изследвания", МОН. Период: 1995–1997 г. Ръководител на проекта – д-р Христо Манев, дмн
10. Проучвания върху Лаймската болест: микробиологична диагностика, заразеност на иксодовите кърлежи с Borrelia burgdorferi и епидемиологични аспекти на болестта. Договор Л-218/92. Финансиране: Фонд „Научни изследвания", МОН. Период: 1992–1994 г. Ръководител на проекта – д-р Христо Манев, дмн.