



НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

## **Ивелина Трифонова Трифонова**

ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО В БЪЛГАРИЯ И  
ГЕНЕТИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЧОВЕШКИТЕ  
МЕТАПНЕВМОВИРУСИ, ПАРАГРИПНИ ВИРУСИ И  
БОКАВИРУСИ

### **АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд  
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”**

Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика;  
Професионално направление: 4.3. Биологически науки  
Научна специалност: Вирусология

Научен ръководител:  
проф. д-р Нели Корсун, дмн

София, 2019 г.

Дисертационният труд е представен на разширен колегиум на отдел „Вирусология” на 18.11.2019г. и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд съдържа 215 страници. Включва 26 фигури, 39 таблици, обобщени изводи, приноси и 2 приложения. Списъкът на цитираната литература обхваща 358 заглавия, от които 2 на кирилица.

Анализите са извършени в отдел „Вирусология”, НЦЗПБ. Материалите по защитата са публикувани в интернет страницата на НЦЗПБ и се намират на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, София.

---

---

**Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ..... от.....ч. в аулата на НЦЗПБ, гр.София, бул. „Янко Сакъзов” №26 на открито заседание на научно жури , назначено от Директора на НЦЗПБ, съгласно ППЗРАСРБ на НЦЗПБ и ЗРАСРБ.**

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

- BPV говежди парвовирус
- CDC – Центрове за контрол и превенция на заболяванията
- CMV (canine minute virus) - кучешки парвовирус
- DEPC -diethylpyrocarbonate
- dNTP (дНТФ) – дезоксинуклеозид трифосфат
- EIA- имуноензимен тест
- ELISA - ензимно-свързан имуносорбентен тест
- Нер-2 - клетъчна линия от човешки ларингеален карцином
- HRA, HRB (heptad repeat) - хептаден повтор А, В
- LLC-MK2 - клетъчна култура от маймунски бъбречни епителни клетки
- MRC-5 - клетъчна култура от човешки белодробни фибробласти
- OC43, 229E, NL63, HKU1 - човешки коронавируси (CoV) от сем. Coronaviridae
- ОРИ/ОРЗ - остра респираторна инфекция / заболяване
- ORF (Open Reading Frame) – отворена рамка на четене
- PARV4, PARV5- парвовирус 4 и парвовирус 5
- PCR- полимеразно верижна реакция
- Real Time PCR - полимеразно-верижна реакция в реална време
- RT-PCR – полимеразно-верижна реакция с обратна транскрипция
- RV-риновирус
- AdV-аденовирус
- AAB, AAV- аденоасоциираният вирус
- АК – аминокиселина
- АМПВ- птичи метапневмовирус
- ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
- ECDC – Европейски център за контрол и превенция на заболяванията
- ГПЗ – грипозно подобно заболяване
- НК - нуклеинова киселина
- НЦЗПБ – Национален център по заразни и паразитни болести
- РНК - рибонуклеинова киселина
- РСВ, RSV- респираторно-синцитиален вирус
- СЗО - Световната здравна организация
- ЦПЕ - цитопатичен ефект
- ЧБВ, HCoV- човешки бокавирус
- ЧМПВ, HMPV - човешки метапневмовирус
- ЧПГВ, HPIV - човешки парагрипен вирус

Име на аминокиселината – еднобуквен код:

Глицин – G  
Алаин – A  
Валин – V  
Изолевцин – I  
Левцин – L  
Пролин – P  
Серин – S  
Треонин – T  
Цистеин – C  
Метионин – M  
Аспарагинова киселина – D  
Аспарагин - N  
Глутаминова киселина – E  
Глутамин – Q  
Лизин – K  
Аргинин – R  
Хистидин – H  
Фенилаланин – F  
Тирозин – Y  
Триптофан – W

## Съдържание

I. ВЪВЕДЕНИЕ .....	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	9
1. ИЗСЛЕДВАНА ПОПУЛАЦИЯ И КЛИНИЧНИ ПРОБИ.....	9
2. ВЗЕМАНЕ, СЪХРАНЯВАНЕ И ТРАНСПОРТИРАНЕ НА КЛИНИЧНИТЕ ПРОБИ.....	9
3. ЕКСТРАКЦИЯ НА ВИРУСНИТЕ РНК / ДНК .....	9
4. REAL-TIME PCR.....	9
4.1. Доказване на човешки метапневмовирус .....	9
4.2. Доказване на парагрипни вируси 1, 2 и 3 тип .....	9
4.3. Доказване на бокавируси.....	9
4.4. Доказване на грипни вируси и вируси на ОРЗ.....	9
5. MULTIPLEX PCR.....	9
6. СЕКВЕНИРАНЕ .....	9
7. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ .....	9
8. СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ .....	9
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	9
1. ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЕТИОЛОГИЧНАТА СТРУКТУРА НА ОСТРИТЕ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ И ОПРЕДЕЛЯНЕ ДЕЛА НА ИНФЕКЦИИТЕ, ПРИЧИНЕНИ ОТ ЧОВЕШКИЯ МЕТАПНЕВМОВИРУС, ПАРАГРИПНИ ВИРУСИ И БОКАВИРУСИ. . 9	
2. ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА СМЕСЕНИТЕ ВИРУС-ВИРУС ИНФЕКЦИИ .....	16
3. СЕЗОННОСТ НА ВИРУСНИТЕ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ....	18
4. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ВЪЗРАСТ НА ПАЦИЕНТИТЕ С ДОКАЗАНИ ВИРУСНИ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ.....	20

5. УЧАСТИЕ НА ПРОУЧВАНИТЕ РЕСПИРАТОРНИ ВИРУСИ В РАЗВИТИЕ НА РАЗЛИЧНИ КЛИНИЧНИ СИНДРОМИ.....	23
6. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ГЕНОТИПОВЕТЕ НМРV НА БАЗАТА НА F ГЕНА.....	31
• Молекулярна епидемиология на НМРV на базата на F гена	32
• Аминокиселинен анализ на F протеина на българските ЧМПВ	33
7. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ВоV НА БАЗАТА НА VP1/VP2 ГЕНА .....	34
• Молекулярна епидемиология на ВоV на базата на частичен VP1/VP2 ген.....	36
• Аминокиселинен анализ на VP1/VP2 протеина на българските ВоV-1	36
V. ИЗВОДИ .....	37
VI. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ (НАУЧНИ ПРИНОСИ) .....	39
<b>VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА</b> .....	39
<b>VIII. УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ И НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	40

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Острите респираторни инфекции (ОРИ) са свързани с висока заболяемост, значителна смъртност, огромни медицински, икономически и социални разходи. ОРИ се причиняват от голям брой респираторни патогени – вируси, бактерии, фунги и паразити, като около 80% от инфекциите имат вирусна етиология. Вирусите предизвикват разнообразни клинични симптоми с варираща тежест – от леки заболявания на горните дихателни пътища (ринит, фарингит, ларингит) до тежки, понякога животозастрашаващи заболявания на долния респираторен тракт (бронхит, бронхиолит и пневмония). Острите инфекции на горните дихателни пътища са най-масовите инфекциозни заболявания при хората и най-честата причина за търсене на медицинска помощ, особено в детска възраст. Рискови групи за тежко протичащи ОРЗ и усложнения са децата на възраст под 5 год., лицата в напреднала възраст и имунокомпрометираните индивиди. До началото на молекулярната ера в диагностичната вирусология използваните методи за доказване на респираторни вируси – вирусни култури, имуофлуоресцентен метод и серология не позволяваха да се оцени истински тежестта на вирусните ОРИ и ролята на отделните вируси в тях. Тези методи са трудоемки, продължителни, с ниска чувствителност и не се използваха рутинно в клиничните лаборатории. Широкото прилагане на молекулярните методи през последните десетилетия осигурява бърза и прецизна диагностика, благодарение на която е възможно предприемане на адекватно лечение и на ефективни мерки за контрол и превенция на инфекциите. Идентифицирани са над 200 типа вируси, причинители на ОРИ, основните от които са грипни вируси, респираторно-синцитиален вирус (РСВ), човешки метапневмовирус (ЧМПВ), парагрипни, адено-, рино-, корона- и бокавируси. С повишеното доказване на негрипните респираторни вируси и установяване на тяхното значение в етиологията на клинично важни синдроми, много страни включват диагностиката на тези вируси в системата за надзор на грипа. Проучването на разпространението на отделните вирусни патогени, на тяхната сезонност, генетичното разнообразие, възприемчивите групи от населението и др. е важно при разработване и въвеждане на ваксини и антивирусни препарати. В България, както и в други страни, от вирусните респираторни патогени най-добре проучени са грипните вируси и РСВ поради тяхното важно клинично и епидемиологично значение. Проучванията на парагрипните вируси у нас са с голяма давност и са извършени с класически вирусологични техники, а тези на ЧМПВ са проведени с молекулярни методи (RT-PCR), но в малък обем. По отношение на бокавирусите като респираторни патогени не са провеждани никакви изследвания. В настоящия дисертационен труд си поставихме задача да

проучим тези три групи респираторни патогени, за чието разпространение през последните години и генетични характеристики информацията е малка или липсва.

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи разпространението на човешкия метапневмовирус, парагрипни вируси и бокавируси в България, тяхното участие при възникване на някои клинично важни синдроми, да се извърши генетичен анализ на доказаните вируси.

За осъществяване на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се характеризира етиологичната структура на ОРИ в България през три последователни сезона и се определи дела на инфекциите, причинени от човешкия метапневмовирус, парагрипни вируси и бокавируси.
2. Да се определи сезонността на острите респираторни инфекции в България с акцент върху инфекциите, причинени от човешкия метапневмовирус, парагрипни вируси и бокавируси.
3. Да се проучи участието на човешкия метапневмовирус, парагрипни вируси и бокавируси при възникване на заболявания в пациенти от различни възрастови групи.
4. Да се характеризират смесените вирус-вирус инфекции.
5. Да се проучи участието на човешкия метапневмовирус, парагрипни вируси и бокавируси при възникване на някои клинично важни синдроми.
6. Да се извърши генетичен анализ на доказаните човешки метапневмовируси.
  - 6.1. Да се извърши филогенетичен анализ на гена F в циркулиращите метапневмовируси и се установи тяхната принадлежност към известните генетични групи/субгрупи.
  - 6.2. Да се извърши анализ на аминокиселинните секвенции на протеина F в циркулиращите човешки метапневмовируси; да се проучи наличието на замени на аминокиселини в сравнение с прототипните вируси, като специално внимание се обърне на наличието на замени във функционално важни участъци; да се проучат потенциалните участъци на гликозилиране.
7. Да се извърши генетичен анализ на доказаните бокавируси.
  - 7.1. Да се извърши филогенетичен анализ на гена VP1 в циркулиращите бокавируси и се установи тяхната принадлежност към известните генетични типове.
  - 7.2. Да се извърши анализ на аминокиселинните секвенции на протеина VP1 в циркулиращите бокавируси; да се проучи наличието на замени на аминокиселини в сравнение с прототипните вируси.



### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **1. ИЗСЛЕДВАНА ПОПУЛАЦИЯ И КЛИНИЧНИ ПРОБИ**

#### **2. ВЗЕМАНЕ, СЪХРАНЯВАНЕ И ТРАНСПОРТИРАНЕ НА КЛИНИЧНИТЕ ПРОБИ**

#### **3. ЕКСТРАКЦИЯ НА ВИРУСНИТЕ РНК / ДНК**

#### **4. REAL-TIME PCR**

4.1. Доказване на човешки метапневмовирус

4.2. Доказване на парагрипни вируси 1, 2 и 3 тип

4.3. Доказване на бокавируси

4.4. Доказване на грипни вируси и вируси на ОРЗ

#### **5. MULTIPLEX PCR**

#### **6. СЕКВЕНИРАНЕ**

Конвенционален RT-PCR за размножаване на гена F на HMPV

Конвенционален PCR за размножаване на участък от гена VP1 на BoV

Пречистване на PCR продукти

Секвениращ PCR (Cycle sequencing)

Пречистване на продуктите на секвениращата реакция

Секвениране

#### **7. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ**

Нуклеотиден и аминокиселинен анализ

Участъци на N и O гликозилиране

#### **8. СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

### **IV. РЕЗУЛТАТИ**

#### **1. ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЕТИОЛОГИЧНАТА СТРУКТУРА НА ОСТРИТЕ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ В БЪЛГАРИЯ И ОПРЕДЕЛЯНЕ ДЕЛА НА ИНФЕКЦИИТЕ, ПРИЧИНЕНИ ОТ ЧОВЕШКИЯ МЕТАПНЕВМОВИРУС, ПАРАГРИПНИ ВИРУСИ И БОКАВИРУСИ.**

Периодът на проучването включва 3 последователни зимни грипни сезона – 2016/2017 (седмица 40/2016 – седмица 20/2017), 2017/2018 (седм. 40/2017 – седм. 20/2018) и 2018/2019 г. (седм. 40/2018 – седм. 20/2019), т.е. месеците октомври - май, както и периодите между сезоните: седм. 21 - седм. 39 на 2017, 2018 и 2019 г., т.е. месеците юни - септември, обозначени условно като лято на 2017, 2018 и 2019 г. Указаната продължителност на грипните сезони в страните от северното полукълбо е фиксирана от СЗО, тъй като това е периодът на циркулация на грипните вируси и на повишена активност на другите вируси на

ОРЗ. Грипните епидемии през проучените три зимни сезона в България се характеризират с умерена интензивност на епидемичния процес от грип и ОРЗ, умерена заболяемост и средна продължителност. Динамиката на епидемичния процес през сезон 2016/2017 г. се различава от тази през следващите два сезона с по-ранни начало, пик и край на епидемията. Заболяемостта от грип и ОРЗ започва да се повиша през седмица 44/2016 г. и достига пик през седмица 1/2017 г. - с около месец по-ранно в сравнение със следващите два сезона, когато подемот на заболяемостта започва през 49 седм./2017 и 2018 г., следва спад по време на коледните и новогодишни празници и пикът на епидемиите е през седм. 4/2018 и 2019 г.. По време на пика на епидемията заболяемостта е най-висока през сезон 2018/2019 г. (247.92 души/10 000 население), следвана от тази през сезон 2017/2018 г. (230.83 души/10 000 население). Най-ниска е през сезон 2016/2017 г. – 215.52 души/10 000 население за заболяемостта от грип и ОРЗ в България).

И през 3-те сезона заболяемостта е най-висока при децата на възраст 0-4 год., следвани от тези на възраст 5-14 год.. Изключение от тази тенденция прави сезон 2017/2018 г., през който разликата в заболяемостта на тези възрастови групи е по-малка. През пиковата 4-та седмица на 2018 г. заболяемостта от грип и ОРЗ във възрастовата група 5-14 години - 722,84 на 10 000 души е по-висока от тази във възрастовата група на 0-4 години – 719,84 на 10 000 души.

През периода октомври 2016 г. – септември 2019 г. са изследвани клинични проби на общо 1842 пациента от различни възрастови групи и региони на страната. В проучването не са включени пациенти от взривове в организирани колективи (детски заведения, социални домове и др.). Възрастта на пациентите варира от 10 дни до 93 год. с медиана на възрастта при пациентите над 5 год. - 66 год., а при деца <5 год. - 23 мес. Пациентите са категоризирани в 4 възрастови групи: 1332 (72.3%) са на възраст 0-4 год., 169 (9.2%) са на 5-17 год., 75 (4.1%) са на 18-64 год. и 265 (14.4%) са  $\geq 65$  год. Най-голям брой изследвани пациенти са тези на възраст 0-4 год., следвани от възрастните  $\geq 65$  год., тъй като крайните възрастови групи са рискови за тежко протичащи респираторни заболявания и за усложнения. Освен това заболяемостта през трите сезона на проучването е най-голяма при децата на възраст 0-4 год. (74.6%). От изследваните пациенти 1008 (54.7%) са от мъжки и 820 (44.5%) от женски пол (таблица 1). 1200 (65.1%) от клиничните проби са изпратени от здравни и лечебни заведения в гр. София. Останалите 642 (34.9%) са от пациенти, лекувани в различни региони на страната. Видът на изследваните проби е както следва: 1829 (99.3%) носогърлени секрети; 1 трупен материал, 1

трахеален секрет, 2 бронхоалвеоларни лаважа (БАЛ), 6 ликвора, 2 перикардни пунктата и 1 ендомиокардна биопсия (ЕМБ).

С цел характеризиране на етиологичната структура на ОРЗ в България клинични проби на 1842 пациенти са изследвани чрез отделни Real Time RT-PCR реакции по отношение на 12 често срещани респираторни вируси: грипни вируси А(H1N1)pdm09, А(H3N2), В/Yamagata и В/Victoria, респираторно-синцитиален вирус (RSV), човешки метапневмо вирус (HMPV), парагрипни вируси (PIV) 1/2/3 тип, риновируси (RV), аденовируси (AdV) и бокавируси (BoV). От тях 286 проби са изследвани също чрез индивидуални Real Time RT-PCR реакции по отношение и на 4-те човешки коронавируса: OC43, 229E, NL63 и HKU1 (232 - през сезон 2016/2017 г., 3 – през лято 2017 г., 25 - през сезон 2017/2018 г. и 26 - през сезон 2018/2019 г.). Допълнително 203 проби (91 през сезон 2016/2017 г., 29 – през сезон 2017/2018 г., 11 – през лятото на 2018 г. и 72 през сезон 2018/2019 г.), показали отрицателни резултати в Real Time RT-PCR, са подложени на Multiplex PCR, позволяващ доказване на 15 респираторни вируса, включително PIV-4 и EV, които не са изследвани чрез Real Time RT-PCR.

Таблица 1. Демографски характеристики на изследваните пациенти

Категория	Подкатегория	Брой (%)
<b>Възраст</b>	Медиана	23 мес./ 66 год (<5 год./ >5 год.)
	Диапазон	10 дни – 93 год.
	0-4 год.	1332 (72.3%)
	5-17 год.	169 (9.2%)
	18-64 год.	75 (4.1%)
	≥65 год.	265 (14.4%)
<b>Пол</b>	Мъже	1008 (54.7%)
	Жени	820 (44.5%)
<b>Локализация</b>	София	1200 (65.1%)
	Други региони на страната	642 (34.9%)
<b>Пациенти</b>	Амбулаторно лекувани	225 (12.2%)
	Хоспитализирани	1617 (87.8%)
	От тях хоспитализирани в интензивни отдел	54
	Починали	8

Около 88% от изследваните пациенти са хоспитализирани по повод на грипоподобни заболявания (ГПЗ) или остри респираторни заболявания (ОРЗ) в различни лечебни заведения на страната. През всеки един от периодите на

изследването броят на хоспитализираните пациенти е значително по-висок от този на амбулаторно лекуваните.

Общо в 1229 (66.7%) пациента е идентифициран поне един респираторен вирус, докато 613 (33.3%) пациента са негативни за всички изследвани вируси. Респираторни вируси са идентифицирани в носогърлените секрети на пациентите и в единия изследван БАЛ. В останалите изследвани клинични проби, включително в ликворите, не са доказани вируси. Не са установени значителни различия в процента на положителните резултати при пациентите от мъжки (1008/69.3%) и женски пол (820/64.7%). При сравняване на броя на инфектираните пациенти през 3-те зимни сезона се установява, че процентът на позитивните резултати е най-висок през сезон 2016/2017 г. (72.7%), следван от сезон 2017/2018 г. (69.4%) и най-нисък през сезон 2018/2019 г. (61.4%)( $p < 0.05$ ). Таблица 2. Брой (%) инфектирани и негативни пациенти, които са амбулаторно лекувани или хоспитализирани

Пациенти	Общ брой изследвани пациенти	Брой (%) пациенти с доказан поне един респираторен вирус	Брой (%) пациенти без доказани респираторни вируси	P
Амбулаторно лекувани	225	130 (57.8%)	95 (42.2%)	-
Хоспитализирани	1617	1099 (68%)	518 (32%)	P=0.0032

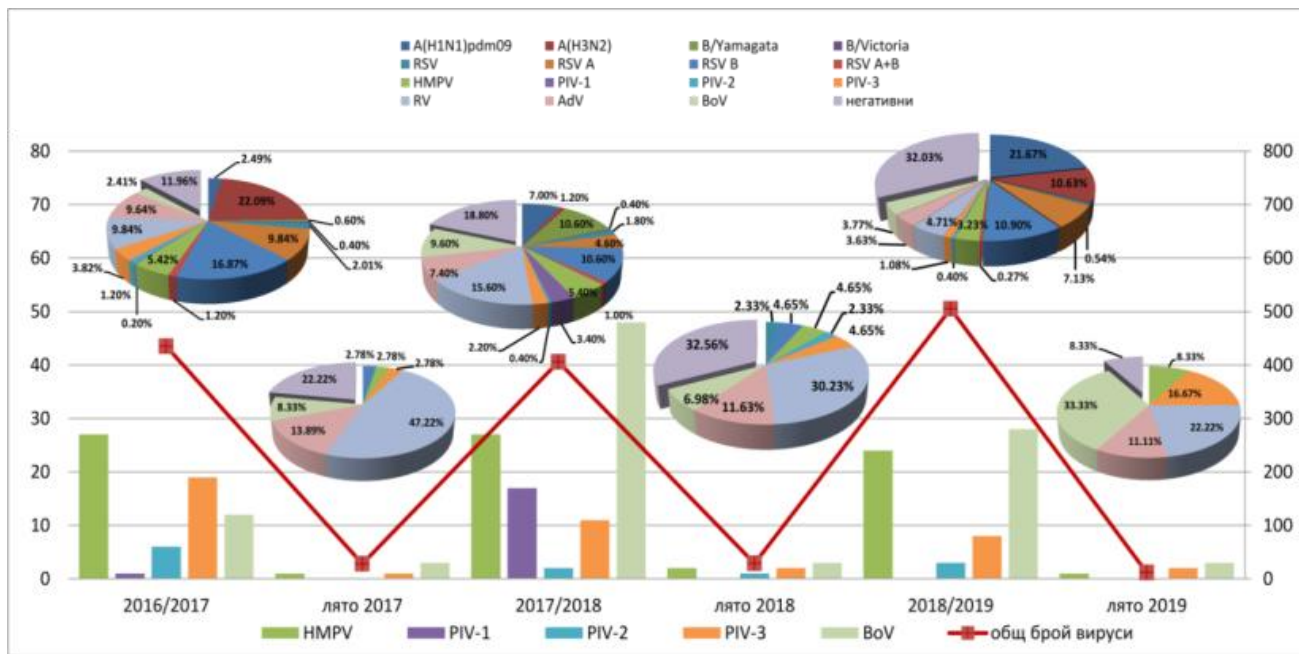
Процентът на инфектираните с респираторни вируси хоспитализирани пациенти е значително по-голям в сравнение с процентът на инфектираните с респираторни вируси амбулаторно лекувани пациенти ( $p < 0.05$ ).

Сред изследваните чрез Real Time RT-PCR общо 1842 пациента е доказан следният брой (%) респираторни вируси: грипен вирус A(H1N1)pdm09 - 205 (11.1%), грипен вирус A(H3N2) - 194 (10.5%), B/Yamagata - 56 (3%), B/Victoria - 4 (0.2%), RSV - 375 (20.4%), HMPV - 83 (4.5%), PIV 1/2/3 - 73 (4%), RV - 182 (9.9%), AdV - 125 (6.8%) и BoV - 98 (5.3%). Доказаните коронавируси сред общия брой 286 изследвани пациенти е както следва: OC43 - 10 (3.5%), 229E - 3 (1%), NL63 - 17 (5.9%) и HKU1 - 4 (1.4%). Чрез изследване с Multiplex PCR на 203 проби са доказани допълнително PIV4 - 4 (2%) и EV - 2 (1%). С най-голяма честота на доказване се характеризира RSV, следван от грипните вируси A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), риновирусите и аденовирусите. По честота на разпространение проучваните бокавируси, метапневмовирус и парагрипни вируси (общо) заемат шесто, седмо и осмо място. Те формират условна група със средна честота на разпространение. По-рядко от тях разпространение имат

грипните вируси тип В, коронавируса и респираторните ентеровируси. Молекулярните методи дават възможност да се извърши генотипиране на парагрипните вируси. Доказани са представители и на 4-те известни типове парагрипни вируси (1/2/3 тип са доказани с Real Time RT-PCR, 4 тип – с Multiplex PCR), като с най-голяма честота са идентифицирани парагрипни вируси 3 тип – 43 (2.3%), а най-рядко са доказани тези от 2 тип – 12 (0.7%). Парагрипен вирус 4 тип е доказан в 4 (2%) пациента при изследване с Multiplex PCR.

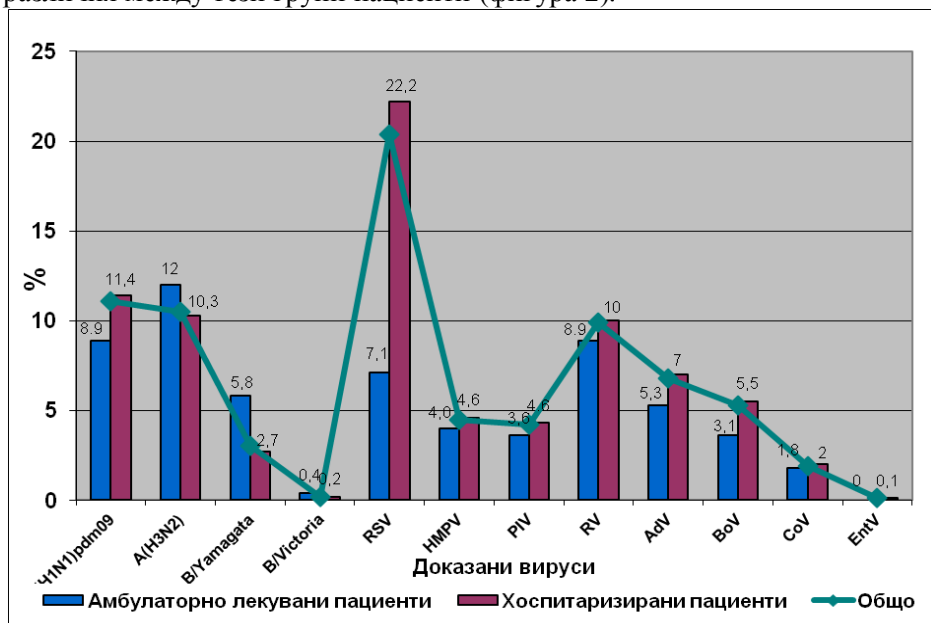
На фигура 1 е показан броят (%) на пациентите с доказани респираторни вируси в отделните периоди на проучването. Наблюдавани са вариации в честотата на доказване на отделните респираторни вируси през указаните периоди на проучването. Грипен вирус А(Н1N1)рdm09 е доказан с най-голяма честота през сезон 2018/2019 г. и е сравнително рядко идентифициран през сезон 2016/2017 г. Грипен вирус А(Н3N2) има много силно разпространение през сезон 2016/2017 г. и сравнително слаба циркулация през сезон 2017/2018 г. Грипните вируси тип В са чести причинители на ГПЗ и ОРЗ през сезон 2017/2018 г. (с доминиране на тези от линията В/Yamagata) и липсват през последния проучван сезон.

Респираторно-синцитиалният вирус е доказан най-често през сезон 2016/2017 г. ( $p < 0.05$ ), много рядко през летните месеци на 2017 и 2018 г. и не е откриван през лятото на 2019 г. През всички периоди на проучването преобладават РСВ от група В. Човешкият метапневмовирус има умерено разпространение през отделните сезони (по-слабо през последния сезон), но се доказва и през летните месеци на 2017, 2018 и 2019 г. През периода на проучването парагрипните вируси имат сравнително слабо разпространение в страната. През сезон 2018/2019 г. е доказан най-малък общ брой парагрипни вируси – 12, докато през сезон 2016/2017 г. те са 28, а през сезон 2017/2018 г. – 29 ( $p < 0.05$ ). Парагрипен вирус 1 тип има по-голяма честота през сезон 2017/2018 г., но липсва през сезон 2018/2019 г., както и през летните месеци. Парагрипни вируси 2 и 3 тип са по-разпространени през сезон 2016/2017 г. Парагрипен вирус 4 тип е епизодично доказван през първите два сезона и липсва пред 3-я сезон. През всички летни месеци се идентифицира епизодично парагрипен вирус 3 тип, а през лято 2018 г. – парагрипни вируси 1-и и 4-ти тип. Риновирусите преобладават през сезон 2017/2018 г. ( $p < 0.05$ ). Аденовирусите са най-много през първия и втория сезон и доста по-малко през 3-я сезон ( $p < 0.05$ ). Коронавирусите имат сравнително слабо разпространение в страната, по-често са доказвани през сезон 2016/2017 г. с преобладаване на вирус NL63, следван от вирус ОС43. От ентеровирусите са доказани само два – през сезони 2016/2017 и 2017/2018 г.



Фигура 1. Брой (%) разпределение на пациентите с доказани респираторни вируси през отделни периоди на проучването

Сред доказаните респираторни вируси най-голям е дял заема RSV (30.5%), следван от грипни вируси A(H1N1)pdm09 (16.7%) и A(H3N2) (15.8%) и риновируси (14.8%). Проучваните бокавируси, метапневмовирус и парагрипни вируси (общо) заемат шесто, седмо и осмо място в етиологичната структура на ОРЗ с дял от 8%, 6.8% и 6.3%, съответно. Грипните вируси B/Yamagata и A(H3N2) се доказват с по-голяма честота при амбулаторно лекувани пациенти, докато RSV, грипен вирус A(H1N1)pdm09, аденовируси и бокавируси са по-често идентифицирани при хоспитализирани пациенти. При останалите вируси, в т.ч. при метапневмовируса и парагрипните вируси не са намерени значителни различия между тези групи пациенти (фигура 2).



Фигура 2. Честота на доказване на респираторни вируси в България при амбулаторно лекувани и хоспитализирани пациенти през периода октомври 2016 г. – септември 2019 г.

## 2. ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА СМЕСЕНИТЕ ВИРУС-ВИРУС ИНФЕКЦИИ

По данни от проучвания в различни страни е установено, че в някои клинични проби на пациенти с ОРЗ се доказват повече от един тип респираторни вируси, като процентът на съобщаваните смесени инфекции силно варира в отделните проучвания и при пациентите от различни възрастови групи. Анализирани са броят на вирусните ко-инфекции в България през периода октомври 2016 г. – септември 2019 г. и участието на отделните респираторни вируси в тях. Общо при 187 пациента са доказани ко-инфекции – 172 двойни и 15 тройни. Ко-инфекциите съставляват общо 15.2% от всички (1229) доказани през периода на проучването вирусни инфекции.

През сезон 2016/2017 г. е установен най-голям процент смесени инфекции, следван от тези през сезон 2017/2018 г. Най-малко смесени инфекции са намерени през сезон 2018/2019 г. ( $p < 0.05$ ). Броят на случаите с тройна инфекция също е по-голям през първите два сезона. През месеците извън сезоните (с изключение на лято 2019) също са доказани смесени инфекции – с два вируса, но не и с три вируса.

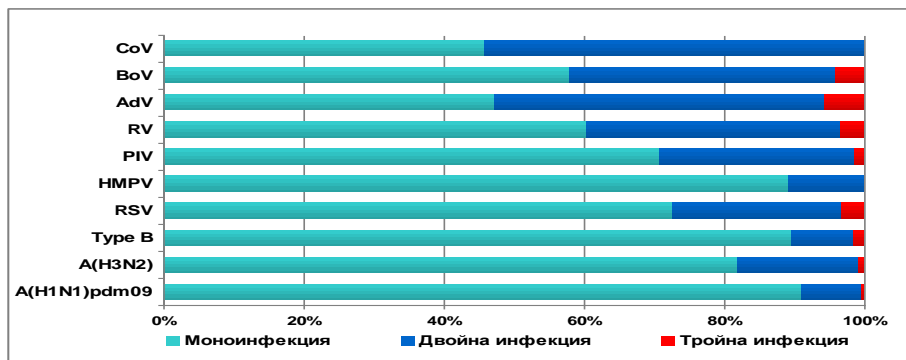
Таблица 3. Брой (%) на смесени вирусни инфекции при амбулаторно лекувани и хоспитализирани пациенти

Пациенти	Брой доказани вирусни инфекции	Общ брой (%) смесени инфекции	Двойни коинфекции	Тройни коинфекции
Амбулаторно лекувани	130	8 (6.2%)	8 (6.2%)	-
Хоспитализирани	1099	179 (16.3%)	164 (14.9%)	15 (1.3%)

Делът на смесените инфекции сред всички доказани вирусни респираторни инфекции при хоспитализирани пациенти е значително по-голям в сравнение с дела на смесените инфекции при амбулаторно лекувани пациенти. Тройни инфекции са доказани само при пациенти, лекувани в болници (таблица 3).

Анализирано е участието на отделните респираторни вируси в случаи моноинфекции и ко-инфекции (фигура 3).





Фигура 3. Дял на моноинфекциите, двойните и тройни инфекции за отделните респираторни вируси. Данните за 4-те типа парагрипни и 4-те типа коронавируси са обединени.

Човешкият метапневмовирус, грипните вируси, РСВ и парагрипните вируси са доказвани сравнително рядко в случаи на ко-инфекции. При тях над 60% от доказаните случаи на инфекции са моноинфекции, което указва на тяхната етиологична роля в даденото заболяване. ЧМПВ заедно с грипните вируси А(Н1N1)pdm09 и В/Yamagata има един от най-високите проценти (около 90%) моноинфекции, но за разлика от тези грипни вируси не е участник в тройни инфекции. Парагрипните вируси и РСВ заемат условно средно място като участници в ко-инфекции с около 70% дял на моноинфекциите. От друга страна аденовирусите, бокавирусите, коронавирусите и риновирусите са сравнително чести партньори в ко-инфекции. При бокавирусите и аденовирусите над половината от идентифицираните случаи на заболявания представляват смесени инфекции, при които е трудно да се определи участникът с водеща етиологична роля.

Най-голям брой (25) коинфекции е идентифициран между РСВ и аденовируси (RSV+AdV), следван от комбинациите между РСВ с риновирус (RSV+RV) (22) и риновирус с бокавирус (RV-BoV) (17), както и между риновирус и аденовирус (RV+AdV) (16). Останалите вирусни комбинации са значително по-малко на брой.

ЧМПВ е идентифициран като участник в 9 двойни инфекции със следните партньори: аденовирус (4 случая), риновирус (3 случая), грипен вирус А(Н3N2), РСВ и бокавирус (по 1 случай). Парагрипните вируси 1, 2 и 3 тип общо са доказани в 19 двойни инфекции в следните комбинации: с грипни вируси А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), риновирус и бокавирус (по 1 и 2 случая), с

аденовирус (1 случай). Установена е тройна комбинация на парагрипен вирус 1 тип с А(Н1N1)рdm09 и РСВ. Бокавирусите участват в ко-инфекции с различни вируси, най-често с риновируси (17 случая) и РСВ (11 случая).

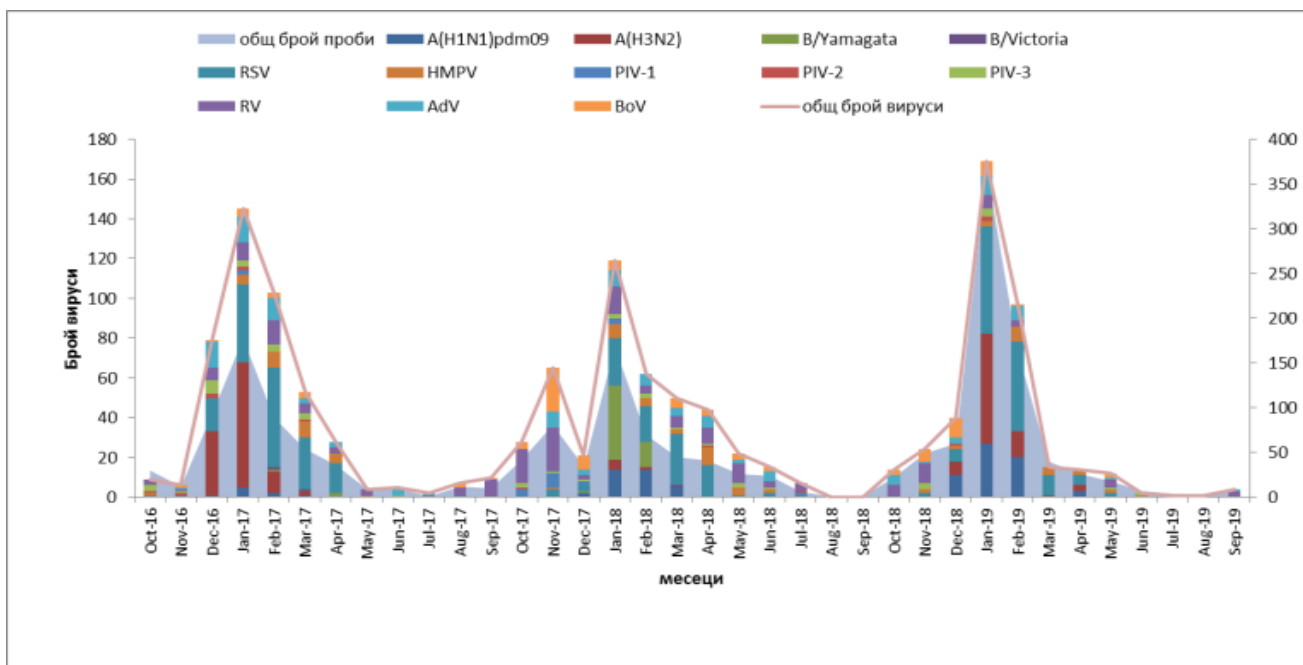
### **3. СЕЗОННОСТ НА ВИРУСНИТЕ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ**

Извършен е анализ на разпространението на човешкия метапневмовирус, парагрипните и бокавирусите по месеци през периода октомври 2016 г. – септември 2019 г., като сезонността на предизвиканите от тях инфекции е сравнена с тази при другите респираторни вируси .

Най-голям брой клинични проби са изследвани през студените месеци на годините със следната последователност: януари, февруари, декември и март, което съответства на периода на повишена заболяемост от грип и ОРЗ. През този период на годината са доказани и най-голям брой вирусни респираторни патогени. На фигура 4 е показан броят на изследваните пациенти по месеци и броят на доказаните отделни респираторни вируси. Грипните вируси са идентифицирани през периода декември-април. Човешкият метапневмовирус има сходна динамика на разпространение с РСВ. Той циркулира успоредно с РСВ през периода ноември-юни с най-голям брой детекции през периода януари-април. Честотата на разпространението му (% положителни проби, изчислен спрямо броя на изследваните през месеца клинични проби), е най-голяма през април и май (15.5% и 15.4%, съответно). За разлика от РСВ не е доказан през юли, септември и октомври. В сравнение с грипните вируси ЧМПВ циркулира по-продължително - започва да циркулира с месец по-ранно, а краят на разпространението му е с два месеца по-късно.

Въпреки по-малкия брой доказани парагрипни вируси може да се направи заключението, че ПГВ 1 и 2 тип се срещат главно през есента и началото на зимата (периода октомври-януари). ПГВ 1 тип не е доказан през периода февруари-септември (с изключение на един случай през март). ПГВ2 тип не е доказан през същия период на годината (с изключение на един случай през април и един случай през юли). ПГВ 3 тип е циркулирал през по-продължителен период от време – почти цялогодишно с изключение на летните месеци юли, август и септември. ПГВ-4 тип е доказан през месеците януари (2 случая) и юни (2 случая).

Бокавирусите имат сходна тенденция в разпространението си с риновирусите и аденовирусите. Доказвани са през всички месеци на годината с най-голям брой положителни проби през късна есен (ноември) и начало на зимата (декември-януари). През пролетните месеци (март-май) се наблюдава лек подем в разпространението им. През периода юни-септември са доказвани единични случаи на бокавирусни инфекции.



Фигура 4. Разпределение по месеци на доказаните респираторни вируси в България през периода на проучването (октомври 2016 г. – септември 2019 г)

Най-голям брой ЧМПВ са доказани през април 2018 г. (9), следвани от февруари-март 2017 г. и февруари 2019 г. (8). Най-голям месечен брой доказани парагрипни вируси 1 тип има през ноември 2017 г. (7), а 3 тип - през декември 2016 г. (7). Разпространението на бокавирусите достига пик през ноември 2017 г. (22 доказани вируса) и този пик съвпада с пика в разпространението на риновирусите (22).

#### **4. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ВЪЗРАСТ НА ПАЦИЕНТИТЕ С ДОКАЗАНИ ВИРУСНИ РЕСПИРАТОРНИ ИНФЕКЦИИ**

Анализирано е участието на отделните респираторни вируси в развитието на ОРЗ при пациенти от различни възрастови групи. Изследваните пациенти са категоризирани в 4 възрастови групи: 0-4 год., 5-17 год., 18-64 год. и  $\geq 65$  год. Обособени са групите на най-малките (0-4 год.) и най-възрастните ( $\geq 65$  год.) пациенти, при които са възможни по-тежко протичащи вирусни респираторни инфекции и усложнения.

Най-голям процент вирусни респираторни инфекции е доказан при най-малките деца (0-4 год.), което кореспондира с регистрираната най-висока заболяемост в тази възрастова група. Втора по инфектираност е групата деца и юноши на възраст 5-17 год., трети са индивидите  $\geq 65$  год. Въпреки че при лицата от най-голямата възрастова група се регистрира най-ниска заболяемост, тежестта на респираторните инфекции е значителна, което често води до прием в болнично заведение. Близко 91% от изследваните пациенти в тази възрастова група са хоспитализирани. Най-ниска степен на позитивност се установява в лицата на възраст 18-64 год. (таблица 4).

Във всички възрастови групи процентът на пациентите с доказан поне един респираторен вирус е по-висок при хоспитализираните пациенти в сравнение с амбулаторно лекуваните. Различията са статистически значими за възрастовата група 0-4 год. ( $p=0.0053$ ).

Таблица 4. Инфектирани с респираторни вируси и негативни пациенти по възрастови групи

Възрастови групи	Брой изследвани пациенти	Брой (%) пациенти с доказан поне един респираторен вирус	Брой (%) пациенти без доказан респираторни вируси
0-4 год.	1332	983 (73.8%)	349 (26.2%)
5-17 год.	169	98 (58%)	71 (42%)
18-64 год.	75	22 (29.3%)	53 (70.7%)
$\geq 65$ год.	265	126 (47.5%)	139 (52.5%)
Общо	1842	1229 (66.7%)	613 (33.3%)

Анализиран е броят на смесените вирусни инфекции при лица от различните възрастови групи. (таблица 5). Най-голям процент (16.7%) смесени инфекции е установен в най-малката възрастова група 0-4 год. При тези деца е намерен и най-голям брой тройни инфекции. При пациентите на възраст 5-17 год. и при тези  $\geq 65$  год. процентът смесени инфекции е почти еднакъв. При лицата на възраст 18-64 год. не е установена нито една вирусна ко-инфекция.

Таблица 5. Брой (%) смесени вирусни инфекции при пациенти от различни възрастови групи

Възрастови групи	Брой доказани вирусни инфекции	Общ брой (%) смесени инфекции	Двойни инфекции	Тройни инфекции
0-4 год.	983	164 (16.7%)	150 (15.2%)	14 (1.4%)
5-17 год.	98	10 (10.2%)	10 (10.2%)	-
18-64 год.	22	-	-	-
$\geq 65$ год.	126	13 (10.3%)	12 (9.5%)	1 (0.7%)
Общо	1229	187 (15.2%)	171 (13.9%)	15 (2.0%)

Анализиран е броят на доказаните респираторни вируси при пациенти от различни възрастови групи. При децата на възраст 0-4 год. се наблюдава широк етиологичен спектър, като са доказани всички изследвани респираторни вируси. При пациентите на възраст 18-64 год. е установено по-малко разнообразие от респираторни вируси. Човешкият метапневмовирус се доказва сравнително по-често при най-малките деца (0-4 год.) в сравнение с по-големите индивиди. Около 82% (81.9%) от всички доказани инфекции с ЧМПВ са деца на възраст 0-4 год. В останалите възрастови групи този вирус има неголяма честота на разпространение, най-малка при лицата на възраст 18-64 год. Близкият с него в структурно и клинично отношение РСВ се доказва също с най-голяма честота в най-малката възрастова група (0-4 год.), следвана от групата деца на възраст 5-17 год. и възрастните  $\geq 65$  год. При пациентите на възраст 18-64 год. РСВ и ЧМПВ са доказани рядко (по 2 случая). Парагрипните вируси 1 и 3 тип също са идентифицирани с по-висока честота при най-малките деца (0-4 год.). Подобно на парагрипен вирус 2 тип те се доказват само в единични случаи в останалите възрастови групи. Парагрипен вирус 4 тип е доказан само при деца на възраст 0-4 год. От всички парагрипни инфекции (77 броя), 70 (90.9%) са доказани при деца 0-4 год. Бокавирусите са идентифицирани основно при деца под 5 год. Близко 94% (93.9%) от всички

доказани бокавирусни инфекции са деца <5 год. В останалите възрастови групи тези вируси се доказват рядко. Риновирусите и аденовирусите са най-силно разпространени при деца 0-4 год и при деца и юноши на възраст 5-17 год. Грипните вируси тип А в отличие от изброените до тук вируси на ОРЗ се доказват със сходна честота във всички възрастови групи, повече при най-възрастните  $\geq 65$  год.

Сравнен броят на доказаните респираторни вируси при пациенти <5 год. и тези  $\geq 5$  год. (таблица 6). РСВ, ЧМПВ, парагрипните вируси, риновирусите, аденовирусите и бокавирусите се срещат по-често при най-малките деца (0-4 год.) в сравнение с по-големите пациенти и тези различия са статистически значими ( $p < 0.05$ ).

Таблица 6. Сравнение на броя на доказаните респираторни вируси при пациенти на възраст 0-4 год. и тези  $\geq 5$  год.

Доказани респираторни вируси	Пациенти <5 год. (n=1332)	Пациенти $\geq 5$ год. (n=510)	p
A(H1N1)pdm09	140 (10.5%)	65 (12.7%)	0.1854
A(H3N2)	130 (9.8%)	64 (12.5%)	0.0898
Тип В	48 (3.6%)	12 (2.4%)	0.1898
RSV	335 (25.2%)	40 (7.8%)	<b>0.0001</b>
HMPV	68 (5.1%)	15 (2.9%)	<b>0.0450</b>
PIV 1/2/3/4	70 (5.3%)	7 (1.3%)	<b>0.0001</b>
RV	153 (11.5%)	29 (5.7%)	<b>0.0001</b>
AdV	99 (7.4%)	25 (4.9%)	<b>0.0368</b>
BoV	92 (6.9%)	6 (1.2%)	<b>0.0001</b>
CoV (общо)	26 (1.9%)	6 (1.2%)	0.2453

Човешкият метапневмовирус, парагрипните вируси (общо) и бокавирусите представляват 5.8%, 6% и 7.9% от всички доказани респираторни вируси при пациенти на възраст 0-4 год. При деца и юноши на възраст 5-17 год. делът на тези вируси в етиологичната структура на ОРЗ е 4.6%, 2.8% и 4.6%, съответно. При възрастните  $\geq 65$  год. указаните пропорции са 5.8%, 2.9% и 0.7%, съответно. ЧМПВ има еднакъв най-голям дял (5.8%) в етиологичната структура на ОРЗ при лица от крайните възрастови групи. Делът на парагрипните вируси и бокавирусите е най-голям в най-малката възрастова група и намалява при по-големите индивиди. В най-възрастните пациенти бокавирусите се доказват много рядко.

Най-голям дял в етиологичната структура на ОРЗ при деца на възраст 0-4 год. има РСВ (28.8%), следван от риновирусите (13.1%) и грипните вируси А(Н1N1)pdm09 (12%) и А(Н3N2) (11,2%). При децата и юношите на възраст 5-17 год. водещ етиологичен агент на ОРЗ са риновирусите с дял от 20.4%, следвани от грипен вирус А(Н1N1)pdm09 и РСВ с равен дял от 16.7%. При възрастните  $\geq 65$  год. основно участие във възникването на ОРЗ имат грипните вируси и А(Н3N2) (34.5%) и А(Н1N1)pdm09 (28.1%), а на трето място е РСВ (14.4%)

Анализиран е броят на доказаните респираторни вируси при пациенти от различни възрастови групи в зависимост от това дали са амбулаторно лекувани или хоспитализирани. ЧМПВ се доказва със сходна честота при двете групи пациенти на възраст 0-4 год. ( $p=0.8479$ ) и на възраст 5-17 год. ( $p=0.5397$ ). При възрастни  $\geq 65$  год. ЧМПВ е идентифициран само в хоспитализирани пациенти. Близкият с него в клинично отношение РСВ се доказва със значително по-голяма честота при хоспитализирани деца на възраст 0-4 год. в сравнение с амбулаторно лекуваните на същата възраст ( $p=0.0001$ ). При пациенти на възраст 5-17 год. и тези  $\geq 65$  год. разликите в честотата на РСВ инфекциите при амбулаторно лекувани и хоспитализирани пациенти не са статистически значими ( $p=1$  и  $p=0.4158$ , съответно). Противоположна тенденция се наблюдава при грипен вирус А(Н3N2) - във възрастовата група 0-4 год. той се доказва значително по-често при лекувани от личните педиатри деца в сравнение с тези, лекувани в болници ( $p=0.0105$ ). Парагрипните вируси се доказват със сходна честота при амбулаторни и хоспитализирани деца на възраст 0-4 год. Във възрастовата група 0-4 год. бокавирусите причиняват респираторни заболявания по-често при хоспитализирани деца, докато при по-големите деца и юношите на възраст 5-17 год. те се доказват по-често при амбулаторно лекувани пациенти, но различията не са статистически значими ( $p=0.2427$  и  $p=0.1479$ , съответно). Във възрастовата група  $\geq 65$  год. са доказани само при един пациент, лекуван в болница. При останалите вируси не са открити значителни различия в честотата на доказването им при двете групи пациенти в отделните възрастови групи.

## **5. УЧАСТИЕ НА ПРОУЧВАНИТЕ РЕСПИРАТОРНИ ВИРУСИ В РАЗВИТИЕ НА РАЗЛИЧНИ КЛИНИЧНИ СИНДРОМИ.**

Тропизмът на респираторните вируси към покривния епител на дихателните пътища обуславя основната локализация на патологичните процеси и свързаните с нея клинични синдроми. В процеса на своята репликация респираторните вируси причиняват засягане на горните отдели на дихателната система с проява на остър назофарингит (хрема), фарингит, ларингит и трахеит или засягане на долните отдели – остър бронхит,

бронхиолит, пневмония, обостряне на съществуващите хронични заболявания (астма, ХОББ, муковисцидоза и др.). С по-тежко клинично протичане, изискващо често болнично лечение, се характеризират следните клинични синдроми от страна на дихателните пътища – ларинготрахеит, бронхит, бронхиолит и пневмония. Бронхитът и пневмонията се причиняват в вируси, бактерии и др. патогени, докато бронхиолитът има в около 90% от случаите вирусна етиология. Макар и рядко респираторните вируси могат да засегнат ЦНС (с проява на фебрилни гърчове, менингит, енцефалит, енцефалопатия) или сърцето (миокардит, перикардит).

Високата заболяемост от ОРЗ във възрастовата група 0-4 г. и значителната тежест на ОРЗ в тази възрастова група е причина подробно да се анализира участието на респираторните вируси при често срещани клинични синдроми от страна на дихателната система - ларинготрахеит, бронхиолит и пневмония, обостряне на астма, а също при случаи на засягане на ЦНС. Проучени са общо 113 случая на ларинготрахеит, 346 случая на бронхиолит, 186 случая на пневмония и 43 случая със засягане на ЦНС. В клиничните проби на 79.6%, 82.9%, 67.2% и 58.1% от изследваните пациенти с ларинготрахеит, бронхиолит, пневмония и засягане на ЦНС, съответно са доказани един или повече респираторни вируси. Високите проценти позитивни резултати при случаи на бронхиолит (от 80.6% до 89%) и ларинготрахеит (от 82% до 84%) през всички периоди на проучването потвърждават основно вирусната етиология на тези заболявания. При случаи на пневмония процентът на позитивните резултати е по-нисък (от 60.8% до 76.5%) поради вероятното участие на бактерии и други патогени в етиологията на тези заболявания. Изследвани са също 21 случая с обостряне на астма при деца на възраст 0-4 год. В 16 (76.2%) от тях са доказани респираторни вируси.

Анализирана е честотата на смесените вирусни инфекции при пациенти на възраст 0-4 год., развили ларинготрахеит, бронхиолит, пневмония или засягане на ЦНС (таблица 7).

Таблица 7. Брой (%) смесени вирусни инфекции при пациенти на възраст 0-4 год. с различни клинични диагнози

Клинични синдроми	Брой доказани вирусни инфекции	Общ брой (%) смесени инфекции	Двойни коинфекции	Тройни коинфекции
Ларинготрахеит	90	22 (24.4%)	20 (22.2%)	2 (2%)
Бронхиолит	287	55 (19.2%)	51 (17.8%)	4 (1.4%)



Пневмония	125	21 (16.8%)	17(%)	4(%)
ЦНС инфекция	25	-	-	-

При пациенти с ларинготрахеит, бронхиолит и пневмония процентът на смесените инфекции е по-висок от средния процент (15.2%) на смесени инфекции при всички изследвани пациенти независимо от клиничната диагноза ( $p < 0.05$ ). Най-висок процент смесени инфекции е установен при деца с ларинготрахеит, следвани от тези с бронхиолит. При пациенти със засягане на ЦНС не са намерени смесени вирусни инфекции.

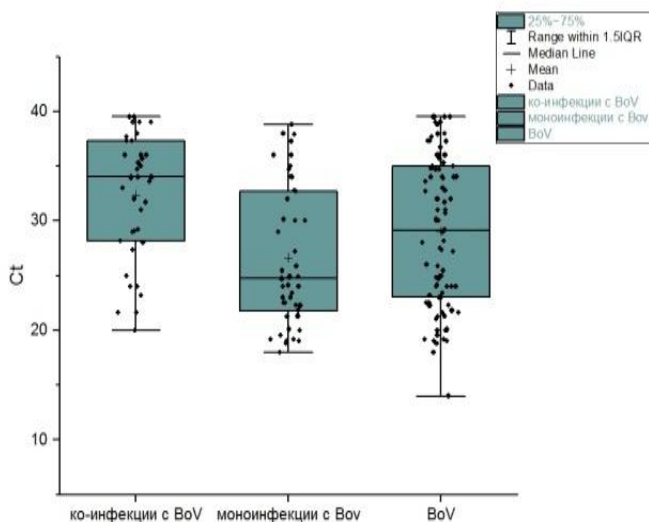
Анализирано е участието на проучваните респираторни вируси при пациенти на възраст 0-4 год. с указаните 4 клинични синдрома. Човешкият метапневмовирус се доказва в 4.4%, 8.1% и 4.8% от случаите на ларинготрахеит, бронхиолит и пневмония, съответно при деца на възраст под 5 год. Не е доказан при пациенти със засягане на ЦНС. Най-често той присъства при пациенти с бронхиолит ( $p < 0.05$ ). От всички 68 деца на възраст 0-4 год. с доказана инфекция с ЧМПВ, 28 (41.2%) са с диагноза бронхиолит, 9 (13.2%) - с пневмония и 5 (7.4%) - с ларинготрахеит. Общо 42 (61.8%) от инфектираните с ЧМПВ деца от най-малката възрастова група са със сериозни заболявания на дихателната система.

Парагрипен вирус 1 тип се доказва най-често при деца с ларинготрахеит ( $p < 0.05$ ) и в единични случаи на бронхиолит, пневмония и засягане на ЦНС. Парагрипен вирус 3 тип е намиран най-често при деца с бронхиолит ( $p < 0.05$ ) и в единични случаи на ларинготрахеит, пневмония и засягане на ЦНС. От всички 17 деца с доказана инфекция с ПГВ 1 тип и 39 деца с доказана инфекция с ПГВ 3 тип, 6 (35.3%) и 12 (30.8%) са деца с ларинготрахеит и бронхиолит, съответно. Парагрипен вирус 2 тип е рядко доказван при деца с ларинготрахеит и бронхиолит, а парагрипен вирус 4 тип не присъства в нито един случай с указаните клинични синдроми.

Бокавирусите имат най-голяма честота на доказване при пациенти с ларинготрахеит (16.8%), следвани от тези с бронхиолит (11.2%) и пневмония (4.8%). Не са намерени при деца със засягане на ЦНС. От всички 92 деца на възраст под 5 год. с доказана бокавирусна инфекция, 38 (41.3%), 19 (20.7%) и 9 (9.8%) са деца с бронхиолит, ларинготрахеит и пневмония, съответно. Следователно този вирус е доказван със значителна честота при пациенти със сериозни заболявания на дихателната система.

Поради честото участие на бокавирусите в смесени инфекции и доказването им със значителна честота при асимптомни пациенти, редица автори в други страни задават въпроса дали те са истински патогени или са само придружители на истинските причинители на респираторните

заболявания. С цел проучване истинското участие на бокавирусите в указаните 4 клинични синдрома се абстрахирахме от случаите на ко-инфекции и анализирахме участието на бокавирусите само като моноинфекции. При това всички проби с доказани бокавируси са изследвани за коронавируси с цел да се избегнат смесени инфекции между бокавируси и коронавируси. Сравнен е средният  $C_t$  като показател за вирусен товар при случаи на моноинфекции и ко-инфекции с бокавируси. Средният  $C_t$  при всички доказани бокавирусни моноинфекции е 26.8 (медиана 24.7), докато в случаите на ко-инфекции е 35.7 (медиана 34). Прилагането на Mann-Whitney U тест показва значителна разлика в  $C_t$  между случаите на моноинфекции и ко-инфекции ( $p = .0056$ , т.е.  $p < .05$ ). Фигура № 5 дава нагледна представа за това, че в повечето случаи на моноинфекции се установява по-малък  $C_t$ , следователно по-висок вирусен товар, в сравнение със случаите на ко-инфекции.



Фигура 5. Разпределение на  $C_t$  при случаи на ко-инфекции с бокавируси, моноинфекции и при всички случаи с доказани бокавируси. Стойностите на  $C_t$  са представени с точки. Показани са средните стойности на  $C_t$ , медианата на  $C_t$  и диапазона от 25-75% в разпределението на  $C_t$ . Стойностите са изчислени с използване на Mann-Whitney U тест.

В таблица 8 е показан броят на пациентите на възраст 0-4 год. с различни клинични диагнози, при които са установени моноинфекции и ко-инфекции с участието на бокавируси, както и средният  $C_t$  в отделните случаи. В разгледаните три клинични синдрома средният  $C_t$  в случаи на моноинфекции е значително по-малък в сравнение със средния  $C_t$  в случаи на коинфекции.

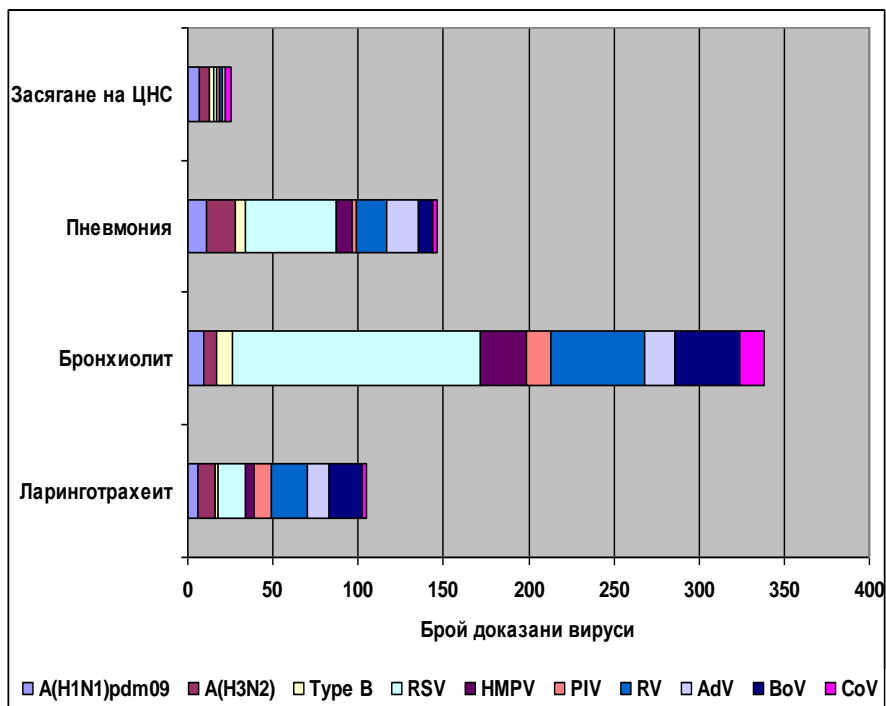
Таблица 8. Брой бокавирусни инфекции, в т.ч. смесени и моноинфекции при пациенти на възраст 0-4 год. с различни клинични диагнози

Клинични синдроми	Общ брой бокавирусни инфекции	Брой смесени бокавирусни инфекции	Средно $C_t$ при смесени бокавирусни инфекции	Брой (%) бокавирусни моноинфекции	Средно $C_t$ при бокавирусни моноинфекции
Ларинго-трахеит	19	8	32.0	11 (57.9%)	27.6
Бронхиолит	38	18	32.0	20 (47.4%)	23.8
Пневмония	9	7	37.8	2	30.6
Засягане на ЦНС	-	-	-	-	-

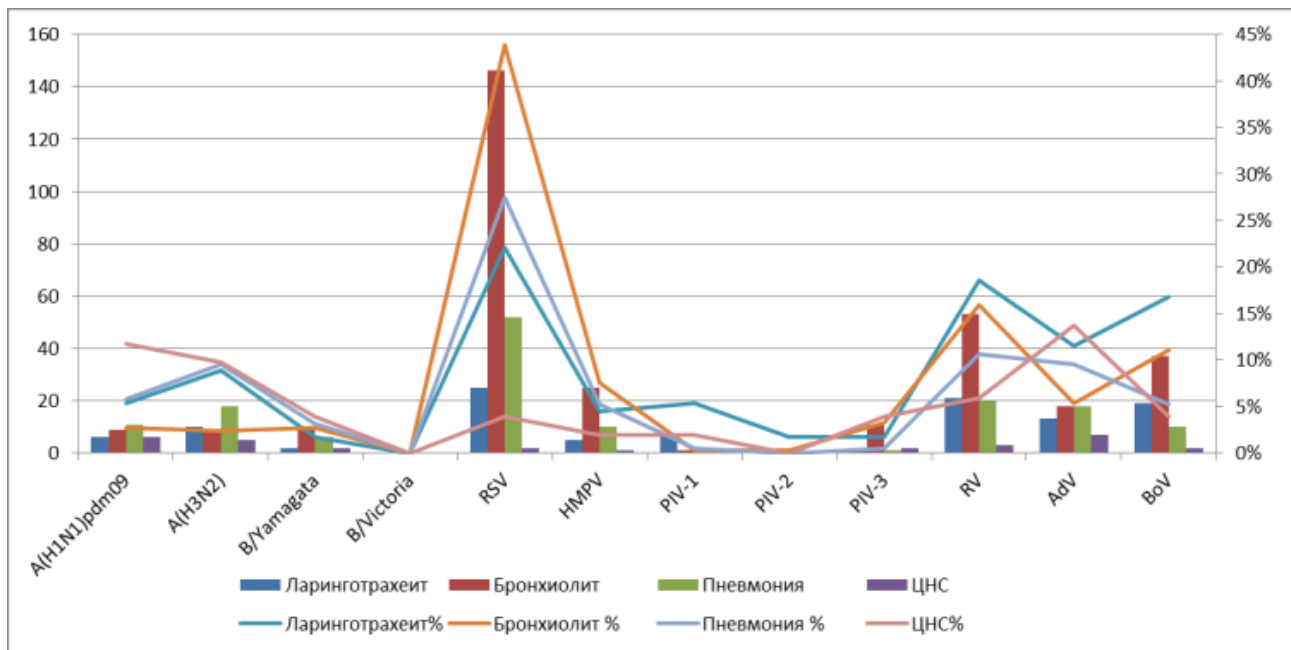
Участието на бокавируси като причинители на моноинфекции в указания брой случаи на заболявания потвърждава тяхната роля като истински респираторни патогени. Real Time PCR е полу-количествен метод. Установяването на по-нисък  $C_t$  при случаи на моноинфекции в сравнение със случаите на ко-инфекции показва наличието на по-висок вирусен товар, т.е. активна вирусна репликация. При пациенти с моноинфекция и ниска стойност на  $C_t$  може да се твърди, че бокавирусите са причинител на настоящето заболяването.

Останалите респираторни вируси също имат различно участие в развитие на 4-те проучени клинични синдрома при деца на възраст 0-4 год. Грипните вируси общо са доказани в 18 (15.9%) деца с ларинготрахеит, 26 (7.5%) деца с бронхиолит, 34 (18.3%) деца с пневмония и 15 (34.9%) деца с невроинфекция.

РСВ се доказва с най-голяма честота при деца с бронхиолит – 146 случая (42.2%), следвани от тези с пневмония – 53 случая (28.5%). Риновирусите имат по-често присъствие при деца с ларинготрахеит – 21 случая (18.6%), следвани от тези с бронхиолит – 57 случая (16.5%) и пневмония – 18 случая (9.7%). Противно на преобладаващото мнение, че предизвикват леко протичащи заболявания на горните дихателни пътища, в нашето проучване те са доказани в значителен процент от случаите със засягане на долния респираторен тракт. Честота на доказване на аденовируси е най-голяма при случаи на ларинготрахеит – 13 случая (11.5%), следвани от тези на пневмония - 18 случая (9.7%), бронхиолит – 18 случая (5.2%) и засягане на ЦНС – 2 случая (4.7%). Коронавирусите общо присъстват в най-голям процент при деца с бронхиолит – 14 случая (15.4%).



Фигура 6. Брой доказани респираторни вируси при пациенти на възраст 0-4 год. с ларинготрахеит, бронхиолит, пневмония и засягане на ЦНС



Фигура 7. Брой (%) доказани респираторни вируси при пациенти на възраст  $\geq 5$  год с различни клинични диагнози

От фигури № 6 и №7 се вижда, че различни респираторни вируси причиняват ларинготрахеит без изявено доминиране на някои от тях. При случаи на бронхиолит водеща роля има РСВ, следван от риновируси и бокавируси. РСВ доминира също като причинител на пневмония. Той е доказан при 2 годишно дете с плевропневмония и остър респираторен дистрес синдром (ОРДС). При починало дете на 3 год. с пневмония и ОРДС е доказан грипен вирус А(Н1N1)pdm09. В малкото изследвани случаи със засягане на ЦНС по-често са доказвани грипни вируси и аденовируси. Грипни вируси са идентифицирани при две починали деца с енцефалит на възраст 1 г. и 4 г. Бокавируси не са доказани при пациенти с инфекции на ЦНС.

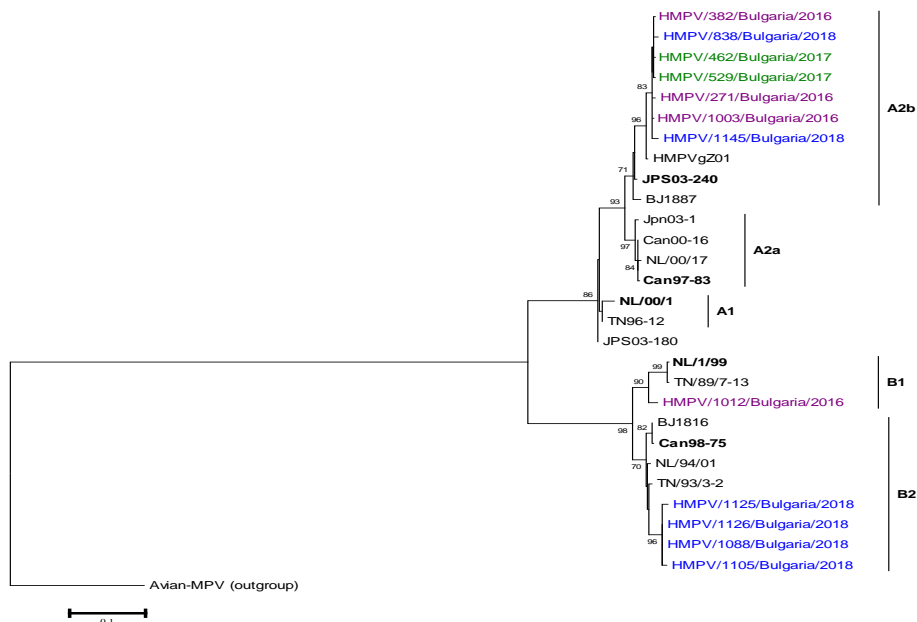
При деца и юноши на възраст 5-17 год., както и при възрастни на 18-64 год. и  $\geq 65$  год. е анализирано участието на отделните респираторни вируси при случаи на ларинготрахеит (регистрирани са само във възрастовата група 5-17 год.), засягане на долния респираторен тракт (пневмония, обостряне на ХОББ, хроничен бронхит и астма) и засягане на ЦНС. Към случаите със засягане на долния респираторен тракт се отнасят 78 случая на пневмония, 4 случая на ХОББ, 1 случай на обостряне на хроничен бронхит и 7 случая на обостряне на астма. РСВ има по-значителна роля в развитието на ларинготрахеит при деца и юноши на възраст 5-17 год., докато грипните вируси А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) са най-чести причинители на заболявания със засягане на долния респираторен тракт (24.7% общо) и ЦНС (27% общо) при пациенти на възраст над 5 год. Изследвани са 5 починали пациента с пневмония на възраст  $\geq 65$  год. При единия е доказан грипен вирус А(Н1N1)pdm09, а при другия грипен вирус А(Н3N2). Значително по-малко е участието в тези клинични синдроми на РСВ, ЧМППВ, риновируси, аденовируси и бокавируси ( $p < 0.05$ ). Бокавируси са доказани само в два случая на пневмония, а парагрипните вируси 1 и 3 тип, както и коронавирусите - в единични случаи на пневмония и инфекция на ЦНС. Идентифицирането на респираторен вирус в носогърлени секрети на пациенти с невроинфекции не указва категорично етиологичната му роля, тъй като може да се касае за съпътстваща инфекция на дихателните пътища без участие в патологията на ЦНС. Категорично доказателство за участие в етиологията на невроинфекцията може да се получи с изследване на ликворна проба, но и 6-те изследвани ликвори са отрицателни за присъствие на респираторен вирус. При случаи на миокардит/перикардит етиологичната роля на определен патоген се доказва дефинитивно чрез изследване на ендомиокардна биопсия или перикардна течност. В изследваните чрез Real Time RT-PCR 2 перикардни пунктата и една ЕМБ не са доказани респираторни вируси.

## **6. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ГЕНОТИПОВЕТЕ НМРV НА БАЗАТА НА F ГЕНА.**

През периода на проучването (октомври 2016-септември 2019 г.) са тествани чрез Real Time RT-PCR 1842 пациента с ОРЗ и са доказани общо 83 ЧМПВ. От всички позитивни проби са подбрани 41 проби с по-висока концентрация на вируса ( $Ct \leq 30$ ). Подбрани са и 7 положителни проби от сезон 2016/2017 г. Изследвани са общо 11 проби от 2016 г., 20 от 2017 г. и 17 от 2018 г. Това са проби на деца с ларинготрахеит, бронхиолит, пневмония, астма или остра инфекция на горните дихателни пътища. Всички са подложени на амплификация с помощта на праймери, изхождащи от F гена: НМРV-F-F (ATGTCTTGGAAAGTGGTG съответстващ на нуклеотидни позиции 3052-3069) и НМРV-F-R (CCATGTAААТТАСGGAGCT, съответстващ на нуклеотидни позиции 3844-3862 от генома на прототипния щам NL/1/00). Амплифициран е участък с дължина приблизително 670 nt в рамките на F ORF, кореспондиращ на nt 3052-3862 от генома на НМРV, щам NL/1/00. За секвениране са подбрани 12 PCR продукта, показали изразен банд при електрофореза. Секвенирането е извършено от фирма Macrogen в Амстердам, Холандия. Получените секвенции от гена F са депозириани в GenBank с идентификационни номера: (MK577689; MK577690; MK577691; MK577692; MK577693; MK577694; MK577695; MK577696; MK577697; MK577698; MK577699).

За целите на филогенетичния анализ са подбрани от BLAST 17 секвенции на F гена на референтни щамове ЧМПВ с известна принадлежност към съществуващите геногрупи/субгрупи. Щамовете от Холандия - NL/1/00 (AF371337) и NL/1/99 (AY304361), Канада - CAN97-83 (AY297749) и CAN98-75 (AY297748.1) и Япония JPS03-240 (AY530095) са използвани като прототипни за двете геногрупи (A и B) и за субгрупите (A1, A2a и A2b; B1 и B2). Филогенетичният анализ показва циркулация в България на ЧМПВ от двете големи геногрупи (A и B), като 7 (58%) анализирани секвенции принадлежат към геногрупа A, а 5 (42%) – към геногрупа B (фигура 8). Седемте български секвенции от геногрупа A са категоризирани в субгрупа A2b. Не са открити представители на субгрупи A1 и A2a. Петте секвенции от геногрупа B принадлежат към различни субгрупи: едната секвенция се отнася към субгрупа B1, а другите четири - към субгрупа B2. Българските щамове от геногрупа A2b показват най-висока степен на нуклеотидно сходство (99.83 - 100%) с щамове от САЩ, доказани през 2016 и 2017 г. (MK167039.1; KY474532.1 и др.) и Япония, доказани през 2015 и 2017 г. (LC337763.1; LC337772.1 и др.). Българският НМРV от геногрупа B1 е сходен в най-висока степен (99.04-98.22%) с щамове, доказани в Япония през 2017 г. (LC337716.1,

LC337719.1, LC337718.1, LC337714.1 и др.), а българските представители на геногрупа B2 са генетично най-близки (99.33%) с щамове, доказани в Япония през 2016 г. (LC337744.1; LC337739.1; LC337737.1; LC337736.1 и др.).



Фигура 8. Филогенетично дърво, построено на базата на гена F на ЧМПВ. Използван е модел Tamura-3 с гама разпределение (T92+G). Секвенциите на референтните щамове, представители на известните геногрупи, са получени от GenBank със съответните идентификационни номера. Дървото е укоренено със секвенцията на птичия метапневмовирус, служещ като извънгрупов. Прототипните щамове за отделните геногрупи/субгрупи са представени в удебелен шрифт. Българските секвенции, доказани през 2016, 2017 и 2018 г. са оцветени в лилав, зелен и син цвят, съответно.

### Молекулярна епидемиология на HMPV на базата на F гена

Проследена е циркулацията на геногрупите на ЧМПВ в България по време на три епидемични сезона на базата на секвениране на фрагмент от F гена и извършване на филогенетичен анализ на секвенции от 12 положителни за ЧМПВ клинични проби. Секвенирани и анализирани са 4 проби от 2016 г., 2 проби от 2017 г. и 6 проби от 2018 г. (Фигура 8). Представители на двете големи геногрупи ЧМПВ (A и B) циркулират в България през целия изследван период. През 2016 г. в България ко-циркулират ЧМПВ, представители на



субгрупите A2b (75%, 3/4) и B1 (25%, 1/4). В следващата 2017 г. ЧМПВ от субгрупа A2b продължават да циркулират и са единствените доказани ЧМПВ. През 2018 г. отново са доказани представители на субгрупа A2b, съставляващи 33% (2/6) от всички доказани ЧМПВ. През този последен изследван период се появяват ЧМПВ, представители на субгрупа B2, и те съставляват 67% (4/6) от всички доказани през годината ЧМПВ.

### • **Аминокиселинен анализ на F протеина на българските ЧМПВ**

С помощта на програмата BioEdit е анализиран фрагмент на F протеина на 12 български ЧМПВ с дължина 223 аминокиселини (а.к. позиции 51-274 в F протеина на прототипния щам 00/1). Имайки предвид, че целият F протеин съдържа средно 539 а.к., нашите секвенции включват 41% от целия протеин. Българските аминокиселинни секвенции са сравнени с тези на прототипния ЧМПВ щам 00/1 (AF371337), доказан от van Hogen в Холандия през 2001 г. В анализа са включени също секвенции на целия F протеин от ЧМПВ, представители на различните геногрупи/субгрупи, доказани в други страни / континенти в различни периоди от време. Включени са секвенции от Европейски страни – Хърватия и Германия. В рамките на изследвания фрагмент на F протеина в българските секвенции от геногрупа A, както и в другите анализирани секвенции от същата геногрупа, са открити аминокиселинни замени в три позиции: R82K, A185D и F258I (цифрата означава позицията в протеина F, в която има аминокиселинна замяна; буквите отговарят на еднобуквените кодове на 20-те незаменими аминокиселини; буквата отляво на цифрата означава аминокиселината, която се заменя, а буквата отдясно означава аминокиселината, с която се заменя първата). Първата замяна R82K се намира в субединица F2, а другите две замени – в субединица F1. В останалите секвенции от геногрупа A, покриващи целия F протеин, са открити допълнителни замени в 6 позиции K143T, G294E, V449I, S466N, T504S и N539S.

В рамките на геногрупа B се установяват повече аминокиселинни замени. В българските секвенции от субгрупа B2, както и в другите анализирани секвенции от същата субгрупа, са открити 9 аминокиселинни замени: A61T и R82K (в субединица F2); V122I (във фузионния пептид), T135N, N139G, K143T и D167E (в HRA), R175S, T223N, N233Y и F258I (в субединица F1). В останалите секвенции от субгрупа B2, покриващи целия F протеин, са открити допълнителни замени в 20 позиции A280N, V286I, G294E, K296N/D, Q312K, K348R, N404, V449I, K450R, R479K, S482N, I498V, S503L, L507S, V510I, F511I, K518R, S528N, N533G и N539S. Единствената българска секвенция от субгрупа B1 има някои допълнителни замени в сравнение със секвенциите от

субгрупа B2: N57T (в субединица F2), A125P (във фузионния пептид) и K179R (в субединица F1). Първата замяна (N57T) води до загуба на N-гликозилационен участък (NLT). В тази секвенция липсва замяната T223N, открита в щамовете от субгрупа B2. В българските секвенции не са открити замени в антигенните участъци (епитопи) 2 (а.к. 132 и 152), 3 (а.к. 177-179), 4 (а.к. 238-245) и 5-6 (а.к. 386-397) с изключение на замяната K179R в антигенен участък 3 на секвенцията от субгрупа B1. Установени са групово-специфични замени в позиции 122, 135, 139, 167, 175, 185, 233, 286, 296, 312, 348, 404, 479, 482, 503, 504, 507, 511, 518, 528 и 533, които диференцират група А от група В. Открити са замени, характерни за субгрупа A1 (а.к. 61, 82, 143), A2 (а.к. 61, 143, 185), B1 (а.к. 46, 143, 179) и B2 (а.к. 143). Участъкът на разцепване (позиции 102-103) е консервиран при всички изследвани секвенции.

Всички анализирани секвенции, включително българските, имат два потенциални участъка на N-гликозилиране в позиции 57 (NLT) и 171 (NLT). В останалите участъци на F протеина, невключени в българските секвенции, се открива още един потенциален N-гликозилационен участък - в позиция 353 (NIS).

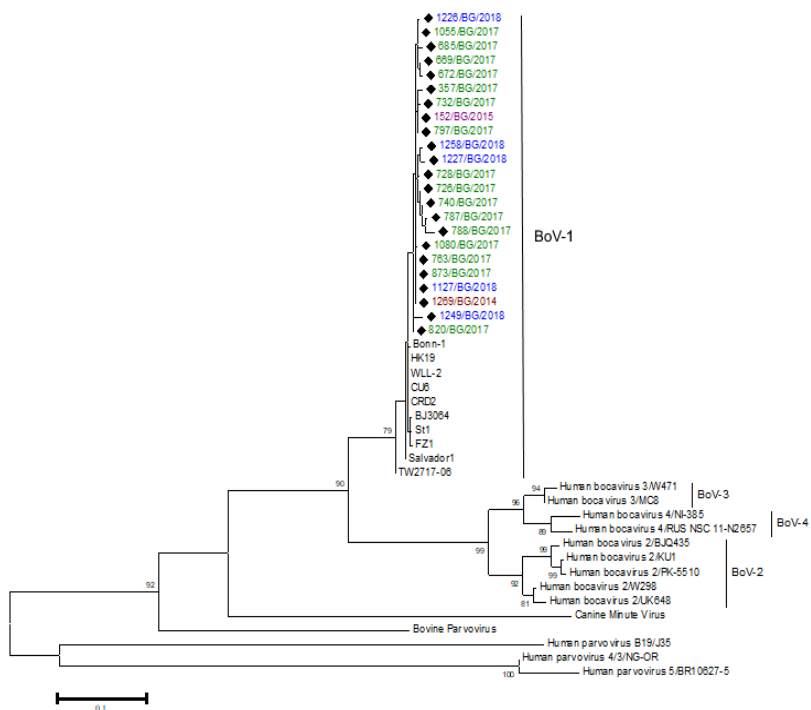
## **7. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ И РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА VoV НА БАЗАТА НА VP1/VP2 ГЕНА**

През периода октомври 2016 - септември 2019 г. са тествани чрез Real Time RT-PCR 1842 пациенти с ОРЗ и са доказани общо 98 VoV. От всички позитивни проби, изследвани през проучвания период, са подбрани 53 проби с по-висока концентрация на бокавирусите ( $Ct \leq 30$ ). Подбрани са и една проба от 2014 г. и 2 проби от 2015 г. Селектираните проби са подложени на амплификация с помощта на праймери, изхождащи от участък на VP1/VP2 гена - nt позиции 3233-3808 от генома на референтния щам PK-5510 с дължина 5196 bp и идентификационен номер FJ170278 в Genbank. Амплифициран е участък с дължина приблизително 576 nt в рамките на VP1 ORF, кореспондиращ на nt 1960-2630 от генома на щам PK-5510. На секвениране са подложени 44 PCR продукта, показали изразен банд при електрофореза. Секвенирането е извършено в Отдел Вирусология на НЦЗПБ и от фирма Macrogen в Амстердам, Холандия.

Извършен е филогенетичен анализ, включващ 1 проба от 2014 г., 1 проба от 2015 г., 14 проби от 2017 г. и 7 проби от 2018 г. Това са проби на деца с ларинготрахеит, бронхиолит, пневмония, астма или остра инфекция на горните дихателни пътища. 91.3% от пробите са на деца от София. Останалите две проби са от Русе и Габрово.

За целите на филогенетичния анализ са подбрани от BLAST 19 целогеномни секвенции на референтни щамове бокавируси с известна

принадлежност към съществуващите генотипове BoV-1 (10 секвенции), BoV-2 (5 секвенции), BoV-3 (2 секвенции) и BoV-4 (2 секвенции). Включени са също целогеномни секвенции на говеждия парвовирус и кучешкия парвовирус. Като извънгрупови са включени целогеномни секвенции на човешките парвовируси 4 и 5 и парвовирус В19. Общо във филогенетичния анализ участват 47 секвенции. Анализът показва, че всички 23 изследвани български секвенции, получени от респираторни проби, принадлежат към генотип BoV-1 и се групират тясно с 10-те референтни секвенции от генотип BoV-1. Не са открити представители на генотипове BoV-2, BoV-3 и BoV-4. Българските щамове BoV-1 показват най-висока степен на нуклеотидно сходство (99.83 - 100%) с щамове от САЩ, доказани през 2016 и 2017 г. (МК167039.1; КУ474532.1 и др.) и Япония, доказани през 2015 и 2017 г. (LC337763.1; LC337772.1 и др.).



Фигура 9. Филогенетично дърво, построено на базата на фрагмент от гена VP1/VP2 на BoV и други парвовируси. Генетичните дистанции са измерени с модела Tamura-3 с гама разпределение (T92+G). Филогенетичното дърво е построено с алгоритъм Maximum likelihood (ML) с помощта на MEGA software (version 6.0). Секвенциите на

референтните щамове, представители на известните генотипове, са получени от GenBank със съответните идентификационни номера. Българските секвенции, доказани през 2014, 2015, 2016, 2017 и 2018 г. са оцветени в червен, лилав, зелен и син цвят, съответно.

- **Молекулярна епидемиология на VoV на базата на частичен VP1/VP2 ген**

Проследена е циркулацията на генотиповете VoV в България, доказани при деца с ОРЗ по време на три епидемични сезона 2016/2017, 2017/2018 и 2018/2019 г., както и през летните месеци на 2017 г. чрез секвениране на фрагмент от VP1/VP2 гена и извършване на филогенетичен анализ на секвенции от положителни за VoV клинични проби. Секвенирани и анализирани са 1 проба от сезон 2016/2017 г., 3 проби от лятото на 2017 г., 13 проби от сезон 2017/2018 г. и 4 проби от сезон 2018/2019 г. За сравнение са включени и 2 проби от сезон 2014/2015 г. През целия изследван период са доказани само VoV-1 тип, които се групират близко помежду си. Бокавирусите от 2014 и 2015 г. са близкородствени с тези от 2017 г. и 2018 г.

- **Аминокиселинен анализ на VP1/VP2 протеина на българските VoV-1**

С помощта на програмата BioEdit е анализиран фрагмент на протеина VP1/VP2 на 23 български вируси VoV-1 с дължина 179 аминокиселини (а.к. позиции 91-270 в VP1/VP2 протеина на прототипния щам St1 с идентификационен номер DQ000495 в GenBank). Имайки предвид, че протеинът VP1 на щама St1 съдържа 671 а.к., българските секвенции включват 26.7% от този протеин. Анализираните български секвенции са сравнени с тези на щама St1 – първия бокавирус, доказан от Allander и кол. в респираторна проба в Швеция през 2005 г. В анализа са включени също референтни целогеномни секвенции на вируси VoV-1, доказани в други страни / континенти в различни периоди от време. Включени са секвенции от Европейски страни – Швеция и Германия. В рамките на изследвания фрагмент на VP1/VP2 протеина в българските секвенции от генотип VoV-1, както и в другите анализирани секвенции от същия генотип, е открита аминокиселинна замяна A149T. Тази замяна се намира в рамките на N-гликозилационен участък и води до промяната на секвона NAS в NTS. В сравнение с прототипния щам St1 всички анализирани български секвенции съдържат допълнителна замяна R251K, 11 секвенции (47.8%) съдържат още една замяна - D180N, а 8 (34.8%) секвенции съдържат също замяната A92V. Установени са единични замени в 10 (43.5%) секвенции в областта на уникалния (VP1u) участък, съответстващ на първите 129 а.к. от N-края на протеина VP1. Уникалният VP1u участък включва консервиран фосфолипаза A<sub>2</sub> мотив (PLA<sub>2</sub>)(nt 21-63). Общо 4/23

(17.4%) български секвенции съдържат 2 аминокиселинни различия с прототипния щам St1, 8/23 (34.8%) секвенции съдържат 3 различия, 5/23 (21.7%) секвенции – 4 различия и 6/23 (26.1%) – 5 различия в изследвания фрагмент на протеина VP1/VP2. Всички български секвенции съдържат поне една замяна в сравнение с щама St1. В референтните целогеномни секвенции от генотип VoV-1 е открита допълнителна замяна T590S. Идентифицираните в Гърция VoV-1 съдържат 5 аминокиселинни замени в този протеин, различни от българските, а един от щамовете съдържа допълнително още две замени. Изследователи в Италия съобщават за наличие на 1 различие в 7.6% от щамовете VoV-1 в региона VP1/VP2 в сравнение с щама St1, 2 различия в 30.4% и поне 3 различия в останалите 61.9% от щамовете.

Българските аминокиселинни секвенции съдържат един N-гликозилационен участък NTS в позиции 148-150. В референтните целогеномни секвенции са открити още два N-гликозилационни участъка NGT (519-521) и NYT (638-640), а също един O-гликозилационен участък KPR в позиции 552-554 (маркиран в сив цвят).

Въпреки ограничения аминокиселинен полиморфизъм в протеина VP1, нито един от българските VoV-1 не е напълно идентичен с прототипния щам St1. Не са установени времеви, географски различия и различия по отношение на клиничните характеристики в аминокиселинния състав на изследваните български секвенции.

## **V. ИЗВОДИ**

1. Проучена е етиологичната структура на ОРЗ в България през периода октомври 2016 г. – септември 2019 г. чрез изследване на 18 респираторни вируса.
  - 1.1. Човешкият метапневмовирус, парагрипните вируси (общо) и бокавирусите имат средно ниво на разпространение. Предизвиканите от тях инфекции съставляват 6.8%, 6.3% и 8%, съответно от всички доказани случаи на вирусни респираторни инфекции. По-голям дял в етиологичната структура на ОРЗ имат РСВ, грипните вируси А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2), риновирусите и аденовирусите.
  - 1.2. Сред парагрипните вируси ПГВ-3 тип е доказван с най-голяма честота, по-слабо е разпространението на ПГВ-2 и ПГВ-4 тип.
    2. Човешкият метапневмовирус и бокавирусите имат изразена сезонна активност.
      - 2.1. ЧМПВ циркулира успоредно с РСВ и се доказва най-често през зимата и пролетта (януари-април).
    - 2.2. Бокавирусите имат сходна тенденция в разпространението си с риновирусите и аденовирусите – доказват се през цялата година, най-често

- през есента и началото на зимата (ноември-януари) и с малък подем през пролетта.
- 2.3. Парагрипните вируси 3 тип циркулират през цялата година с изключение на летните месеци. Парагрипни вируси 1 и 2 тип имат слабо преобладаване през есента.
  3. Човешкият метапневмовирус, парагрипните вируси и бокавирусите се доказват най-често при деца на възраст 0-4 год.
  - 3.1. ЧМПВ предизвиква заболявания при пациенти от всички възрастови групи.
  - 3.2. Парагрипните вируси и бокавирусите не са доказани при пациенти от средната възрастова група - 18-64 год.
  4. Проучваните човешки метапневмовирус, парагрипни вируси и бокавируси имат различна степен на участие в ко-инфекции: ЧМПВ е рядък партньор в смесени инфекции, докато при бокавирусите се установява висока честота на смесени инфекции. Парагрипните вируси заемат средно място като участници в коинфекции.
  5. Човешкият метапневмовирус и бокавирусите са сравнително чести причинители на бронхиолит и пневмония при деца на възраст 0-4 год. Парагрипните вируси имат по-значително участие като етиологични агенти на ларинготрахеит и бронхиолит.
  6. Филогенетичният анализ на гена F на човешките метапневмовируси показва циркулация в България на вируси от три геногрупи: A2b, B1 и B2.
  - 6.1. Аминокиселинният анализ установи наличието на аминокиселинни замени в различни функционално важни участъци на протеина F сравнение с прототипния щам NL/00/1: 3 замени в секвенциите от субгрупа A2b, 9 – в B2 и 12 - в субгрупа B1. Открити са 2 участъка на N-гликозилиране. Резултатите показват по-висока степен на изменчивост на гена F при ЧМПВ от геногрупа B.
  7. Филогенетичният анализ на гена VP1/VP2 на човешките бокавируси, изолирани от респираторни проби показва, че всички принадлежат към генотип 1 (BoV-1).
  - 7.1. Аминокиселинният анализ установи наличието на 2-5 аминокиселинни замени в протеина VP1/VP2 в сравнение с прототипния щам St1, което говори за ниска степен на изменчивост и еволюционна динамика при бокавирусите.

## VI. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ (НАУЧНИ ПРИНОСИ)

1. Проучено е разпространението в България на човешкия метапневмовирус, парагрипните вируси и бокавирусите, като данните за разпространението на бокавирусите са първи за страната. Анализирани са делът на проучваните инфекции в етиологичната структура на ОРЗ, тяхната сезонност, възрастовото разпределение на инфектираните пациенти, географското и времево разпространение на вирусите-причинители, участието им в развитие на някои важни клинични синдроми, в смесени инфекции.
2. Извършено е генотипиране на парагрипните вируси. Установена е циркулация на 4-те типа парагрипни вируси.
3. Извършен е филогенетичен и аминокиселинен анализ на гена / протеина F на човешките метапневмовируси. Проследена е циркулацията на ЧМПВ от геногрупи A2b, B1 и B2 през годините.
4. Извършен е филогенетичен и аминокиселинен анализ на гена / протеина VP1/VP2 на циркулиращите в страната бокавируси.

## VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Korsun N, Angelova S, **Trifonova I**, Tzotcheva I, Mileva S, Voleva S, Georgieva I, Perenovska P. Predominance of influenza A(H3N2) viruses during the 2016/2017 season in Bulgaria. J Med Microbiol. 2018 Feb; 67(2):228-239 **IF<sub>2018</sub> 2,1; Q2**
2. Korsun N, Angelova S, **Trifonova I**, Georgieva I, Voleva S, Tzotcheva I, Mileva S, Ivanov I, Tcherveniakova T, Perenovska P. Viral pathogens associated with acute lower respiratory tract infections in children younger than 5 years of age in Bulgaria. Braz J Microbiol, 2019 Jan;50(1):117-125. **IF<sub>2018</sub> 2.857; Q3**
3. **Trifonova I.**, Angelova S., Georgieva I., Voleva S., Tzocheva I., Lazova S., Parina S., Perenovska P., Korsun N. Prevalence of respiratory viruses in cases of pediatric acute respiratory tract illnesses in Bulgaria. Annuaire de l'Universite de Sofia St. Kliment Ohridski, 2018, 103:60-69.
4. **Трифоновна И.**, С.Ангелова, И.Георгиева, С.Волева, И.Цочева, С.Лазова, С.Парина, П.Переновска, Н.Корсун. Вирусен спектър на острите респираторни заболявания при малки деца в България. Science and technologies, 2017, 7 (1): 80–87. <http://www.sustz.com/journal/2/1732.pdf>
5. **Trifonova I**, Angelova S, Korsun N. Aetiologic structure of acute respiratory tract infections among children younger than 5 years in Bulgaria. Probl Infect Parasit Dis, 2019, 47, 1, 9-15.

## VIII. УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ И НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Angelova S., **I.Trifonova**, I. Georgieva, I. Tzocheva, S. Lazova, S. Parina, P. Perenovska, N. Korsun. “Etiological spectrum of acute viral respiratory illnesses (ARI) among children aged under five years in Bulgaria”, 35-th Annual Meeting of the ESPID, Madrid, 23- 27 May 2017, 04E. Education: Community acquired infections: Respiratory tract infections ESP17-0585.
2. Angelova S., **Trifonova I.**, Georgieva I., Voleva S., Tzocheva I., Lazova S., Parina S., Perenovska P., Korsun N. Building an effective algorithm for molecular testing of different respiratory viruses posing a threat to children's health, CORDS Conference, Bangkok, Thailand, 29-30 January, 2018
3. **Trifonova I.**, Angelova S., Georgieva I., Tzocheva I., Lazova S., Parina S., Mileva S., Voleva S., Perenovska P., Korsun N. Viral pathogens causing acute lower respiratory tract infections in children under 5 years old in Bulgaria. 36-th Annual Meeting of the ESPID, Malmo, Sweden, 28 May- 02 June 2018.
4. **Trifonova I**, Angelova S, Georgoieva I, Teodosieva A, Korsun N. Influenza virus surveillance in Bulgaria during the eight recent post-pandemic seasons (2010/11 to 2017/18). Poster 28, Influenza 2018. Centenary of the 1918 Pandemic, London, 24-26 June 2018.
5. **Trifonova I.**, Korsun N., Angelova S., Georgieva I. Tzocheva I., Mileva S., Voleva S., Mangarov A., Perenovska P. Viral pathogens associated with acute lower respiratory tract infections in children younger than 5 years of age in Bulgaria. E-poster, 7th Congress of the European Academy of Paediatric Societies (EAPS), Paris, October 30-November 3, 2018.
6. **Trifonova I**, Angelova S, Tzocheva I, Lazova S, Parina P, Mileva S, Voleva S, Perenovska P, Mangarov A, Korsun N. Bocaviruses as respiratory viral pathogens in children under 5 years old in Bulgaria. 37-th Annual Meeting of the ESPID, Ljubljana, Slovenia, May 06 – 11, 2019.
7. **Trifonova I**, Angelova Sv, Tzocheva, Mileva S, Voleva S, Perenovska P, Korsun N. Aetiologic spectrum of acute respiratory tract infections among children younger than 5 years in Bulgaria. 31st European Pediatrics Congress, October 14-15, 2019 Amsterdam, Netherlands (E-постер).
8. Георгиева И, Исмаилова Ч, Ангелова С, Волева С, **Трифонов И**, Минкова А, Курчатова А, Корсун Н. Епидемиологични и вирусологични характеристики на грипен сезон 2016/2017 г. Доклад на XV Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк-хотел Москва, 17-19 май 2017 г. Доклад.
9. **Trifonova I.**, S. Angelova, I.Georgieva, S.Voleva, I.Tzocheva, S.Lazova, S.Parina, P.Perenovska, N. Korsun. “Viral spectrum of acute respiratory



- illnesses among young children in Bulgaria. 28th International Conference 01.06.-02.06.2017, St. Zagora, Bulgaria, pp 30-31 (Book of Abstracts). Poster presentation.
10. **Trifonova I.**, S. Angelova, I. Georgieva, S. Voleva, I. Tzocheva, S. Lazova, S. Parina, P. Perenovska, N. Korsun. Prevalence of respiratory viruses in cases of pediatric acute respiratory tract illnesses in Bulgaria. Young Scientific Conference “Kliment days“, 16-17 November 2017, Sofia, pp.59 (Book of Abstracts). Poster presentation.
  11. Георгиева И., **И.Трифенова**, С.Ангелова, С.Волева, Н.Корсун. Молекулярна диагностика на респираторни вируси с особено значение в педиатрията. Доклад на Втори докторантски симпозиум “ Молекулярната биология-нови хоризонти“, 6-7.04. 2017 г., София, България, стр. 29 (Сборник с резюмета).
  12. **Trifonova I.**, S. Angelova, I. Georgieva, S. Voleva, I. Tzocheva, S. Lazova, S. Parina, P. Perenovska, N. Korsun. “Viral respiratory pathogens detected among children aged under five years with acute respiratory infections during the 2015/2017 and 2016/2017 winter seasons in Bulgaria”, XVI International Congress of Medical Sciences (ICMS), София, 11-14 май, 2017 г., Sofia, Bulgaria, pp 321 (Book of Abstracts). Poster presentation.
  13. Георгиева И., С. Ангелова, **И. Трифенова**, С. Волева, А. Минкова, А. Курчатова, Н. Корсун. Епидемиологични и вирусологични характеристики на грипен сезон 2017/2018. Доклад на XVI Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк-хотел Москва, 10-12 май 2018 г.
  14. **Трифенова И.**, С.Ангелова, И.Георгиева, И.Цочева, С.Лазова, С.Парина, С.Милева, С.Волева, П.Переновска; Н.Корсун. Вирусна етиология на острите инфекции на долните дихателни пътища при деца на възраст под 5 години в България. Доклад на XVI Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк-хотел Москва, 10-12 май 2018 г.
  15. Корсун Н., Е.Бачийска, С.Панайотов, Н.Бранкова, М.Николова, А.Дечева, И.Томова, С.Ангелова, И.Георгиева, В.Левтерова, А.Курчатова, А.Минкова, Н.Владиминова, Ю.Атанасова, С.Йорданова, Я.Тодорова, А.Байкова, С.Волева, **И.Трифенова**. Национален референтен център „Респираторни инфекции и туберкулоза” - анализ на дейността през 2017. Доклад на XVI Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк-хотел Москва, 10-12 май 2018 г.
  16. Корсун Н., Ангелова С., Георгиева И., **Трифенова И.**, Волева С., Илиева Д., Александрова Е., Иванов И., Червенякова Т. Грипен сезон 2017-2018 в България. Нови решения във ваксинапрофилактиката на грип. Доклад на

- XII Национална конференция по инфекциозни болести. Сол Несебър Бей, Несебър, 11 – 13 октомври 2018 г.
17. Ангелова С., **Трифенова И.**, Волева С., Георгиева И., Корсун Н. Грипен сезон 2017/2018 – генетични характеристики на циркулиращите грипни вируси. Постер на IX Национална конференция по превантивна медицина. Панагюрище, 14-15 ноември 2018 г.
  18. Корсун Н., Ангелова С., **Трифенова И.**, Георгиева И., Волева С. Грип и превенция. Нови решения във ваксинапрофилактиката на грип. Доклад на 12-ти Национален конгрес по нозокомиални инфекции на БУЛНОЗО. София, 15-16 ноември 2018 г.
  19. Корсун Н., Е.Бачийска, М.Николова, А.Курчатова, Н.Бранкова, В.Левтерова, И.Томова, А.Дечева, С.Панайотов, С.Ангелова, А.Минкова, Н.Владиминова, Ю.Атанасова, С.Йорданова, Я.Годорова, А.Байкова, И.Григорова, С.Волева, **И.Трифенова**. Национален референтен център „Респираторни инфекции и туберкулоза” - анализ на дейността през 2018-2019. Доклад на XVII Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, Парк-хотел Москва, 9-11 май 2019 г.
  20. Волева С., С.Ангелова, И.Григорова, **И.Трифенова**, А.Минкова, С.Стоицова, Н.Владиминова, А.Курчатова, Н.Корсун. Грипен сезон 2018/2019 - епидемиологични и вирусологични характеристики. Доклад на XVII Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на БАМ, София, Парк-хотел Москва, 9-11 май 2019 г.