

**Резюмета на публикации и монографии след
придобиване на образователна и научна степен
„доктор“
на главен асистент Нина Димитрова Цветкова, дб**

I. На монографии и участия в монографии

1. **Цветкова Н.** Молекулярно-биологични методи и тяхното приложение в медицинската паразитологията. Издателство „Изток-Запад“, 2014, 100 с. (под печат).

Настоящата работа предоставя на читателя информация за някои от разработените молекулярно-биологични методи в медицинската паразитология.

Молекулярните методи намират все по-широко приложение в паразитологията за откриване и характеризиране на паразитни инфекции, за диагностика на заболявания, причинявани от трудно култивируеми паразити и др. Понастоящем, молекулярно-биологичните методи, прилагани в областта на медицинската паразитология, включват качествени анализи за откриване на един таргет (специфичен регион от секвенция на НК, която представлява интерес в конкретния анализ), количествени анализи, използвани като част от мониторинга на отговора към лечението на определени паразитни инфекции, и мултиплексни анализи, при които е възможно откриването на два или повече таргета в една и съща проба.

Броят на приложенията на молекулярно-биологичните техники в медицинската паразитология нараства бързо. Полимеразната верижна реакция се използва в рутинната практика за откриване и идентификация на паразити във все повече страни по света. С натрупването на информация за генома на паразитите се дава възможност за откриване на уникални геномни последователности, които могат да бъдат използвани за идентифициране на паразити, за диагностика на паразитни инфекции, в молекулярната епидемиология, за разработване на ваксини, за изучаване на биологията и физиологията на паразитите в еволюционно отношение, както и на връзката гостоприемник-паразит. Проучванията на молекулярната биология, свързани с противопаразитните лекарствени рецептори, потенциални таргети за химиотерапия, дават нов поглед върху молекулярно-генетичните механизми на лекарствената резистентност. Данните от тези проучвания се използват в различни направления, като: търсене на нови антипаразитни лекарства, подобряване на съществуващите химиотерапевтични семейства, подобряване на мониторинга на лекарствената резистентност и др. Наличието на лесни за работа китове, на автоматизирани техники и услуги за секвениране, създаването на библиотеки от геномни база данни, синтез на олигонуклеотиди и други процедури, улеснява прилагането на техниките на молекулярната биология.

Напредъкът в молекулярната биология е предизвикал революция в промишлеността, селското стопанство, фармакологията и медицината. Създадена през 1983 г. от Kary Mullis, който замисля PCR като метод за копиране на ДНК и синтезиране на големи количества от специфична ДНК секвенция, PCR техниката се прилага все по-широко в различни области на медицината.

Използването на молекулярните методи в медицинската паразитология допринася за точната идентификация на паразита (вид, щам, генотип), улеснява диагностиката и спомага за изясняване на някои епидемиологични особености на паразитозите. През последните години се наблюдава забележителен прогрес в разработването на диагностични методи на базата на техниката на полимеразната верижна реакция (Polymerase Chain Reaction (PCR)). Това е техника за получаване на неограничен брой копия на една ДНК молекула при наличие на различни ДНК молекули в изходната проба за изследване. За да се извърши PCR реакцията, е необходимо да е известен участъкът от „целевата последователност“ на ДНК молекулата (ген или сегмент от ДНК), който ще се копира. Синтезират се къси олигонуклеотиди (съдържащи около двадесет нуклеотида), наречени праймери, напълно комплементарни на последователността, намираща се на 3'-края на всяка ДНК верига, която ще се амплифицира.

Понастоящем едни най-широко прилаганите лабораторни диагностични методи за идентифициране на паразити включват: конвенционална полимеразна верижна реакция (PCR), случайна амплификация на полиморфна ДНК (RAPD), полиморфизъм на дължината на амплифицирани фрагменти (AFLP), полиморфизъм на дължината на рестрикционни фрагменти (RFLP), метод с микросателитни маркери, Luminex xMAP-базирана технология (области на мултианалитно профилиране), методът loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR в реално време и др.

С помощта на новосъздадените системи за изолиране на ДНК рискът от кръстосана контаминация /замърсяване/ при амплификация на ДНК на голям брой проби, наблюдаван при конвенционалните методи, е намален значително. Например при PCR в реално време (real-time PCR) реакцията протича в затворени епруветки, с използването на флуоресцентни молекули, при което този риск се намалява до минимум.

Съществуват и системи за откриване на няколко таргети едновременно т.н. мултиплексна PCR в реално време (multiplex real-time PCR).

В настоящата монография са включени два основни раздела:

Общ - разглежда различните PCR техники, техните предимства и недостатъци, както и организацията на работа в молекулярно-диагностичната лаборатория.

Специален – приложението на PCR в диагностиката на отделните паразитози.

2. Паразитни зоозоози при хората. П/р на Р.Курдова. Издателство НЦЗПБ, София, 2008, 223 с.

Н. Цветкова е съавтор в раздел Молекулярни методи в паразитологията, 176-199.

Зоозоозите са заболявания, предавани от животните на хората. Те имат космополитно разпространение. Известни са около 150 инфекциозни и паразитни заболявания, общи за животните и човека. Актуалността и здравното им значение през последните години значително нарасна в световен мащаб.

Сред паразитните зоозоози най-значими са хелминтозоозите: ехинококоза, трихинелоза, тенидоза, токсокароза, филариоза, фасциолоза и др. и протозоозите: токсоплазмоза, лайшманиоза, криптоспоридиоза, трипанозомоза, пневмоцистоза и др. Напоследък към тази група заболявания причисляват ламблиозата (жиардиоза) и бластоцистозата.

В нашата страна зоонозите имат важно здравно-социално и икономическо значение. Ехинококозата, една от най-тежко протичащите паразитози, води най-често до продължителна нетрудоспособност, чести рецидиви, не рядко до трайна инвалидизация и летален изход. След 1992 г. у нас се наблюдава рязко увеличаване на заболяемостта при хората, достигаща 8,32% през 2002 г. и със задържане на високи стойности, превишаващи показателите за другите Европейски страни, и през следващите години.

Тази неблагоприятна ситуация наложи провеждането на Националната програма за контрол на ехинококозата при хората и животните (2004-2008 г.). Трихинелозата запазва епидемичния си характер и за периода 1998-2007 г. ежегодно се регистрират 3-12 епидемични взрива и спорадични случаи. Токсокарозата с полиморфната си клинична картина често остава неразпозната и нелекувана, но проведените проучвания установиха 4,0% серопозитивност сред здравите лица и 10,9% при лица, суспектни за това заболяване. Токсоплазмозата е широко разпространена паразитоза у нас със средна серопозитивност на населението над 40% и ежегодно регистриране на случаи на остра инфекция при пациенти с лимфаденопатия, очна патология и СПИН, както и при бременни жени и новородени деца. Висцералната лайшманиоза, една позабравена протозооза се възвраща отново и придобива актуалност през последните години, поради ежегодното диагностициране на случаи сред деца и възрастни и информиране на ендемичност в югоизточна България.

Всичко изложено по-горе ни даде основание да разгледаме подробно съвременните знания за етиологията, патогенезата, патологичната анатомия, клиниката, диагностиката, лечението, диспансеризацията, епидемиологията, епидемиологичния надзор и контрол и профилактиката на най-важните за нашата страна паразитни зоонози при хората, с акцент върху ехинококозата. Поради често нетипичното клинично протичане на паразитозите и решаващото значение на лабораторната диагностика е отделено специално внимание на този въпрос. Включен е раздел за най-съвременните, но вече намиращи широко приложение генетични методи при зоонозите, които допринасят както за поставяне на точна диагноза, така и за видова и щамова идентификация на паразитите.

Трудът е предназначен за широк кръг специалисти: паразитолози, интернисти, инфекционисти, педиатри, алерголози, офталмолози, акушер-гинеколози, епидемиолози, общо практикуващи лекари и др.

3. Лабораторна диагностика на паразитозите при хората. Под редакцията на Р. Курдова, Издателство АРСО, София, 2009, 254 с.

Н. Цветкова е автор на раздел биомолекулярни методи и съавтор в раздели културелни методи и протозоози.

***Цветкова Н.** Култивиране на *Giardia (Lambli) intestinalis*, 72;

***Цветкова Н.** Култивиране на *T. vaginalis*, 73;

***Цветкова Н.** Култивиране на трипанозоми, 75;

***Цветкова Н.** Култивиране на свободно живеещи амеби, 76;

***Цветкова Н.** Биомолекулярни методи, 113-125;

***Цветкова Н.** Заболявания, причинени от свободно живеещи амеби, 135-138;

***Цветкова Н.** Жиардиаза, 138-140;

***Цветкова Н.** Балантидиоза, 140-141.

Паразитните болести при хората са широко разпространени в света и причиняват значителна заболяемост и смъртност, особено в райони с тропически и субтропически климат. В Африка, Азия и Южна Америка много паразитози като малария, амебиаза, трипанозомози, филариози, шистозомози, анкилостомидози и др. представляват сериозен здравен и социално-икономически проблем. В страните с умерен климат, каквато е България, се срещат редица местни паразитози – чревни хелминтози (ентеробиоза, аскаридоза, трихоцефалоза, хименолепидоза, тениидози) и протозоози (жиардиаза/ламблиоза, бластоцистоза и др.), здравно социалнозначими зоозоози (ехинококоза, трихинелоза и токсокароза), както и други паразитози с широко разпространение като токсоплазмоза и трихомоназа. Напоследък вниманието се насочва към т. нар. опортюнистични паразитози (токсоплазмоза, пневмоцистоза, криптоспоридиоза, циклоспориоза, изоспориоза, микроспоридиози, висцерална лайшманиоза и стронгилоидоза), които протичат тежко и често са непосредствена причина за смъртта на имунокомпрометирани пациенти, особено на тези със СПИН.

Поради засилената миграция на населението в световен мащаб определено епидемиологично и клинично значение имат паразитозите, внасяни от ендемични тропически страни в страни с умерен климат. При късно диагностициране и лечение се появява риск от възстановяване на местното предаване на някои елиминирани в страната заболявания (малария), от разпространение на паразитози със сравнително ограничена екстензивност у нас (чревни хелминтози и протозоози и др.), както и от летален изход на лицата, заразени в чужбина (тропическа малария и др.).

Повечето паразитни заболявания протичат с нехарактерна клинична изява, затова диагнозата не може да бъде поставена само на базата на симптоматиката, на данните от клиничния преглед и от рутинните лабораторни изследвания. Решаващо за етиологичната диагноза е паразитологичното изследване – микроскопско и имунологично. То има ключово значение при определяне на вида на паразита, с който е опаразитен даден пациент, а оттук – и на адекватна етиологична терапия.

В настоящето ръководство е представена съвременната лабораторна диагностика на паразитните заболявания при хората. В първия раздел специално внимание е отделено на вземането, съхранението и транспортирането на клиничните материали за изследване, тъй като от този начален етап зависи качеството на диагностиката. Включени са паразитологичните диагностични методи – макроскопски, микроскопски, културелни, имунологични, молекулярно-биологични, а също инокулиране на суспектен материал на клетъчни култури и опитни животни и др., прилагани както в рутинната, така и в референтната потвърдителна диагностика на местните и внасяните паразитози. Обсъждат се и въпросите на управлението на качеството на диагностиката. Представени са основните морфологични критерии за видова идентификация на паразитите. Вторият раздел е посветен на лабораторната диагностика по нозологични единици и може да послужи като алгоритъм за диагностициране на отделните заболявания. Включена е и информация за основното оборудване, консумативи и реактиви, необходими за паразитологичните изследвания.

В труда е споделен многогодишният опит в диагностиката на паразитните болести при хората на сътрудниците от Отдела по паразитология и тропическа медицина и в частност, на Националната референтна лаборатория за диагностика на паразитозите – местни и тропически към Националния център за заразни и паразитни болести, гр. София.

Ръководството е предназначено като за паразитолози, така и за широк кръг други специалисти: интернисти, инфекционисти, педиатри, алерголози, офталмолози, акушер-гинеколози, дермато-венеролози, епидемиолози, микробиолози, общопрактикуващи лекари и др. То може да се използва и от лаборантите в паразитологичните и клиничните лаборатории, а също и в учебния процес в медицинските институти и колежи.

4. Зоонози при човека и животните под редакцията на проф. Св. Мартинов и доц. Р. Комитова, издателство-Медицина и физкултура, 2012, 530 стр.

Цветкова Н. Балантидиоза, 134-137 стр.

Според СЗО зоонозите са заболявания, които се предават между гръбначните животните и човека.

Броят на зоонозите непрекъснато нараства и вече надхвърля 250, от които 80 са най-чести. Към новооткритите спадат лаймска борелиоза, анаплазмози, ерлихиози, хеморагични трески Лиса, Марбург и Ебола, ТОРС, хантавирусен белодробен синдром. Други разширяват своя географски ареал (енцефалит Западен Нил в Америка). Редица от новооткритите зоонози са резултат на способността на причинителите им да прескочат “междувидовата бариера”, както е при птичия грип, ТОРС, ХИВ инфекцията, vCID. Особено значение имат вирусните инфекции, които през последните десетилетия са в истинско настъпление както по отношение на заболяемостта сред животните и хората, така и по разширяване на нозогеографския им ареал, пряко свързано с неимоверното разпространение на нови агенти в биосферата и промените в патогенността на добре познати вируси.

Характерна черта на повечето зоонози е, че след трансмисия на човек епидемиологичната верига най-често се прекъсва. Единични зоонози имат епидемичен потенциал и причиняват мащабни епидемии – салмонелози, жълта треска, Ку-треска, японски енцефалит. Други привличат общественото и медийно внимание поради висок леталитет и опасност за медицинския персонал (някои хеморагични трески).

При разглеждането на зоонозите не бива да се забравя и стратегическото значение на немалка част от тях, включени в арсенала на биологическото оръжие и притежаващи потенциал на средства за биотерористична заплаха.

Предаването на зоонозните агенти се реализира директно – чрез храни или води, аерогенно или индиректно чрез вектори (най-често кръвосмучещи членестоноги).

Според естествената среда на обитаване или екосистемата, където циркулират техните патогени, зоонозите се разграничават на синантропни (с градски цикъл) – източник на инфекция за човека е домашно животно или синантропни гръбначни животни в жилището му, и екзоантропни с горски (див) цикъл в естествените огнища – туларемия, лаймска болест. При първия тип предаването е перкутанно, алиментарно или чрез конюнктивата, заболяванията са типично професионални за животновъдите и ветеринарномедицинския персонал. При втория тип хората се разболяват след навлизане в естествените огнища на инфекцията, най-често при атакуване от хематофагни членестоноги. Понякога няма рязка граница и някои имат и двата цикъла на циркулация – див и градски тип, например жълта треска, чума, американска

трипанозомоза. При денга дивият цикъл е с минимално значение за човека и повечето автори я приемат като антропоноза.

Сапронозите са заболявания, които се предават на човека от абиотичния субстрат на околната среда – почва, вода, екскрети на животни, гниеци растения, разлагащо се месо. Техните причинители имат способност да растат и се размножават в тези субстрати (сапрофитна фаза) и в гръбначните животни, вкл. човек (паразитна фаза). Те имат двоен живот: сапрофитен и паразитен (патогенен). Типични сапронози са повечето висцерални микози, някои бактериални заболявания (легионелози), но не и вирусни, рикетсиозни и хламидийни инфекции поради задължителния им вътреклетъчен паразитизъм и неспособността да се репродуцират извънклетъчно.

Зоонозите и сапронозите не винаги могат да се разграничат и според обстоятелствата могат да са зоонози или сапронози (листериоза, псевдотуберкулоза, антракс). В настоящата книга сапронозите са причислени към зоонозите.

Зоонозите винаги са били и остават неразгадан пъзел. Днес те са още по-голямо предизвикателство поради редица природни, социални и поведенчески фактори, обуславящи появата им на необичайно място или увеличената им заболяемост. Тук се включват нарастващият трафик на хора, животни и стоки, засилените миграционни процеси, глобалното затопляне, увеличаващият се брой имунокомпрометирани лица, навлизането на човека в дивата природа за приключения или военни маневри, отглеждането на екзотични домашни любимци (гушери, змии) и др.

II. В научни списания и сборници

Епидемиологичен надзор и контрол на местните и внасяните паразитози

1. Динев Д., Р.Курдова, Д.Йорданова, П.Петров, **Н.Цветкова**, Е.Маскръчка, Т.Гогов, М.Томова, Р.Иванова, С.Младенова, Е.Маринова, И.Сярова, Р.Борисова, М.Чавдарова, Д.Иванова, К.Николова, Г.Станчева, Т.Панайотова, Ж.Бошнакова, А.Русинова, М.Гарванска, К.Пирински, С.Неделчева, Н.Чамурова, С.Голубинов, М.Даракчиева, Л.Гагова, Г.Рашева, Б.Димова, М.Чергова, С.Узунова, К.Карастоянова. Медико-географска характеристика на аскаридозата и трихоцефалозата в България за 1990-1999г. В: Сборник научни доклади по медицинска география, С., 2001, 132-137.

През последните години се наблюдава отново повишаване на опаразитеността с аскаридоза (1998 – 0.61%; 1999 – 0.74%) след продължителното (1990-1997) ѝ задържане в по-ниски стойности (0.19-0.31%). Екстензията на трихоцефалозата показва лек спад (1998 – 0.17%; 1999 – 0.11%). Ендемични селища на аскаридоза се водят в 18 региона на страната, но броят им постепенно намалява поради процесите на урбанизация. Областите в България са на три категории според броя на огнищата и екстензията на аскаридозата: първа група (10) – без ендемични селища (Варна, Враца, Плевен и др.); втора група (10) – с малък брой ендемични селища и екстензитет на аскаридозата 0.11-0.44% Велико Търново, Видин, Габрова, Кърджали и др.; трета група (8) – с висок екстензитет на аскаридозата (0.45-1.67%) и многобройни огнища Благоевград, Бургас, Кюстендил, Пазарджик, Смолян и др. Спорадични случаи на

трихоцефалоза се регистрират в различни населени места и в ендемичните за аскаридоза селища.

2. Курдова Р., М.Иванова, **Н.Цветкова**, Н.Мюлер, Б.Готщейн, Л.Михов, Д.Йорданова, С.Голубинов, И.Атанасова, Л.Гагова, И.Бучкова, Г.Станчева, Ж.Бошнакова, А.Русинова, Ш.Узунова, Д.Иванова, Т.Маринова, Т.Панайотова, М.Томова, Т.Гогов, П.Димова, Е.Маскръчка, Н.Чамурова, М.Даракчиева, К.Карастоянова, С.Младенова, И.Сярова, К.Николова, М.Чергова, М.Лесичка, Б.Димова. Медико-географска характеристика на трихинелозата в България за периода 1993-2002 г. Информ.журнал НЦЗПБ, 2004, 5, 18-22.

За периода 1993 – 2002 година на територията на България са регистрирани общо 86 трихинелозни взрива, като заразено трихинелозно месо са консумирали общо 5434 лица, а заболели с клинично-изявена трихинелоза са 1629 лица. Констатирани са и 2 смъртни случая на трихинелоза. Трихинелозните взривове са обхванали 20 региона на страната, като най-многобройни са в: София и София област (21), Бургас (7), Благоевград (7), Пловдив (7), Пазарджик (6), Ямбол (6), Смолян (6), Стара Загора (5), Варна (5) и Перник (5). В останалите области за посочения период са избухвали единични взривове, като броят им е под 5. Докато през периода 1922-1974 година най-засегнатият по отношение на трихинелозата регион е Пловдивски, следван от гр. София и София-област, през последните 10 години на първо място изпъкват гр. София и София-област, Благоевградска, Пловдивска и Бургаска области, с почти ежегодно повтарящи се епидемии. Разпределението им по години показва сравнително стабилно високо ниво. Преобладават взривите, възникнали в резултат на консумация на заразено месо от домашни прасета (49). Молекулярното типизиране на изолираните трихинели от проучените 15 взрива установи два вида на род *Trichinella* – *T.spiralis* и *T.britovi*, с превалиране на втория вид (при 10 от взривите).

Данните от проведеното проучване свидетелстват за поддържане на инвазията в природните и синантропните огнища на по-голямата част от територията на страната и за нарасналата значимост на тази паразитоза у нас.

3. Курдова, Р. И.Райнова, Д.Йорданова, Р.Харизанов, И.Маринова, И. Биков, И.Кафтанджиев, **Н.Цветкова**. Характеристика на паразитната заболяемост в България през 2010 г. Информ. журнал НЦЗПБ, 2, 2011, 5-31.

Цел на настоящото проучване е обобщаване на данните за цялата страна и извършването на епидемиологичен анализ на състоянието на паразитозите в България., както и на отделните компоненти на провежданите епидемиологичен надзор, контрол и профилактика на паразитните заболявания през 2010 г.

През 2010 г. за паразитози са изследвани общо 737 999 лица и са открити 15 501 положителни (2,1%). Средната годишна опаразитеност на населението се задържа през последните години на сравнително ниско ниво, което може да се обясни с високия относителен дял на профилактичните изследвания (88%) и по-ниския дял на изследваните лица по епидемиологични – 51 156 (7%) и по клинични показания – 37 056 (5%). Официално са регистрирани 325 лица с ехинококоза, от които 291 (90,67 %) с първична и 34 (9,33 %) с постоперативни рецидиви. Средната заболяемост за годината е 3,95 ‰. Съобщени са 50 лица, които са консумирали опаразитени с трихинелни ларви месни продукти; заболели са 16 лица, като 12 от тях са с клинично изявена форма на

трихинелоза, а 4 - с асимптомна форма. Регистрирани са 3 епидемични взрива. Средната годишна заболяемост от тениаринхоза е 0,33‰. Средният екстензитет на аскаридозата (0,13%). Открити са 109 лица с трихоцефалоза (екстензитет 0,02%). С жиардиоза са диагностицирани 2 234 лица (0,43%). Екстензинвазията на хименолепидозата се задържат на нивото от 2009 (0,023%). Средните стойности на IgG серопозитивност за токсоплазма за страната са 32,48%; съобщени 37 случая на остра токсоплазма. За внасяни паразитози са изследвани 440 лица и е установено опаразитяване при 17 (3,86%) от тях, Малария е диагностицирана при 5 пациента.

Нивото на паразитната заболяемост в страната в последните години се задържа в едни и същи граници - около 2% от изследваните лица, които са значителен контингент – 700 000 - 800000. Спецификата на тези заболявания изисква комплексни мерки за тяхното диагностициране, лечение и профилактика с цел намаляване на източниците за разпространение, както и усилване на надзора и контрола на паразитозите за ограничаване на разпространение им.

4. Райнова И., Д.Йорданова, Р.Харизанов, И.Маринова, И.Биков, И.Кафтанджиев, **Н.Цветкова**. Състояние, надзор и контрол на паразитните болести в България през 2011 г. Наука Инфектология, Паразитология, 2013, 1(6), 35-40.

В сравнение с други европейски страни, в България паразитните болести са с високи показатели като заболяемост и екстензитет. Цел на изготвения анализ е определяне на състоянието на различните паразитози у нас през 2011 г. Използвани са данните от годишните отчети на паразитологичните структури от ЛЗ, РЗИ, МУ и НЦЗПБ. Резултатите показаха, че през 2011 г. Са изследвани общо 782 336 лица, като положителни са 1,63%. След провеждането на “Националната програма за контрол на ехинококозата при хората и животните” се наблюдава известно снижение на случаите при хората, но през 2011 г. Отново се установява тенденция за увеличаване на пациентите с ехинококоза. Спад има и при геохелминтозите, като прогнозата е, че той ще продължи и през следващата година. В екстензитета на контактните паразитози не се отчита особена динамика през последните три години. От опортюнистичните паразитози значителен брой изследвания се извършват предимно за токсоплазма и бластоцистоза. Макар и като спорадични случаи у нас ежегодно се регистрира автохтонната висцерална лайшманиоза. За още по-голямо ограничаване на разпространението на паразитните заболявания са необходими комплексни мерки за тяхното диагностициране, лечение и профилактика.

Проучвания върху етиологията, диагностиката, патогенезата, клиниката и разпространението на някои опортюнистични паразитози

- **Опортюнистични паразитози и ХИВ-инфекция**

5. Kurdova R., T.Marinova, D.Jordanova, M.Ivanova, **N.Tzvetkova**, I.Rainova. Opportunistic parasitic diseases associated with HIV infection in Bulgaria, In: Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology, 2004, 1009(P), 435-440.

В периода 1993-2003 са регистрирани пет опортюнистични паразитни болести, свързани със СПИН/ХИВ инфекция. Токсоплазма: серопозитивност в 27,01% от

изследваните 237 лица; реактивиране на латентна инфекция (повишаване на нивата на специфични IgG в 12,51% от серопозитивните и наличие на специфични IgA и IgG в 9,37%); потвърждение чрез PCR в 5 случая. Висцерална лайшманиоза е диагностицирана при един пациент със СПИН. Пневмоцистоза е открита в 6,06% от 165 изследвани пациенти, криптоспоридиоза в 13,79% от 58 лица и бластоцистоза в 16,21% от 37 изследвани пациенти.

✓ ТОКСОПЛАЗМОЗА

6. Kurdova R., D.Jordanova, **N.Cvetkova**, I.Rainova. Immunological diagnosis of acute toxoplasmosis by the detection of specific IgG, IgM and IgA antibodies. *Probl. Infect. Parasit. Dis., Suppl.*, 1995, 22, 21-23.

Проучването анализира първите резултати от комплексно откриване на специфични IgG, IgM и IgA антитела при диагностиката на остра токсоплазмоза. Изследвани са общо 236 серумни проби и 3 проби от гръбначно-мозъчната течност на суспектни пациенти. Резултатите показват, че комбинацията от различни техники за откриване на IgG, IgM и IgA анти-*T.gondii* антитела е много ефективен в серологичната диагностика на токсоплазмозата. Това допринася за ранна диагностика на остра придобита инфекция или на реактивиране на латентна токсоплазмоза.

7. Курдова Р, Т.Духовникова, Д.Бешков, И.Диков, **Н.Цветкова**, П.Рачев. Остра и латентна токсоплазмоза при HIV-инфектирани лица. *Инфектология*, 1996, 33, 1, 25-27.

Токсоплазмозата е опортюнистична инфекция, заплашваща живота на пациентите със СПИН. С няколкократно изследвания за токсоплазмоза в ELISA, РИФ и РПХА са обхванати 40 пациента (13 болни от СПИН и 27 HIV-серопозитивни лица). При 14 от тях са доказани антитоксоплазмени антитела. При трима болни от СПИН с церебрална токсоплазмоза е регистрирана серологична находка, свидетелстваща за реактивация на латентната инфекция: при един са установени антитоксоплазмени ИгГ и ИгА в серума и ликвора, при втория - ИгГ - в серума, ИгГ и ИгА - в ликвора, при третия - само ИгГ в серума. Данните свидетелстват за диагностичната стойност на специфичните ИгГ и ИгА в серума и ликвора при остра инфекция. Получените резултати показват необходимостта от серологичен скрининг за токсоплазмоза на HIV-инфектираните пациенти с оглед правилния терапевтичен подход при серопозитивните в случай на реактивация на токсоплазмената инфекция и предпазване на серонегативните от свежа инфекция чрез подходяща здравна просвета.

8. Курдова Р., И.Райтер-Овона, Д.Йорданова, **Н.Цветкова**, И.Райнова, И. Ангелов, Д.Помакова, А.Калайджиева, А.Русинова, Н.Андреева. Серологична диагностика на токсоплазменния лимфаденит. В: Сборник: IX Конгрес на българските микробиолози, 15-17.X.1998, София, т.1, 292-295.

Придобитата токсоплазмоза най-често протича със симптоматика на лимфаденопатия. Диагностиката на тази остра инфекция се основава главно на серологични тестове. Съществен диагностичен проблем е да се направи разграничение между широко разпространената латентна токсоплазмоза от наскоро придобитата. Целта на проучването е да се изследва диагностичната стойност на нивото на изотиповете на специфичните антитела при лимфаденопатия, причинена от *Toxoplasma*

dondii. Серуми от 92 пациенти с лимфаденопатия са изследвани по клинични показания в IFA-IgG, ELISA-IgG, IgM, IgA, ISAGA-IgM, IgA, IgE и SFT (DT). При 59 (64,13%) лица е открита комбинация от различни изотопове на специфични антитела, което предполага остра първична инфекция. IgG и IgM реактивност е открита при 57 (96,61%) от тях, а при 50 (87,72%) IgA също са били положителни. Специфични IgE антитела са открити при 58,70% от 46 пациенти със серологични данни за лимфаденопатия, причинена от *T. dondii*.

9. Marinova T., D. Jordanova, M. Ivanova, N. Tzvetkova R. Kurdova. Toxoplasmosis in patients of various clinical groups in Bulgaria. In: Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology, 2004, 187-191.

Проучено е разпространението на латентната и острата токсоплазмоза сред пациенти от различни клинични групи в България и е направена оценка на прилаганите съвременни методи (PCR и Western blotting) при диагностицирането на тази паразитоза. В нашето проучване установихме 579 (44,23%) лица, серопозитивни за токсоплазмоза. Сред тях преобладават пациенти с IgG реактивност от 40,72%, което предполага наличие на латентна инфекция. Остра инфекция е открита при 3,80% от имунокомпетентните пациенти и при 1,71% от имунокомпрометирани лица. Western blotting се оказва много полезен метод за ранна постнатална диагностика на конгенитална токсоплазмоза. Нашите данни потвърждават високата чувствителност и стойност на PCR.

10. Курдова Р., Т. Маринова, С. Петров, Н. Цветкова. Приложение на PCR и RFLP анализ за характеризиране на местни щамове на *Toxoplasma gondii* и с диагностични цели. Инфектология, 2009, 46, 4, 23-27.

Целта на проучването е доказване на ДНК на *T. gondii* в клинични материали от пациенти, суспектни за токсоплазмоза, и генотипиране на изолирани местни щамове на *T. gondii* от деца с конгенитална инфекция. Проведеният конвенционален PCR показва, че от изследваните общо 32 клинични материала 10 са положителни: 5 проби ликвор от пациенти със СПИН, мозък от починало новородено дете, заедно с проби от плацентата и пъпната връв, както и мозък и бял дроб от 17-годишно момиче, починало от менингоенцефалит. За идентифициране на генотиповете на *T. gondii* е приложен multiplex nested PCR. Генотипирането е проведено на трите местни щамове, поддържани чрез пасажи на бели мишки. Резултатите показваха, че местните щамове на *T. gondii* имат идентични профили с тези на референтния щам RH. Данните, получени от PCR-RFLP анализа при всеки от четирите локуса на местните щамове на *T. gondii* показваха отново профили, идентични с тези на референтния щам RH.

11. S.Zdravkova, I.Rainova, N.Tsvetkova. Analysis and evaluation of somatic antigen precipitated with 40% saturated ammonium sulfate from *Toxoplasma gondii*. Probl.Infect.Parasit.Dis., 2011, 39, 1, 23-24.

Целта на настоящото проучване е утаяване на соматичен антиген на *Toxoplasma* с амониев сулфат (40% насищане) и анализиране чрез dot-ELISA-IgG, ELISA-IgG и WB. Чувствителността и специфичността на dot-ELISA и ELISA методите е определена съответно на 96% и 98% за първия и 100% за втория метод. Резултатите, получени във WB показват много сложен антигенен профил. Визуализират се няколко банди с молекулни маси между 23-103 kDa. С най-висока честота на разпознаване от IgG

антителата са протеините с Мм 87, 50, 48, 44 и 35 kDa при IgG-WB и 35 kDa при IgM/IgA-WB.

✓ БЛАСТОЦИСТОЗА

12. Ангелов И., **Н.Цветкова**, А.Велкова, Р.Курдова. PCR базирана идентификация на бластоцистни изолати от хора. *Инфектология*, 2010, 47, 2,44-47.

Представителите на род *Blastocystis* са едноклетъчни паразити, обитаващи чревния тракт на хората и на различни видове животни. Техният патогенен потенциал е обект на усилен дискусии. Днес вниманието на изследователите е насочено към изразената генетична разнородност на *Blastocystis sp.*, която предполага и различна вирулентност на отделните генотипове на паразита. Приложена е методика за PCR-базирана идентификация на бластоцистни изолати от български пациенти. Изследвани са пресни фекални проби, фекални проби, съхранявани при -20°C , проби от свежи култури в среда на Павлова и от криокултури, съхранявани при -70°C и при -20°C , от 10 пациента с микроскопски доказана клинично проявена и асимптомна бластоцистоза. За изолиране на бластоцистна ДНК са използвани различни китове и протоколи. ДНК е изолирана успешно при два изолата от свежа култура, а при един от изолатите и от криокултура, което показва предимството на свежите или замразени култури на *Blastocystis sp.* пред изследването на фекални проби. Изолатите са от пациенти с хроничен ентероколит. За амплификация на консервативен регион от последователността на малката субединица на рНК ген (рДНК) е използвана двойката праймери SR1F/SR1R. Типирането на бластоцистните изолати с 7 STS праймери установи тяхната принадлежност към субтип 1 и субтип 3. Проведеното от нас първо проучване в страната върху бластоцистни изолати показва, че при пациенти с клинично изявена бластоцистоза се изолират два различни субтипа *Blastocystis sp.* - субтип 1 и субтип 3.

13. Angelov Iv., Tz.Lukanov, **N.Tsvetkova**, V.Petkova, G.Nicoloff. Clinical, immunological and parasitological parallels in patients with *Blastocystosis*. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers) 2008*, book 1, 55-58.

При паразитологично изследване на 7905 пациенти по клинични и профилактични показания, *Blastocystosis hominis* е открит при 273 (3,4%) от тях. Детайлни изследвания са проведени при 82 от инфектираните пациенти (19 мъже и 63 жени), разделени в 2 групи: лица с клинични симптоми и асимптомни носители. При лицата, инфектирани с *Blastocystosis hominis*, е установена корелация между броя на откритите паразити, клиничната картина и промените в нивата на общите серумни имуноглобулини (IgG, IgA, IgM). При половината от изследваните пациенти присъстват гастроинтестинални и алергични симптоми. Значително намаление в нивата на серумните IgA, корелиращи с броя на откритите паразити, е установено при 43 пациенти, независимо от наличието или отсъствието на клинични симптоми.

➤ ЛАЙШМАНИОЗА

14. Harizanov R., Kaftandjiev I., Jordanova D., **Tzvetkova N.**, Angelov I., Genova M., Dimitrov J. Difficulties in the differential diagnosis in a case of a visceral Leishmaniasis. *Probl.Infect.Parasit.Dis.*, 2009, 37, 2, 6-8.

Ние описваме клиничен случай на пациент, живеещ в областта на Велико Търново. Той се оплаква от персистиращ фебрилитет и понижаване на телесното тегло (30 кг), продължаващи от около година. По време на диагностичните процедури при физикалния преглед се открива значително увеличаване на слезката и черния дроб. Приложените антибиотични терапии не подобряват състоянието му. Приеман е няколко пъти в общинска болница на Велико Търново и Университетската болница в град Плевен. Първоначално е поставена диагнозата хроничен хепатит, а в последствие неходжкинов малигнен лимфом. За диагностични и терапевтични цели слезката на пациента е хирургично отстранена. След хистопатологична оценка на тъканни проби от слезка и лимфен възел в Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания-София е предположена инфекция с *Leishmania spp.* И пациентът е насочен за допълнителна консултация към Отдела по паразитология и тропическа медицина на НЦЗПБ-София. Въз основа на резултатите от положителните серологични изследвания, морфохистопатологичното изследване на препарати от костно-мозъчен аспират, оцветен по Романовски-Гимза с положителна находка на лайшманийни амастиготи и положителен сигнал от PCR анализа е поставена диагнозата висцерална лайшманиоза. Назначен е терапевтичен режим и пациентът е насочен за хоспитализиране за провеждане на лечение.

15. Н. Цветкова, Р.Харизанов, И.Райнова. PCR в диагностиката на висцералната лайшманиоза. Симпозиум "Екзотични, регионално значими инфекциозни и паразитни болести", 17-19 май 2013, Цигов Чарк, Сборник статии, 55-61.

Висцералната лайшманиоза (ВЛ) като трансмисивно заболяване се регистрира ежегодно в България. Ранното диагностициране и лечение се считат за основен фактор на контрола на ВЛ. Високата специфичност и чувствителност на PCR реакцията позволява откриване на лайшманийна ДНК в проби с малък брой паразити. Целта на настоящото проучване е приложение на PCR метода в диагностиката на ВЛ в България. С PCR са изследвани общо 17 клинични материала от 13 пациенти суспектни за ВЛ. ДНК е изолирана с помощта на кит на Qiagen (GmbH, Germany). Праймерите разпознават специфична повтаряща се ДНК секвенция от изолати на *Leishmania* от "Стария свят" и генерират ампликон с големина ~260 нд. С цел елиминиране на фалшиво отрицателните резултати е използван рекомбинантен положителен контрол. Резултатите от настоящото проучване показват, че за доказване на лайшманийна ДНК са подходящи различни клинични материали (амплификация е постигната от 9 от тях). Оценена е аналитичната чувствителност на PCR реакцията, като най-ниската граница на откриване в проведената от нас PCR е 20 паразитни клетки/200 µl кръв.

16. Rumen N Harizanov, Iskren T Kaftandjiev, Diana P Jordanova, Irina B Marinova, Nina D Tsvetkova. Clinical features, diagnostic tools, and treatment regimens for visceral leishmaniasis in Bulgaria. *Pathogens and Global Health*, 2013; 107(5), 260-266

Висцералната лайшманиоза (ВЛ), причинена от паразита *Leishmania infantum*, която някога е била до голяма степен ограничена до Южна Европа в момента се диагностицира в цяла Северна Европа, включително Великобритания. В усилията си да помогне на клиницистите от ЕС да подобрят тяхната диагностика и управление на ВЛ, този документ определя клинични характеристики, типични за заболяването, каквито са установени в България, където ВЛ е ендемична.

Методи: Списъкът на клинични симптоми, представени тук, се получава от медицинската документация (анамнези, епидемиологични анкетни карти, лабораторни

данни на пациентите) на 59 български пациенти с ВЛ. Това проучване също така включва микроскопични, серологични и молекулярни лабораторни техники.

Резултати: Описани и анализирани са клиничните признаци, диагностичните техники и терапевтичните схеми на 59 случаи - част от общия брой на анамнезите за случаи на ВЛ ($p = 120$, 116 български граждани и 4 чужденци), събрани в България през последните 24 години (1988-2011). Въпреки че всички от изследваните 59 случаи са с класически симптоми на ВЛ, само в три случая първоначалната диагноза е правилна.

Изводи: Ако не се лекува, зооантропонозната ВЛ води до инвалидизиращо хронично заболяване и смърт. И все пак, тъй като ВЛ се разпознава трудно и е сравнително нова за Северна Европа, погрешната диагноза е обичайна и лечението твърде често неподходящо и забавено.

17. Harizanov R., I.Rainova, **N.Tsvetkova**, I.Kaftandjiev, I.Bikov, O.Mikov. Geographical distribution and epidemiological characters of visceral leishmaniasis in Bulgaria, 1988 to 2012. *Eurosurveillance*, 2013, 18(29), 1-6

В България висцералната лайшманиоза е спорадично заболяване. Въпреки това, почти всяка година се регистрират случаи при хората. Настоящото проучване описва географското разпространение на болестта в България от 1988-2012, за период от 25 години. Случаите са анализирани в зависимост от възрастта, пола и място на пребиваване. За 25-годишния период са регистрирани общо 122 случая, 118 от които са автохтонни, а четири са внесени от ендемични страни в Южна Европа. Средната годишна заболеваемост за периода на проучването е 0,06 на 100 000 население или средно по пет случая на година (максимум 15 през 1989 г.; не са регистрирани случаи на заболявания през 1991 г., 1995 г., 1996 г. и 2008 г.). Случаи на висцерална лайшманиоза са регистрирани в 13 от 28-те области в България, главно в южната част на страната. Най-голям брой случаи са регистрирани в районите на Благоевград ($n = 36$) и Стара Загора ($n = 34$). Данните, представени в настоящото проучване показват, че има непрекъснато предаване на висцерална лайшманиоза в България с висока смъртност (1:7), засягаща предимно деца.

✓ КРИПТОСПОРИДИОЗА

18. Karanis P., I.Sotiriadou, V.Kartashev, Ch.Kourenti, **N.Tsvetkova**, K.Stojanova. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environmental Research*, 2006, 102 (3), 260-271

Целта на настоящото проучване е да се изследват водните запаси в южна Русия и България, за да се установи наличието на *Giardia* и *Cryptosporidium* в източниците на питейна вода от тези страни. Събрани са общо 166 водни проби от различни източници (повърхностни, чешмяна, бутилирана, кладенчова, изворна и отпадни води) от Ростов (южна Русия), София и Варна (България) и са изследвани за наличие на цисти на *Giardia* и ооцисти на *Cryptosporidium*. Приложеният метод представлява концентриране на водните проби чрез филтрация и флокуляция, пречистване със захароза, откриване/идентификация на (оо)цисти чрез имунофлуоресцентен тест и диференциален интерферентен контраст. Шестнадесет от 166 проби (9,6%) са положителни за *Giardia* и 30 (18,1%) за *Cryptosporidium*. Както *Giardia*, така и *Cryptosporidium* са открити в чешмяна, речна, кладенчова и отпадни води. Цисти на *Giardia* са открити и в бутилирана вода. Някои водни проби от реки, отпадни и

кладенчови води са силно замърсени с (оо)цисти. Настоящото проучване показва, че източниците на питейна вода в Русия и България са обект на замърсяване с *Giardia* и *Cryptosporidium*, с потенциални опасности за общественото здраве.

19. Цветкова Н., Р.Курдова. Откриване на *Cryptosporidium spp.* във водни проби чрез имунофлуоресцентна и PCR техники. Инфектология, 2007, 44, 1, Supl., 139-142.

Протозойният паразит *Cryptosporidium* присъства в околната среда под формата на ооцисти и се счита за причинител на остра и тежка диария сред хората и животните. Целта на настоящото изследване е да се проучи наличието на ооцисти на *Cryptosporidium* във водни проби чрез прилагане на имунофлуоресцентна и PCR техники. От събраните 135 проби, 33 (24%) са положителни за ооцисти на *Cryptosporidium*. В пробите от реки е открит най-голям брой положителни находки (21 от 42 изследвани), следвани от каналите за отпадни води (6 от 12), изворите (5 от 18) и помпата за вода (1 от 3). В пробите от реки, в 17 са открити ооцисти при имунофлуоресцентния тест и при 21 има положителен сигнал от амплификацията на 18S рДНК на *Cryptosporidium*. При пробите, взети от канали за отпадни води, данните от имунофлуоресцентния тест и PCR анализа показват идентичност в броя на получените положителни проби. Само една от изследваните проби от помпа за вода се позитивира при PCR анализа. В пробите от извори за питейна вода ооцисти на *Cryptosporidium* са открити в 5 от тях, като 2 са позитивирани само с PCR анализа. PCR техниката, със своите възможности за амплификация на ДНК на *Cryptosporidium* от малък брой ооцисти, е предпочитана пред традиционните методи за откриване и доказване на ооцисти на паразита. Представената работа е първоначален опит за изясняване на ситуацията, относно присъствието на *Cryptosporidium* във водните източници на нашата страна. Резултатите от проведеното проучване сочат висока честота на находките на ооцисти на криптоспоридии в изследваните водни проби от различни източници у нас. Те са индикатор за необходимостта от провеждане на по-широки изследвания и регламентиране на санитарно-паразитологичните изследвания на водни източници за криптоспоридии, за осигуряване на безопасността на питейната вода в нашата страна. При възникване на водни епидемии, освен бактериални агенти, трябва да се има предвид и да се търси и този причинител.

Проучвания на свободно живеещи амеби. Видова идентификация, патогенни свойства, разпространение.

20. Tsvetkova N., R.Kurdova. Study of pathogenic features of *Acanthamoeba* isolated from the environment in Bulgaria in cell culture. Experimental pathology and parasitology, 1998, 1, 36-45.

В настоящото изследване патогенните свойства на амебите от род *Acanthamoeba* от 5 изолата, растящи в аксенични култури (от водни проби от реки и езеро в България), са проучени *in vitro*. Резултатите показват, че амебите от всички изследвани изолати продуцират разрушаване на клетъчната култура. Характерът и динамиката на промените на клетъчните монослое са сходни при взаимодействието с амебите от всички изолати и се проявяват чрез разрушаване до пълна подмяна на клетките на културата от амеби. Наблюдавани са също общи морфологични особености на изменението на засегнатата клетка (заостряне на краищата на клетките, удължаване, уплътняване и пикноза на ядрата, ядра наподобяващи "леопардова кожа" и т.н.), причинени от амебите от всичките пет изолати. Резултатите, получени с клетъчната

култура потвърждават първите индиректни индикации за патогенни свойства на проучваните амеби, въз основа на способността им да растат при 37°C и 45°C в аксенична култура. Те показаха, че клетъчната култура от човешки ембрионален бял дроб е полезен модел за *in vitro* изследване на патогенността на *Acanthamoeba*. То предоставя информация за тези свойства на амебите и трябва да бъде последвано от други тестове, като тест за патогенност върху животни.

- 21. Цветкова Н., Р.Курдова.** Проучване на патогенните свойства на амебите от род *Acanthamoeba*, изолирани в България, на клетъчни култури. В Сборник: IX Конгрес на българските микробиолози, 15-17.X.1998, София, т.1, 304-307.

Свободно живеещите амеби (СЖА) от род *Acanthamoeba*, обитаващи външната среда, са причинители на инфекции на ЦНС, очите и кожата. Целта на настоящото проучване е да се изследват патогенни характеристики на амебите, принадлежащи към род *Acanthamoeba*, изолирани от околната среда в България на клетъчни култури от бозайници. Пет амебни изолати, растящи в аксенични условия при 37°C или 45°C (4 от реки и един от езеро) са тествани в култура от човешки ембрионален бял дроб. Амебите от всички пет изолати предизвикват унищожаване на монослоя от култивирани клетки. Промените (като удължение, гранулиране, закръгляне и пикноза на клетките), водещи до пълно разрушаване на монослой в рамките на 24-72 часа в резултат на амебна дейност, са подобни за всички проучвани изолати. Резултатите от проучването показват, че клетъчната култура е полезен модел за *in vitro* изследване на патогенността на *Acanthamoeba*.

- 22. Tsvetkova N., S. Nikolaeva, R. Kurdova-Mintcheva.** An environmental survey for free-living *Hartmannella* amoebae with pathogenic potential. In: Proceedings of X European Multicolloquium of Parasitology – EMOP, Paris, France, August 24-29, 2008, 93-96.

Целта на настоящото проучване е да се изследва околната среда за *Hartmannella* с патогенен потенциал. Изследвани са общо 377 проби от 193 външни източници (източници на вода, почва и пясък). Въз основа на морфологични и PCR проучвания 47 проби са отчетени като положителни за амеби от рода *Hartmannella*. Амебите от 2 щамове, растящи в аксенична култура, са анализирани чрез PCR-RFLP и определени като *H. vermiformis*. Амебите на тези щамове показват цитопатогенност в клетъчна култура и заболяемост/смъртност в експериментални животни.

- **Проучвания на етиологията, диагностиката и клиниката на някои паразитозоозни**

➤ **ЕХИНОКОКОЗА**

- 23. Kurdova - Mintcheva R., I.Marinova, I.Rainova, D.Jordanova, M.Ivanova, P.Valtcheva, N.Tsvetkova.** Immunoscreening for human cystic echinococcosis in Bulgaria. In: Proceedings of the 11th International Congress of Parasitology, Glasgow, UK, August 6-11, 2006, 463-467.

Кистната ехинококоза при хората в България е започнала да се покачва от 1993 г. насам със значително нарастване на заболяемостта - 8,47 на 100 000 души през 1996 г. и 7,64 на 100 000 души през 2004 година. Целта на настоящото проучване е да се извърши имуноскрининг на лица с по-висок епидемиологичен риск или по клинични

показания, за да се разкрие скритата заболяемост от ехинококоза. В проучването са включени общо 1 612 лица от 17 от 28-те региона в страната. Първоначално е проведен скрининг с индиректна хемаглутинация или ELISA в първичните лаборатории, а след това в Националния център по заразни и паразитни болести е извършено потвърждение на диагнозата чрез ELISA и Western blot. От 202 положителни случая при скрининга 56 (3,47%) са потвърдени чрез ELISA и WB. Серологично потвърдените пациентите са подложени и допълнителни изследвания.

24. Marinova, I., N.Tsvetkova. Development of conventional PCR for species identification of *Echinococcus granulosus*. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 2012, 65, 10, 1455-1460

За видова идентификация на *Echinococcus granulosus* са приложени и сравнени 4 двойки праймери, описани в литературата. Анализирани са 10 ехинококови кисти. ДНК е екстрахирана от сколекси и мембрани (общо 60 проби) с различни количества на протеиназа К. В резултат на тестваните различни параметри на PCR микса и амплификационните условия е разработен стандартен протокол. Всички изследвани двойки праймери идентифицират кистите като *E. granulosus* и наблюдаваните продукти са с големина, идентична на тази, описана в литературата за съответните двойки праймери. Независимо от по-добрите резултати, получени при изолиране на ДНК от сколекси, положителен PCR сигнал е получен и от мембраните, при използване на по-големи количества на протеиназа К и съвременното отстраняване на кутикуления слой. Резултатите показват, че PCR е подходящ метод за видова идентификация на *E. granulosus* и може да бъде приложен и върху стерилни кисти (без наличие на сколекси). Методът ще бъде използван като първичен етап за разработването на RFLP-PCR за шамова идентификация на *E. granulosus*, метод, широко проучван понастоящем в световен мащаб.

➤ ТРИХИНЕЛОЗА

25. Kurdova R., N.Muller, N.Tsvetkova, L.Michov, D.Georgieva, M.Ivanova, B.Gottstein. Characterisation of *Trichinella* isolates from Bulgaria by molecular typing and cross-breeding. Veterinary parasitology, 2004, 123, 3-4, 179-188.

От регистрираните в периода 1999–2002 г. в България 15 трихинелозни взрива при хората са събрани ларви на *Trichinella spp.* от заразено месо от домашни и диви животни. Изолати на *Trichinella spp.* са получени от 62 инфектирани по естествен път диви животни и от плъх. Всички изолати са подложени на определяне както чрез multiplex PCR, така и чрез експериментално кръстосване. За събиране и анализиране на епидемиологични и клинични данни са използвани стандартни протоколи за епидемиологично проучване и контрол на взривовете. Идентифицирани са само два вида - *Trichinella britovi* и *Trichinella spiralis*. Резултатите, получените от молекулярното типизиране напълно съвпадат с тези от експерименталното кръстосване. Сред паразитните изолати, получени при 15 епидемични взрива, преобладава *T. britovi* (n = 10) в сравнение с *T. spiralis* (n = 5). По отношение на гостоприемника, преобладаващият вид сред дивите свине е *T. britovi* (n = 4), като само в една проба от диво прасе е идентифициран вида *T. spiralis*. Сред изолатите, получени от продукти от домашни животни *T. britovi* е открит в пет случая, а *T. spiralis* в четири, респективно. Сред естествено инфектираните диви животни, които не са свързани с епидемиите, е установен само вида *T. britovi*. Настоящите резултати предоставят строга индикация, че

в България двата вида *T. britovi* и *T. spiralis* участват в циклите сред домашните и дивите животни. По отношение на географското разпространение, *T. britovi* се открива в Централните, Южните, Източните и Западни части на страната и сред дивите животни от Средна Стара планина и Средна гора, докато *T. spiralis* е открит само в Западна и Югозападна България.

➤ ТРИХОМОНАЗА

26. Цветкова Н., П.Караславова, Г.Пехливанов, М.Иванова, Р.Курдова. Приложение на PCR метода в диагностиката на урогениталната трихомоназа. Инфектология, 2009, 46, 4, 20-22.

Приложен е PCR метод, базиран на 18S рДНК, за откриване на инфекции, причинени от *T. vaginalis*. Изследвани са общо 53 клинични материала, взети от 48 лица: 8 вагинални секрета, 42 проби еякулат и 3 проби урина. Използвани са три метода: Микроскопски - чрез нативни и оцветени по Романовски-Гимза препарати; 2. Културални - посявка на хранителна средата TV4; 3. PCR - амплифициране на участък от 18S рДНК гена. За положителен контрол на реакцията е използвана ДНК от *T. vaginalis*, изолирана от щам, поддържан на среда TV4. От изследваните клинични материали наличието на *T. vaginalis* е доказано и с трите метода в 1 проба. Пет от пробите са положителни културална и в PCR, а една се позитивира само в PCR. Чувствителността на метода е доказана чрез успешното визуализиране на PCR продукт след амплификация на ДНК от 1 паразит. Прилагането на PCR методите в диагностиката на трихомоназата повишава нейната ефективност и намалява броя на фалшиво отрицателните и фалшиво положителните резултати при използването на микроскопската и културална диагностика.