



**НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И
ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**

**ОТДЕЛ ВИРУСОЛОГИЯ
НАЦИОНАЛНА ПОТВЪРДИТЕЛНА ЛАБОРАТОРИЯ ПО HIV**

Ивайло Алексиев Иванов

**АНТИРЕТРОВИРУСНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И
МОЛЕКУЛЯРНА ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА
HIV-1 В БЪЛГАРИЯ: ИНТЕГРИРАН АНАЛИЗ
НА ГЕНЕТИЧНОТО РАЗНООБРАЗИЕ,
ФИЛОДИНАМИКАТА И ДЕМОГРАФСКИТЕ
КОРЕЛАЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА НАУЧНА СТЕПЕН
ДОКТОР НА НАУКИТЕ**

Специалност Вирусология, Област на висшето образование: 4. Природни науки,
математика и информатика; Професионално направление: 4.3. Биологически науки

София 2025

Автор: Ивайло Алексиев Иванов

Заглавие на дисертацията:

Антиретровирусна резистентност и молекулярна епидемиология на HIV-1 в България: интегриран анализ на генетичното разнообразие, филодинамиката и демографските корелации

Научна степен: Доктор на науките

Специалност: Вирусология

Област на висшето образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Структура на дисертационния труд:

списък на използваните съкращения, списък на използваните фигури, списък на използваните таблици, въведение, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, изводи, приноси, списък на използваната литература и приложения.

Обемът на дисертационния труд е: 310 страници, съдържащи 43 таблици и 58 фигури. Библиографската справка обхваща 342 източника, от които 6 на кирилица и 336 на латиница.

Вътрешната защита се проведе пред разширен колегиум на Отдел „Вирусология“ на 11 септември 2025 г.

Място на разработване: Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV (НРПЛ по HIV), Отдел „Вирусология“, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София.

Финансиране: Проучванията са осъществени със средства от Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), Министерство на здравеопазването на Република България (проект ДН03/2 от 16.12.2016 г., финансиран от Фонд „Научни изследвания“), както и по проект BG05M2OP001-1.002-0001 по Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж 2014–2020“, съфинансирана от Европейския фонд за регионално развитие.

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	6
1.-АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	8
2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА	10
3. РЕЗЮМЕ НА МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	12
4 РЕЗУЛТАТИ	16
4.1 Изследвани материали и демография.....	16
4.2. Анализ на резистентни мутации	22
4.2.1. Анализ на резистентните мутации при различни категории от изследваната популация.....	24
4.2.2. Резистентни мутации към NRTI	27
4.2.3. Резистентни мутации към NNRTI	31
4.2.4. Резистентни мутации към PI	36
4.2.5. Обобщение на резистентността към трите класа антиретровирусни медикаменти.....	39
4.2.6. Резистентност при различни категории от изследваната популация	40
4.3. Субтипирание и филогенетичен анализ	45
4.3.1. Идентификация и анализ на субтиповете на HIV-1 въведени и разпространени в България	45
4.3.2. Разпространение на резистентни мутации сред инфектирани с различни субтипове на HIV-1.....	47
4.3.3. Разпространение на различните субтипове на HIV-1 при двата пола.....	49
4.3.4. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред различните трансмисионни групи	51
4.3.5. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред лица инфектирани в България и чужбина	53
4.3.6. Разпространение на HIV-1 субтипове по области в България	55
4.3.7. Обобщение върху анализа на HIV-1 субтиповете в България	56
4.4. Анализ на трансмисионните клъстери	59
4.4.1. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип B	59
4.4.2. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 CRF01_AE.....	62
4.4.3. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип F	63
4.4.4. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип A (A1 и A6).....	65
4.4.5. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 CRF02_AG.....	67
4.4.6. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип C	69
4.4.7. Анализ на филогенетичните клъстери при URF	69
4.5. Резултати от избрани публикации по темата на дисертацията	71
4.5.1. Произход и разпространение на HIV-1 при ИВН в България.	72
4.5.2. Произход и разпространение на HIV-1 субтип B сред ХЕТ лица в България	77
4.5.3. Анализ на резистентните мутации на суб-еидемията от субтип B в България	79
4.5.4. Анализ на произхода на суб-еидемията от HIV-1 CRF01_AE в България.....	81
4.5.5. Анализ на произхода и разпространението на HIV-1 субтип C в България.	83
4.5.6. Трансмисионна резистентност в България (2012-2020)	87
5. ДИСКУСИЯ	92
6. ИЗВОДИ	111
7. ПРИНОСИ	115
8. БИБЛИОГРАФИЯ.....	118
9. ПРИЛОЖЕНИЯ	121

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

СПИ – сексуално-предавана инфекция
ХЕТ - хетеросексуални
МСМ - мъже, които правят секс с мъже
ИВН - лице, което употребява интравенозни наркотици
МСМ+ИВН, МСМ с употреба на венозни наркотици
АРТ – антиретровирусна терапия

Съкращения на латиница

ЗТС - Lamivudine - Ламивудин
АВС - Abacavir - Абакавир
АIDS - Acquired immune deficiency syndrome - СПИН - Синдром на придобита имунна недостатъчност
ART - Antiretroviral therapy - АРТ - Антиретровирусна терапия
АTV - Atazanavir - атазанавир
AZT/ZDV - Zidovudine/Azidothymidine – Зидовудин/Азидотимидин
с, COBI - Cobicistat - Кобицистат
CAB - Cabotegravir - Каботегравир
CAIs - Capsid Inhibitors - капсидни инхибитори
CRF - Circulating Recombinant Forms - Циркулиращи рекомбинантни форми
D4T - Stavudine - ставудин
DDI - Didanosine - диданозин
DOR - Doravirine - Доравирин
DRM – Drug Resistance Mutations – Резистентни мутации
DRV - Darunavir - Дарунавир
DTG - Dolutegravir - Долутегравир
EFV - Efavirenz - Ефавиренц
ETR - Etravirine - Етравирин
FDA - Food and Drug Administration - Агенцията по храните и лекарствата в САЩ
FI - Fusion Inhibitors – Фузионни инхибитори (инхибитори на навлизането)
FOS-APV, FPV - Fosamprenavir - Фозампренавир
FTC - Mtricitabine - Мтрицитабин
НАART - Highly Active Antiretroviral Therapy - високоактивна антиретровирусна терапия

HIV - Human Immunodeficiency Virus – Човешки имунодефицитен вирус
IDV - Indinavir - индинавир
INSTI - Integrase Strand Transfer Inhibitors – инхибиторите на интегразния трансфер или интегразни инхибитори
LAV - Lymphadenopathy-Associated Virus - Вирус, асоцииран с лимфаденопатия
LEN - Lenacapavir - Ленакапавир
LPV - Lopinavir - лопинавир
MVC - Maraviroc - Маравирок
NFV - Nelfinavir - нелфинавир
NNRTI - Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor - ненуклеозидните инхибитори на обратната транскриптаза
NRTI - Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor - Нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза
NVP - Nevirapine - Невирапин
PEP - Post-Exposure Prophylaxis - ПЕП - пост-експозиционна профилактика
PI - Protease Inhibitors - протеазни инхибитори
PrEP - Pre-Exposure Prophylaxis - ПрЕП - пре-експозиционна профилактика
RAL - Raltegravir - Ралтегравир
RPV - Rilpivirine - Рилпивирин
RTV - Ritonavir - Ритонавир
SDRM - Surveillance Drug Resistance Mutations – Наблюдение мутации за лекарствената резистентност (само за трансмисионна резистентност) съгласно списък на СЗО от 2009 г.
SQV - Saquinavir - саквинавир
T-20 - Enfuvirtide - Енфувиртид
TAF - Tenofovir Alafenamide - Тенофовир Алафенамид
TDF - tenofovir DF - Tenofovir Disoproxil Fumarate - Тенофовир дизипроксил фумарат
ТЛР Transmitted Drug Resistance – ТЛР трансмисионна лекарствена резистентност
TFV - Tenofovir - Тенофовир
TPV - Tipranavir - Типранавир
URF - Unique Recombinant Forms - уникални рекомбинантни форми

СПИСЪК НА ПРИЛОЖЕНИТЕ ТАБЛИЦИ

- Таблица 1. Страна на произход на изследваните лица.
- Таблица 2. Вероятна страна на придобиване на инфекцията с HIV.
- Таблица 3. Географски регион в страната по постоянен адрес при диагностициране.
- Таблица 4. Обобщение на антиретровирусна резистентност в изследваната популация.
- Таблица 5. Анализ на резистентни мутации към NRTI HIVDB.
- Таблица 6. Фенотипно отражение на ефекта от резистентни мутации към NRTI .
- Таблица 7. Анализ на резистентни мутации към NNRTI HIVDB.
- Таблица 8. Фенотипно отражение на ефекта от резистентни мутации към NNRTI.
- Таблица 9. Анализ на резистентни мутации към PI HIVDB.
- Таблица 10. Фенотипно отражение на ефекта от резистентни мутации към PI.
- Таблица 11. Разпространение на резистентни мутации при двата пола.
- Таблица 12. Резистентни мутации сред различните трансмисионни групи.
- Таблица 13. Резистентни мутации сред сексуални работници и лица със СПИ.
- Таблица 14. Резистентни мутации при лица инфектирани в България и чужбина.
- Таблица 15. Двадесет и шест различни субтипове, CRFs и URFs.
- Таблица 16. Резистентни мутации спрямо субтиповете на HIV-1.
- Таблица 17. Разпространение на различните субтипове на HIV-1 при двата пола.
- Таблица 18. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред различните трансмисионни групи.
- Таблица 19. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред инфектирани в България и чужбина.
- Таблица 20. Анализ върху HIV-1 субтиповете при различни категории.
- Таблица 21. Резистентни мутации към PI в клъстери от HIV-1 субтип B.
- Таблица 22. Резистентни мутации към NRTI и NNRTI в клъстери от HIV-1 субтип B.
- Таблица 23. Резистентни мутации към PI, NRTI и NNRTI в клъстери от CRF01_AE.
- Таблица 24. Резистентни мутации в клъстери от HIV-1 субтип F.
- Таблица 25. Резистентни мутации в клъстери от HIV-1 субтип A1.
- Таблица 26. Резистентни мутации в клъстери от HIV-1 CRF_02AG.
- Таблица 27. Резистентни мутации в клъстери от HIV-1 URF.

СПИСЪК НА ПРИЛОЖЕНИТЕ ФИГУРИ

- Фигура 1. Диаграма на изследваните лица по пол и година на диагностициране на HIV.
- Фигура 2. Диаграма на изследваните лица.
- Фигура 3. Диаграма на изследваните лица по възраст при диагностициране с HIV.
- Фигура 4. Вероятна страна на придобиване на инфекцията по години на диагностициране.
- Фигура 5. Регион в страната по постоянен адрес при диагностициране на HIV.
- Фигура 6. Резистентни мутации към NRTI HIVDB по брой изследвани пациенти.
- Фигура 7. Резистентни мутации към NRTI HIVDB по брой резистентни мутации.
- Фигура 8. Фенотипно отражение от резистентни мутации към NRTI.
- Фигура 9. Резистентни мутации към NNRTI HIVDB по брой изследвани пациенти.
- Фигура 10. Резистентни мутации към NNRTI HIVDB по брой резистентни мутации.
- Фигура 11. Фенотипно отражение от резистентни мутации към NNRTI.
- Фигура 12. Главните резистентни мутации към PI HIVDB по общ брой мутации.
- Фигура 13. Допълнителните резистентни мутации към PI HIVDB по общ брой мутации.
- Фигура 14. Фенотипно отражение от резистентни мутации към PI.
- Фигура 15. Фенотипно отражение от резистентни мутации към NRTI, NNRTI и PI.
- Фигура 16. Обобщение на резистентни мутации в различни демографски и епидемиологични групи.
- Фигура 17. Диаграма на двадесет и шест различни субтипове, CRFs и URFs.
- Фигура 18. Резистентни мутации спрямо общия брой и спрямо субтиповете на HIV-1.
- Фигура 19. Разпространение на различните субтипове при двата пола.
- Фигура 20. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред различните трансмисионни групи.
- Фигура 21. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред инфектирани в България и чужбина.
- Фигура 22. Разпространение на HIV-1 субтипове по области в България.
- Фигура 23. Филогенетични клъстери на HIV-1 субтип В.
- Фигура 24. Филогенетични клъстери на HIV-1 CRF01_AE.
- Фигура 25. Филогенетични клъстери на HIV-1 субтип F.
- Фигура 26. Филогенетични клъстери на HIV-1 субтип А.
- Фигура 27. Филогенетични клъстери на HIV-1 CRF02_AG.
- Фигура 28. Филогенетични клъстери на HIV-1 субтип С.
- Фигура 29. Филогенетични клъстери на URFs.
- Фигура 30. Географско разпределение на HIV-1 субтиповете сред ИВН в България.
- Фигура 31 А и В. Глобално филогенетично дърво на CRF01_AE и CRF02_AG.
- Фигура 32. Филодинамика и филогеография на HIV-1 CRF01_AE в България.
- Фигура 33. Филодинамика и филогеография на HIV-1 CRF02_AG в България.
- Фигура 34. Байесово филогенетично дърво на субтип В сред хетеросексуални лица в България.
- Фигура 35. Байесов skyline plot и миграционен модел на субтип В сред хетеросексуални лица в България.
- Фигура 36. Nextstrain анализ на глобални HIV-1 CRF01_AE секвенции.
- Фигура 37. Глобално филогенетично дърво с максимална правдоподобност за HIV-1 субтип С в България.
- Фигура 38. Байесов молекулярен часовник анализ на HIV-1 субтип С в България.
- Фигура 39. Въвеждане и разпространение на HIV-1 субтип С в България.
- Фигура 40. Байесов skyline plot, показващ предполагаемия растеж на HIV-1 субтип С по години.
- Фигура 41. Трансмисионна резистентност и прогнозирана фенотипна резистентност в България.
- Фигура 42. Характеризиране на трансмисионните мрежи на HIV-1 при наивни за АРТ лица.

ВЪВЕДЕНИЕ

Синдромът на придобитата имунна недостатъчност (СПИН) е документиран за първи път през юни 1981 г., когато Центърът за контрол и превенция на заболяванията на САЩ (CDC) публикува съобщения за рядка белодробна инфекция, причинена от *Pneumocystis carinii* и сарком на Капоши при млади хомосексуални мъже [MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1981]. До края на 1981 г. са регистрирани 337 случая с тежък имунен дефицит, маркирайки началото на една от най-сериозните епидемии на съвременното общество. През септември 1982 г. CDC официално въвежда термина СПИН, а през 1983 г. д-р Франсоаз Баре-Синуси и проф. Люк Монтание от Института „Пастър“ изолират етиологичният агент - ретровирус, който през 1986 г. получава универсалното наименование човешки имунодефицитен вирус (HIV) [Barré-Sinoussi F, et al., Science, 1983].

Глобалната епидемия от HIV е резултат от междувидов пренос на ретровирус от примати към хора на територията на Централна и Западна Африка чрез предаване на вирус на имунна недостатъчност при примати (SIV) [Faria NR, et al., 2014]. HIV-1 се характеризира с изключително висока генетична изменчивост, предизвикана от липсата на коригиращи механизми при обратната транскрипция, което води до натрупване на множество мутации и рекомбинации. В резултат на това HIV-1 се разделя на четири основни филогенетични групи: М (major), О (outlier), N (non-M/non-O) и Р, всяка от които е резултат от независим междувидов преход [Sharp PM, et al., 2011].

Група М е епидемиологично най-значима и е отговорна за настоящата пандемия. Тя включва най-малко десет генетично разграничими субтипа: А, В, С, D, F, G, H, J, K и L, както и множество циркулиращи рекомбинантни форми (CRFs) и уникални рекомбинантни форми (URFs) [Nemelaar J, et al., 2019]. Глобалното разпространение на субтиповете е силно неравномерно и се влияе от редица фактори, включително ефекта на основополагащия субтип, социално-икономическите детерминанти, като миграция и урбанизация, както и циркулацията в специфични рискови групи. Субтип С представлява 46,6% от всички HIV-1 инфекции глобално и преобладава в Южна и Източна Африка, субтип В доминира в Северна Америка и Западна Европа, докато субтип А е най-честият в Източна Европа и Централна Азия.

Според данни на UNAIDS, повече от 91,4 милиона души са се инфектирали с HIV от началото на епидемията, а приблизително 44,1 милиона са починали вследствие на СПИН-свързани заболявания. През 2024 г. броят на хората, живеещи с HIV, възлиза на 40,8 милиона, като 31,6 милиона имат достъп до антиретровирусна терапия (АРТ) [UNAIDS, 2025]. Приложението на АРТ доведе до драстично намаляване на смъртността и ограничаване на предаването на инфекцията.

Независимо от терапевтичните успехи, лекарствената резистентност на HIV остава сериозен риск за устойчивостта на лечението и постигането на глобалното елиминиране на СПИН. Резистентността е резултат от сложни генетични и епидемиологични механизми, които оказват въздействие, както на индивидуално, така и на популационно ниво. Разграничават се два основни модела: трансмисионна лекарствена резистентност (ТЛР) при индивиди, инфектирани с резистентни щамове преди започване на терапия, и придобита резистентност, развиваща се в хода на лечението при неуспешна вирусна супресия [Clutter, D. S., et al., 2016].

Мутациите, асоциирани с резистентност към протеазни инхибитори (PI), нуклеозидни (NRTI) и ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTI), показват различни модели на възникване и кръстосана резистентност. Многобройните

резистентни мутации могат да окажат кумулативно въздействие върху ефективността на терапията, което изисква прецизна виртуална фенотипна интерпретация на генотипните данни. Генотипното тестване за лекарствена резистентност е наложен стандарт в клиничната практика, позволяващ подбор на подходящи терапевтични схеми, предотвратяване на натрупването на мутации и ограничаване на създаването на архивирани резистентни варианти [WHO, 2022].

Високата генетична изменчивост на HIV-1 и нарастващото разпространение на лекарствена резистентност, поставят сериозни предизвикателства пред устойчивостта на терапевтичните стратегии. Молекулярно-епидемиологичният анализ, включващ филогенетично реконструиране, датиране чрез молекулярен часовник и филодинамично моделиране, позволява проследяване на еволюционната история и пространствено-временната динамика на епидемията. Идентифицирането на трансмисионни кълъстери и мрежи чрез биоинформационни подходи като ClusterPicker, MicrobeTrace и BEAST дава възможност за по-прецизен епидемиологичен мониторинг и насочване на превантивните интервенции.

Прецизният молекулярен и епидемиологичен мониторинг е решаващ за адаптиране на клиничните стратегии и стратегиите за обществено здраве на национално ниво. Интегрираният анализ на резистентни мутации, субтипово разнообразие, филогенетични връзки и демографски корелации може да допринесе за персонализирането на терапията и разработването на национални стратегии за превенция на резистентност. В България систематичното изследване на молекулярната епидемиология на HIV-1 в периода 1989-2023 г., може да предоставя ценна информация за оптимизиране на терапевтичните стратегии и усъвършенстване на общественоздравната политика. Настоящото изследване е насочено към изпълнение на тази необходимост чрез цялостен молекулярно-епидемиологичен анализ, включващ комплексна характеристика на антиретровирусната резистентност, генетичното разнообразие, филогенетичните връзки и трансмисионните мрежи на HIV-1 инфекцията в България.

1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Анализът на съвременното състояние на знанията в областта на HIV-1 епидемиологията и антиретровирусната резистентност разкрива сложна и многопластова научна проблематика с критично значение за глобалното обществено здраве. Въпреки значителните постижения в разработването на ефективни терапевтични схеми и драматичното намаляване на смъртността от HIV/СПИН, възникването и разпространението на лекарствена резистентност представлява нарастваща заплаха за устойчивостта на постигнатите резултати.

Глобалната картина на HIV-1 епидемията се характеризира с изключително генетично разнообразие, включващо множество субтипове, и непрекъснато възникващи нови вирусни варианти. Това разнообразие, съчетано с регионалните различия в разпространението на специфични генетични форми, създава значителни предизвикателства пред диагностиката, лечението и превенцията на HIV инфекцията. Особено важно е влиянието на субтиповата принадлежност върху развитието на лекарствена резистентност, което варира значително между различни географски региони и популационни групи.

В контекста на Източна Европа, включително България, епидемиологичната ситуация се характеризира със специфични особености, свързани с преобладаването на определени субтипове, наличието на сложни рекомбинантни форми и специфични модели на предаване. Данни от международни изследвания показват вариабилност в нивата на трансмисионна лекарствена резистентност, което подчертава необходимостта от целенасочени национални проучвания за точна оценка на локалната ситуация.

Молекулярната епидемиология като научна дисциплина предоставя уникални възможности за задълбочено разбиране на динамиката на HIV-1 епидемията чрез интеграция на филогенетичен анализ, геномна характеристика и епидемиологични данни. Съвременните биоинформационни подходи за анализ на трансмисионни клъстери, реконструкция на еволюционната история и датиране на епидемични събития откриват нови перспективи за разбиране на механизмите на вирусно разпространение и за оптимизиране на превантивните стратегии.

Въпреки значителния напредък в глобалните усилия за контрол на HIV епидемията, все още съществуват съществени пропуски в познанията относно специфичните особености на епидемията в България. Необходими са цялостни анализи на генетичното разнообразие на циркулиращите HIV-1 варианти, детайлни изследвания на лекарствената резистентност, както и задълбочени филогенетични проучвания на еволюционната динамика и международните връзки на местната епидемия.

Тези пропуски в знанието имат пряко отражение върху възможностите за оптимизиране на терапевтичните стратегии, разработването на ефективни превантивни програми и формулирането на научно обоснована национална политика за контрол на HIV инфекцията. Особено важно е разбирането на трансмисионните мрежи и клъстери, които могат да очертаят приоритетите в превантивните интервенции и да осигурят насоки за таргетиране подходи към специфични рискови групи.

В светлината на тези съображения, необходимостта от цялостно и систематично изследване на молекулярната епидемиология и антиретровирусната резистентност на HIV-1 в България се очертава като критично важен научен приоритет. Такова изследване следва да интегрира съвременни методологични подходи за генетично характеризиране,

филогенетичен анализ, изследване на резистентни мутации и епидемиологично моделиране, с цел създаване на цялостна картина на местната епидемия и нейните специфични характеристики.

Резултатите от подобно комплексно проучване биха имали съществено приложение в клиничната практика чрез оптимизиране на терапевтичните решения, в областта на общественото здраве – чрез информиране на превантивните стратегии, и в научната общност – чрез принос към глобалното разбиране на еволюционната динамика на HIV-1. Освен това, такова изследване би осигурило необходимата научна основа за адаптиране на международните препоръки към специфичните условия на българската епидемиологична ситуация.

2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

ЦЕЛ

Провеждане на комплексен анализ на молекулярната епидемиология и антиретровирусната резистентност на HIV-1 в България чрез интегриран подход, включващ генотипизиране, филогенетичен анализ, характеризиране на резистентни мутации, изследване на трансмисионни мрежи и филодинамично моделиране, с цел оптимизиране на терапевтичните стратегии и усъвършенстване на политиките в областта на общественото здраве.

ЗАДАЧИ

I. АНТИРЕТРОВИРУСНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И МУТАЦИОННИ ПРОФИЛИ

1. Характеристика на антиретровирусната резистентност.
2. Идентифициране и класифициране на мутации, асоциирани с резистентност към PI, NRTI и NNRTI.
3. Анализ на многобройни резистентни мутации и тяхното кумулативно въздействие върху ефективността на терапията.
4. Изследване на кръстосана резистентност в рамките на класовете антиретровирусни медикаменти.
5. Фенотипна интерпретация на резистентните мутации и прогнозиране на терапевтичния отговор.

II. МОЛЕКУЛЯРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ И ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ

6. Комплексно секвениране и филогенетичен анализ на pol гена при HIV-1 изолати от лица, диагностицирани в България между 1989-2023 г.
7. Детайлно дефиниране и анализ на разпространението на HIV-1 субтипове, циркулиращи и уникални рекомбинантни форми в българската популация.
8. Идентифициране и характеризиране на нови или редки HIV-1 варианти и рекомбинантни форми, които са въведени и разпространени в страната.
9. Молекулярно характеризиране на еволюционните връзки между различните HIV-1 изолати.
10. Анализ на разпространението и еволюционна динамика на основните циркулиращи субтипове.

III. ЕПИДЕМИОЛОГИЧНА ДИНАМИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ

11. Реконструкция на филогенетични дървета чрез максимална правдоподобност и Байесови методи за основните субтипове.
12. Филодинамичен анализ и датиране на въвеждането на основните HIV-1 субтипове в България чрез молекулярен часовник.
13. Анализ на пространствено-времевата еволюция, географското разпространение и международния произход на HIV-1 субтипове в България чрез глобален филогенетичен подход.
14. Идентифициране и характеризиране на филогенетични трансмисионни клъстери.
15. Изследване на трансмисионните мрежи и динамиката на разпространение между различни уязвими групи.

IV. ДЕМОГРАФСКИ И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ КОРЕЛАЦИИ

16. Изследване на връзката между мутации, свързани с лекарствена резистентност, и демографските характеристики на инфектираните лица.
17. Изследване на разпределението на HIV-1 субтипове и лекарствена резистентност по трансмисионни категории и уязвими групи.
18. Анализ на географското разпределение на HIV-1 субтипове и мутации, свързани с лекарствена резистентност, в различните региони на България.
19. Анализ на времевите тенденции в разпространението на първична резистентност при HIV-1 през изследвания период.

V. КЛИНИЧНИ ПРИЛОЖЕНИЯ И ПРЕВАНТИВНИ СТРАТЕГИИ

20. Оценка на клиничното значение на идентифицираните мутации, свързани с резистентност, за избора на антиретровирусна терапия.
21. Оценка на националните практики за мониторинг на лекарствена резистентност при HIV-1 и формулиране на стратегически насоки за ограничаване разпространението на резистентни щамове сред уязвими популации.

3. РЕЗЮМЕ НА МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Изследвана популация и биологичен материал

През продължителния период на наблюдение, обхващаш настоящото изследване от януари 1986 година до декември 2023 година, в Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV (НРПЛ по HIV) са регистрирани общо 4277 лица с диагностицирана HIV/СПИН инфекция. Анализът на демографските характеристики на тази кохорта разкрива ясно изразена полова диспропорция: 3411 лица (79,8%) от мъжки пол и 866 индивида (20,2%) от женски пол. Тази асиметрия отразява специфичните особености на HIV-1 епидемията в България и кореспондира с наблюдаваните тенденции в повечето европейски страни с ниска до умерена превалентност на инфекцията.

Към декември 2023 година 2312 лица с диагностицирана HIV инфекция са включени в активно лечение с антиретровирусна терапия (ART), което свидетелства за развитието на терапевтичните възможности и подобряването на достъпа до лечение в страната.

Анализът на пътищата на предаване демонстрира следното разпределение: хетеросексуален път - 2085 случая (48,7%); мъже, практикуващи секс с мъже (MSM) - 1447 случая (33,8%); интравенозни наркотици (ИВН) - 624 случая (14,6%); смесена категория MSM+ИВН - 61 случая (1,4%); хемофилия - 19 случая (0,4%); вертикална трансмисия - 41 случай (1%).

В рамките на молекулярно-генетичния анализ са успешно секвенирани фрагменти от *pol* гена на HIV-1 от 1654 индивида (38,9% от общия брой), отговарящи на критерия за вирусен товар >1000 копия/мл. Демографският профил на тази подгрупа включва 1396 мъже (84,4%) и 258 жени (15,6%), с възрастов диапазон от 13 до 78 години (средна възраст 34,2 години). По географски произход на инфекцията: 1369 лица (82,8%) са придобили инфекцията в България, 285 случая (17,2%) в чужбина.

Биологичният материал е събиран чрез стандартизирана венепункция в ЕДТА вакутейнери. Плазмата е отделена чрез центрофугиране при 3000 rpm (3750 RCF) за 10 минути при 18°C в ламинарен бокс клас II и съхранена при -80°C. Изследването е одобрено от Комисията по етика към НЦЗПБ (протокол № 1 от 05.02.2024 г., IRB 00006384) в съответствие с Наредба № 5/2013 г. и Наредба № 47/2009 г.

3.2. Молекулярно-генетичен анализ

Внедряването на генотипирането на HIV-1 в НРПЛ по HIV през 2002 година маркира началото на ерата на персонализираната антиретровирусна терапия в България. Технологичната еволюция включва последователното въвеждане на: еднокапилярен секвенатор ABI 310 с ViroSeq система (2002); 12-позиционен секвенатор с TRUGENE система (2005); 16-капилярен ABI 3130xL (2014); 24-капилярен ABI 3500xL (2019), представляващ най-съвременната технология за рутинно генотипиране на HIV-1.

Секвенирането на критичните региони PR (протеаза) и RT (обратна транскриптаза) от *pol* гена е осъществено чрез две основни платформи с различни аналитични характеристики:

TRUGENE система (Siemens): Характеризира се с минимален вирусен товар >1000 копия/мл. РНК екстракцията се извършва с QIAamp® Ultra Sens™ Virus Kit от 1000 µL плазма с финална елуция в 60 µL. Едностъпковият процес включва обратна транскрипция и PCR амплификация с M-MLV обратна транскриптаза, следван от CLIP секвениране с 30 цикъла, използвайки флуоресцентно белязани праймери и ddNTP терминатори. Електрофорезата се извършва на OpenGene секвенатор със SureFill 6% акриламидни гелове. Геномното покритие обхваща протеаза позиции 1-99 и RT позиции 40-247.

ViroSeq система (Abbott): Изисква минимален вирусен товар >2000 копия/мл. РНК екстракцията се осъществява чрез алкохолна преципитация от 500 µL плазма. PCR амплификацията включва 40 цикъла с AmpliTaq Gold полимеразата, генериращи 1,8 kb продукт. Секвенирането използва BigDye терминатори със седем праймера за пълно покритие, следвано от капилярна електрофореза на ABI секвенатори с POP-7 полимер. Геномното покритие е по-обширно: протеаза позиции 1-99 и RT позиции 1-335.

Биоинформационният анализ включва подравняване към HXB2 референтна секвенция, систематичен контрол на качеството и автоматизирана идентификация на мутации чрез специализирани софтуери.

3.3. Анализ на антиретровирусна резистентност

Анализът на резистентността към антиретровирусни препарати е извършен със Stanford HIV Drug Resistance Database (HIVDB) алгоритъм Version 9.5.1, който представлява експертна система за прогнозиране на терапевтичния отговор въз основа на генотипни данни. Алгоритъмът оценява степента на активност на медикаментите срещу конкретни вирусни изолати в сравнение с референтния див тип чрез система от наказателни точки за всяка резистентна мутация.

Класификацията включва пет нива на резистентност с прогностично значение: чувствителен (<10 точки) - отсъствие на намалена чувствителност; потенциално ниско ниво (10-14 точки) - мутации от предишна терапевтична експозиция или подкрепящи мутации; ниско ниво (15-29 точки) - мутации с демонстрирана намалена чувствителност *in vitro*; средно ниво (30-59 точки) - вероятно намалена активност при запазване на антивирусен ефект; високо ниво (≥60 точки) - максимални нива на резистентност или документирана липса на вирусологичен отговор.

Мутациите са систематично категоризирани като: главни мутации, носещи 30-60 наказателни точки с преобладаващ принос за резистентност; допълнителни мутации - неpolиморфни варианти, усилващи резистентността синергично с главни мутации; други мутации - polиморфни варианти с минимален или отсъстващ ефект.

Контролът на качеството включва многопараметричен анализ: смесени нуклеотидни позиции с IUPAC кодове; структурни аномалии (инсерции, делеции, frameshift мутации, преждевременни стоп кодони); APOBEC3G/3F-медиран G→A хипермутации; необичайни мутации с честота <0.01% в HIV-1 група M. Алгоритъмът интегрира 9723 възможни комбинационни модела за PI резистентност и 8268 за RT резистентност, осигурявайки всеобхватна оценка на сложните мутационни взаимодействия.

3.4. Филогенетичен и филодинамичен анализ

Комплексният филогенетичен анализ обхваща 1654 секвенции от pol гена и включва многостъпков процес: качествен контрол, анализ на резистентни мутации, субтипироване, рекомбинантен анализ, множествоно подравняване, филогенетична реконструкция, филодинамичен анализ и характеризиране на трансмисионни клъстери.

Субтипирането е осъществено чрез множествени интернет-базирани инструменти: COMET v2.4 (контекстуално базиран модел включващ всички чисти субтипове и 118 циркулиращи рекомбинантни форми (CRFs)); REGA v3.46 (класически филогенетичен анализ с 47 CRFs); jpHMM (jumping profile Hidden Markov Model за прецизен рекомбинантен анализ); RIP 3.0 (sliding window анализ за идентификация на рекомбинантни точки).

Подравняването на секвенциите е диференцирано според размера и броя на секвенциите (datasets): големи набори секвенции (>500 секвенции) с MAFFT v7 използвайки FFT-NS-2 стратегия за оптимална скорост и точност; малки datasets (<500 секвенции) с AliView v1.28 и MUSCLE алгоритъм за максимална прецизност. Процесът включва итеративно редактиране до постигане на оптимални подравнявания.

Филогенетичната реконструкция комбинира Maximum Likelihood методи: IQ-TREE v1.6.11 с ultrafast bootstrap и автоматичен ModelFinder за избор на оптимални еволюционни модели; FastTree v2.1.10 за approximate ML анализ на големи datasets с GTR+CAT модел. Филогенетичният сигнал е оценен чрез likelihood mapping (TreePuzzle 5.3) с 10,000 случайни квартета, а времевият сигнал чрез root-to-tip корелационен анализ (TempEst v1.5.1).

Байесовата филогенетика е осъществена с BEAST v1.8.3, използвайки HKY+G модел с емпирични нуклеотидни честоти. Сравнени са constant size и Bayesian Skyline Plot демографски модели в комбинация със strict и relaxed (lognormal) молекулярни часовници. MCMC конвергенцията е постигната след 1.5 милиарда генерации с ESS >200.

3.5. Анализ на трансмисионни клъстери

Филогенетичните клъстери представляват монофилетични групи от генетично сродни вирусни секвенции, индикиращи скорошен общ еволюционен произход и потенциални епидемиологични връзки. Тяхното идентифициране е критично за разкриване на динамиката на вирусното предаване и формулиране на насочени интервенции в общественото здраве.

ClusterPicker осъществява автоматизирано идентифициране на генетично свързани клъстери според строги биологично обосновани критерии: максимална обща дължина на разклоненията между всяка двойка секвенции в клъстера под прагова стойност (dmax: 0.01-0.05 нуклеотидни заместители на позиция) и минимална bootstrap поддръжка за родителското разклонение (bmin: 90-95%). Всеки валиден клъстер конституира монофилетична група с общ предшественик и всички негови потомствени секвенции.

MicrobeTrace представлява иновативна платформа за мрежов анализ, интегрираща молекулярни и епидемиологични данни за всеобхватно изследване на трансмисионните мрежи. Използва се Tamura-Nei еволюционен модел с прагово генетично разстояние от 1.5% за идентифициране на скорошни трансмисионни събития. Платформата генерира интерактивни мрежови визуализации, където всяка секвенция е представена като възел, свързан с генетично сродни секвенции чрез ребра с вариабилни характеристики.

Анализът интегрира многомерни демографски и клинични данни: възраст, пол, географска локализация, рискова категория, CD4+ клетъчен брой, вирусен товар за идентифициране на корелации между клъстерна принадлежност, трансмисионна резистентност и популационни характеристики. Приложена е усъвършенствана система за цветно кодиране и морфологична диференциация за визуално разграничаване на HIV-1 субтипове, резистентни профили и трансмисионни категории.

BEAST анализът осигурява времево датиране на клъстерното възникване чрез коалесцентни модели, позволявайки реконструкция на хронологичната последователност на епидемичните събития и идентифициране на периоди с интензифицирана трансмисия.

3.6. Статистически анализ и представителни публикации

Статистическият анализ на асоциациите между резистентни мутации и епидемиологични детерминанти е осъществен чрез точния критерий на Fisher, имплементиран в SAS 9.4 и GraphPad софтуерни платформи. Този непараметричен тест е избран поради оптималната му приложимост за анализ на категорийни променливи при ограничени размери на подгрупите. Изследваните епидемиологични характеристики включват: пол, възраст, страна на произход, вероятна локализация на заразяването, вирусен субтип и рискова категория за предаване.

За контрол на множественото тестване е приложена корекция на Bonferroni с коригирано ниво на значимост $\alpha=0.01$ за петте променливи в субтиповата категоризация, осигурявайки строг контрол над кумулативната грешка от тип I и повишавайки надеждността на статистическите заключения.

Описаните методологични подходи са валидирани и приложени в серия от научни публикации с висок импакт фактор, демонстриращи тяхната ефективност и научна стойност:

Филогеографският анализ на ИВН популацията обхваща 117 проби от CRF01_AE и CRF02_AG щамове с байесово датиране чрез BEAST за реконструкция на въвеждането и разпространението. Анализът на субтип В при хетеросексуалната популация включва 322 проби (2002-2012) с Bayesian Skyline Plot модел за демографска история. Интегрираното изследване на субтип В епидемията анализира 663 секвенции (1988-2018) с акцент върху трансмисионни клъстери и резистентност. CRF01_AE филодинамичният анализ обхваща 270 секвенции (1995-2019) с Nextstrain TreeTime подход. Коалесцентният анализ на субтип С включва 37 секвенции (1986-2017) с максимално пестелива реконструкция на генния поток. Най-мощното изследване на трансмисионната резистентност при наивни пациенти (2012-2020) използва MicrobeTrace за характеризиране на трансмисионните мрежи.

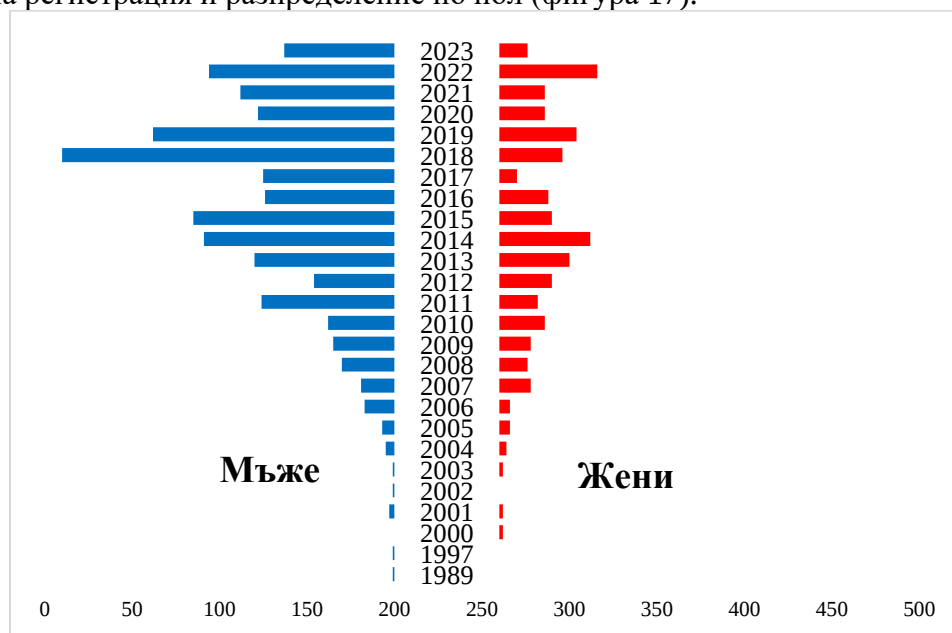
Генерираните секвенции са депозирани в GenBank, осигурявайки достъпност за международната научна общност и принос към глобалното разбиране на HIV-1 молекулярната епидемиология.

4 РЕЗУЛТАТИ

4.1 Изследвани материали и демография

Разпределение по пол

В настоящото проучване успешно са секвенирани и анализирани фрагменти от *pol* ген на HIV-1, изолирани от кръвни проби от 1654 лица с HIV-1 инфекция, регистрирани между януари 1989 г. и декември 2023 г., с вирусен товар над 1000 копия/мл. От тях, 1396 (84,4%) са мъже и 258 (15,6%) жени, което демонстрира значително полово разпределение в изследваната популация. Данните включват ключови променливи, като година на регистрацията и разпределение по пол (фигура 17).



Фигура 1. Диаграма на изследваните лица по пол и година на диагностициране на HIV.

Анализът разкри динамични изменения в броя на регистрираните случаи сред различните категории. В началните години на изследвания период, броят на мъжете и жените е сравнително сходен, като през 1989 г. са регистрирани по един случай при мъжете и при жените. С течение на времето обаче броят на мъжете значително нараства в сравнение с този на жените. Броят на мъжете достига връх от 190 през 2018 г., след което намалява до 63 през 2023 г. Жените показват по-стабилна тенденция с плавно увеличение през годините, достигайки пик от 56 през 2022 г., а през 2023 г. техният брой намалява до 16. Повишеният брой мъже вероятно се дължи на различията в пътищата на придобиване на инфекцията. При мъжете освен хетеросексуален контакт и употреба на венозни наркотици, значителна част от случаите са свързани със секс на мъже, които правят секс с мъже (MSM).

През наблюдавания период се наблюдават ясно изразени върхове и спадове в броя на регистрираните случаи, както при мъжете, така и при жените. Например, докато при мъжете най-високият брой случаи се отчита през 2018 г., то при жените пикът е през 2022 г. Тези различия предполагат потенциално влияние на епидемиологични и социални фактори върху разпространението на инфекцията.

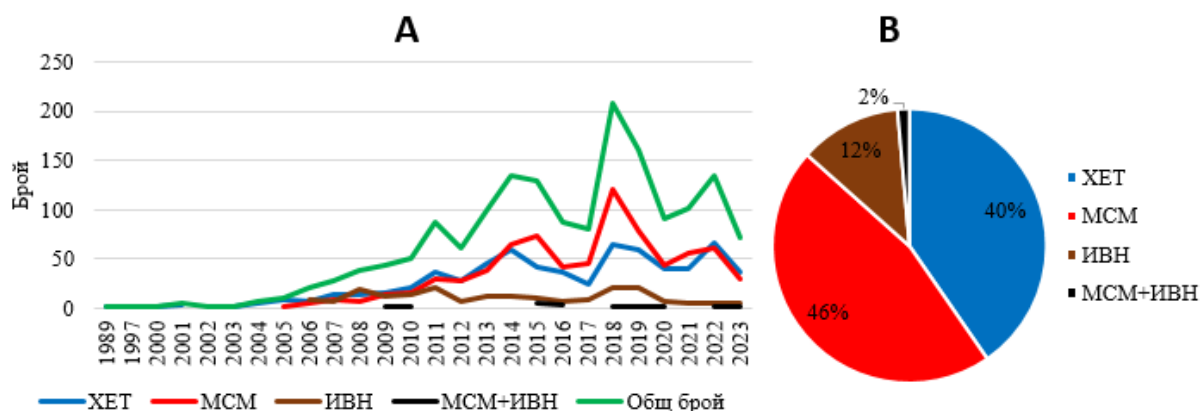
Динамиката в броя на регистрираните случаи подчертава значението на половите различия и времевите тенденции за по-добро разбиране на разпространението на HIV-

1 инфекцията. Тези резултати предоставят основа за по-задълбочени анализи и стратегическо планиране на интервенции, които да бъдат насочени към ефективен контрол на епидемията.

Трансмисионна категория

По данни на изследваните лица в системата за самоопределяне и самооценка по време на диагностичния процес, 762 (46,1%) от пробите са от лица, които са съобшили, че вероятният път на придобиване на инфекцията е посредством секс на мъже с мъже (МСМ), 670 (40,5%) са ХЕТ, 199 (12,0%) са употребявали интравенозни наркотици (ИВН) и 23 (1,4%) са мъже, които са правили секс с мъже и също така са употребявали интравенозни наркотици (МСМ+ИВН) (фигура 2 А и В).

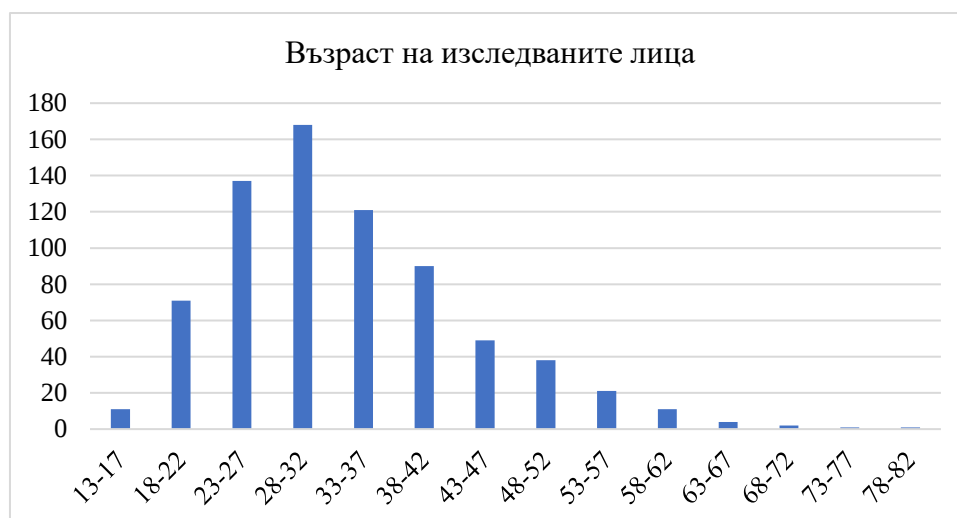
Анализът на трансмисионните категории показва динамични промени в разпределението на пътищата на предаване на инфекцията. През периода от 1989 до 2023 година се наблюдава намаляване на относителния дял на ХЕТ от 100% в началните години до 50,7% през 2023 г. Същевременно, дялът на МСМ нараства от 0% до 40,8%, като достига връх от 57,7% през 2017 и 2018 г. ИВН като категория варира значително, достигайки 45% през 2006 г., но намалява до 7% през 2023 г. Комбинираната категория МСМ+ИВН остава сравнително ниска през целия период, с максимална стойност от 5% през 2013 г.



Фигура 2. Диаграма на изследваните лица. (А) Трансмисионна категория и година на диагностициране. (В) Трансмисионна категория.

Възраст на изследваните лица

Анализът на възрастта при диагностициране показва значителна изменчивост сред изследваните лица. Най-младият пациент е диагностициран на 13 години, а най-възрастният на 78 години, със средна възраст от 34,2 години. Разпределението на възрастта показва концентрация в млада и средна възрастова група, като значителен брой случаи се наблюдават в диапазона от 20 до 40 години. Тези данни подчертават важността на фокусирани интервенции за превенция и ранно откриване сред по-младите и сексуално активни възрастови групи (фигура 3). В изследването не са включени новороден деца с HIV инфектирани по вертикален път на трансмисия.



Фигура 3. Диаграма на изследваните лица по възраст при диагностициране с HIV.

Страна на произход на изследваната популация

Анализът на страната на произход на инфектираните показва, че от всички изследвани, 1588 (96%) са български граждани, а останалите 66 (4%) са чуждестранни граждани от различни страни на света, регистрирани в страната. Най-голям дял сред чуждестранните граждани имат лицата от Германия (37 случая), Испания (26 случая), и Обединеното кралство (19 случая). Също така, 33 лица са съобщили за повече от една възможна страна на произход. Сред другите представени страни са Гърция (15 случая), Италия (13 случая), Франция (12 случая), и Украйна (12 случая). По-малки групи са регистрирани от САЩ (9 случая), Русия (7 случая), Нидерландия (5 случая), и Кипър (4 случая).

Тези данни отразяват разнообразие в произхода на изследваните лица и подчертават важността на прилагане на подходи, които отчитат културните и социалните специфики на различните групи. Наличието на значителен дял от български граждани (96%) потвърждава основния принос на местната популация в епидемиологичния профил на HIV инфекцията в страната, докато малкото, но разнообразно присъствие на чуждестранни граждани подсказва значението на мобилността и трансграничното предаване на HIV за разпространение на инфекцията (таблица 1).

Таблица 1. Страна на произход на изследваните лица.

Страна на произход на инфекцията	Брой	%	Страна на произход на инфекцията	Брой	%
България	1588	96,01	Зимбабве	1	0,06
Украйна	11	0,67	Ирак	1	0,06
Руска федерация	7	0,42	Испания	1	0,06
Италия	3	0,18	Йемен	1	0,06
Камерун	3	0,18	Казахстан	1	0,06
Македония, F. YR	3	0,18	Кения	1	0,06
Кот д'Ивоар	3	0,18	Конго	1	0,06
Великобритания	2	0,12	Куба	1	0,06
Молдова	2	0,12	Молдова/България	1	0,06
Португалия	2	0,12	Нигерия	1	0,06
Румъния	2	0,12	Полша	1	0,06
Сирия	2	0,12	Сомалия	1	0,06
Австралия	1	0,06	Судан	1	0,06
Англия	1	0,06	Танзания	1	0,06
Армения	1	0,06	Того	1	0,06
Бразилия	1	0,06	Тунис	1	0,06
Гана	1	0,06	Турция	1	0,06
Германия	1	0,06	Франция	1	0,06
Гърция	1	0,06	Холандия	1	0,06

Вероятна страна на инфектиране на изследваната популация

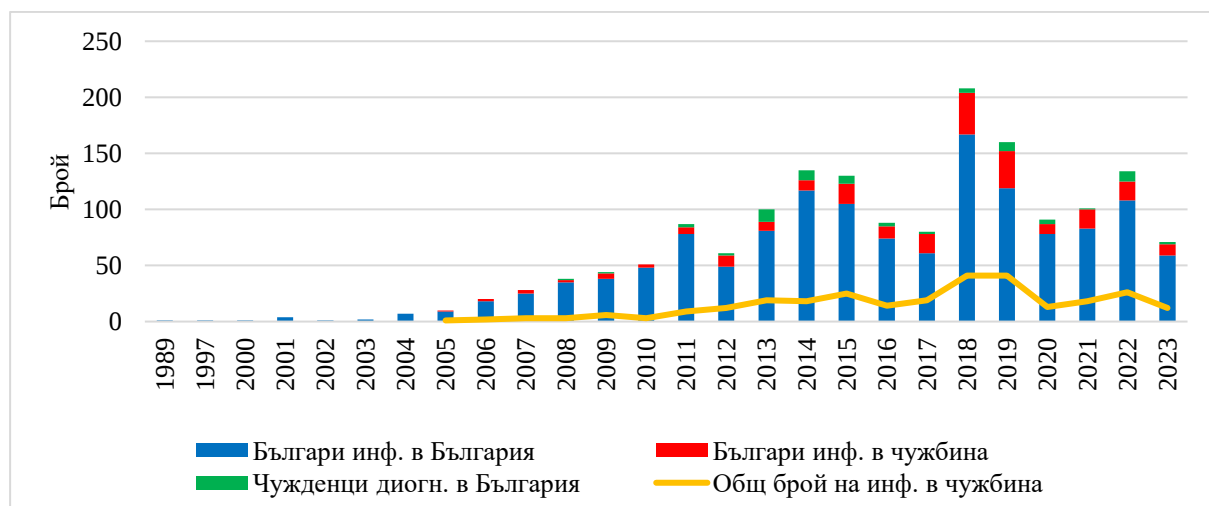
Анализът на страната на придобиване на HIV инфекцията показва, че по данни на изследваните лица в системата за самоотчитане и самооценка, 1369 (82,8%) от тях са инфектирани в България, а 285 (17,2%) са придобили инфекцията в друга държава от света. Някои от участниците в изследването са посочили повече от една страна или континент. България заема водещо място като страна на придобиване с 1588 (96,01%) от случаите. Сред чуждестранните държави с най-голям брой регистрирани случаи са Украйна (11 случая, 0,67%), Руската федерация (7 случая, 0,42%), Италия, Камерун, Македония и Кот д'Ивоар (всяка с по 3 случая, 0,18%). По два случая (0,12%) са регистрирани за Великобритания, Молдова, Португалия, Румъния и Сирия. Останалите държави, включително Германия, Гърция, Испания и Франция, имат по един случай или по-малко (0,06%).

Тези данни илюстрират значителния дял на инфекциите, придобити на територията на България, но също така подчертават ролята на международните връзки и мобилността в разпространението на HIV. Необходимо е по-задълбочено проучване на миграционните модели и социалните фактори, които допринасят за предаването на инфекцията, особено сред лица, пребивавали в чужбина или посочили повече от една възможна страна на придобиване (таблица 2 и фигура 4).

Таблица 2. Вероятна страна на придобиване на инфекцията с HIV.

Държава	брой	%	Държава	брой	%	Държава	брой	%
България	1390	84,0	Китай	2	0,1	Кения	1	0,1
Германия	37	2,2	Молдова	2	0,1	Конго	1	0,1
Повече от една възможни страна	35	2,1	Обединени арабски емирства	2	0,1	Куба	1	0,1
Испания	26	1,6	Румъния	2	0,1	Либия	1	0,1
Великобритания	19	1,1	Сирия	2	0,1	Малта	1	0,1
Гърция	15	0,9	Сърбия	2	0,1	Нова Зеландия	1	0,1
Италия	13	0,8	Танзания	2	0,1	Полша	1	0,1
Украйна	12	0,7	Южна Африка	2	0,1	Португалия	1	0,1
Франция	12	0,7	Австралия	1	0,1	Република Южна Африка	1	0,1
САЩ	9	0,5	Австрия	1	0,1	Словакия	1	0,1
Русия	7	0,4	Австрия, Унгария	1	0,1	Сомалия	1	0,1
Холандия	5	0,3	Армения	1	0,1	Судан	1	0,1
Кипър	4	0,2	Африка	1	0,1	Тайланд	1	0,1
Северна Македония	4	0,2	Белгия	1	0,1	Того	1	0,1
Камерун	3	0,2	Бразилия	1	0,1	Тунис	1	0,1
Кот д'Ивоар	3	0,2	Гана	1	0,1	Турция	1	0,1
Нигерия	3	0,2	Доминиканска република	1	0,1	Унгария	1	0,1
Турция	3	0,2	Египет	1	0,1	Швеция	1	0,1
Англия	2	0,1	Замбия	1	0,1	Шотландия	1	0,1
Великобритания	2	0,1	Зимбабве	1	0,1	Япония	1	0,1
Израел	2	0,1						

Забележка: Някои от лицата са посочили повече от една страна, в която са били изложени на риск от инфекция с HIV.



Фигура 4. Вероятна страна на придобиване на инфекцията по години на диагностициране.

Разпределение по региони в страната по постоянен адрес

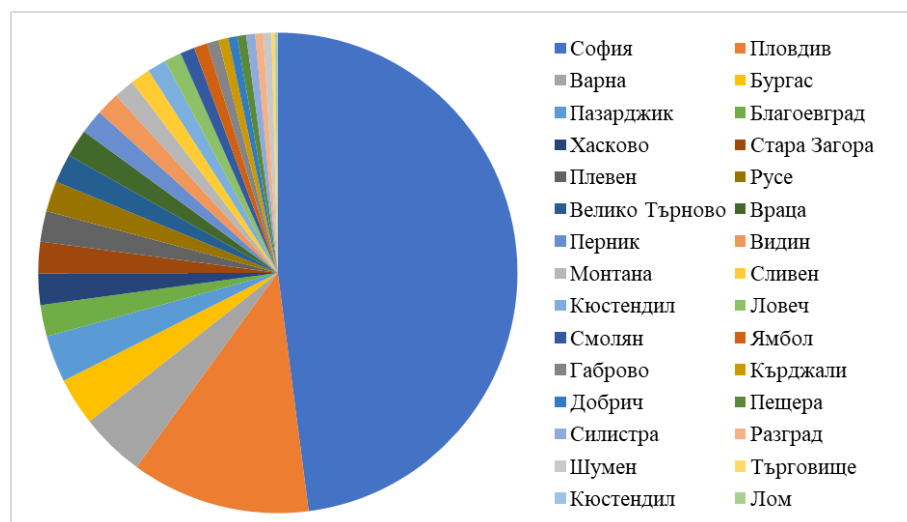
Анализът на регионалното разпределение на лицата с HIV в страната, базиран на постоянния адрес на регистрация, показва неравномерно разпределение между областите. Най-голям брой случаи са регистрирани в четири от областите с най-големи градове. С доминиращо присъствие се откроява област София (включително София-град) със 793 (47,9%) души, следвана от Пловдив с 200 (12,1%), Варна с 72 (4,4%) и Бургас с 53 (3,2%).

Освен тези области, значителен брой случаи са отчетени и в Пазарджик (3,1%), както и в областите Благоевград, Хасково, Стара Загора, Плевен и Русе (всяка с по 2,1%). Най-ниски стойности са регистрирани в Лом (1 случай, 0,1%) и други малки области като Разград, Шумен и Търговище (всяка с под 0,5%).

Важно е да се отбележи, че данните за постоянния адрес на регистрация не винаги отразяват настоящото местоживее на изследваните лица. Това ограничава анализа по отношение на точната географска локация на разпространение на инфекцията. Тези данни подчертават концентрацията на случаи в големите урбанизирани центрове и подчертават значението на демографските и социално-икономическите фактори, които влияят върху епидемиологичния профил на HIV в страната (таблица 3 и фигура 5).

Таблица 3. Географски регион в страната по постоянен адрес при диагностициране.

Регион	Брой	%	Регион	Брой	%
София	793	47,9	Сливен	22	1,3
Пловдив	200	12,1	Кюстендил	21	1,3
Варна	72	4,4	Ловеч	19	1,1
Бургас	53	3,2	Смолян	16	1,0
Пазарджик	52	3,1	Ямбол	15	0,9
Благоевград	35	2,1	Габрово	13	0,8
Хасково	35	2,1	Кърджали	11	0,7
Стара Загора	35	2,1	Добрич	10	0,6
Плевен	34	2,1	Пещера	10	0,6
Русе	34	2,1	Силистра	10	0,6
Велико Търново	32	1,9	Разград	9	0,5
Враца	31	1,9	Шумен	9	0,5
Перник	27	1,6	Търговище	4	0,2
Видин	26	1,6	Кюстендил	2	0,1
Монтана	23	1,4	Лом	1	0,1



Фигура 5. Регион в страната по постоянен адрес при диагностициране на HIV.

Данните от регистрацията показват, че 346 (20.9%) от пациентите, са имали поне една друга сексуално преносима инфекция, установена в миналото или по време на диагностицирането на HIV. На допълнителен риск от инфекция са били изложени 49 (3.0%) лица, които са извършвали сексуални услуги срещу заплащане, а 83 (5.0%) души са съобщили, че са били лишени от свобода и са били в затвор. 102 (6.2%) от инфекциите

са идентифицирани при кръводаряване, а 43 (16,7) жени са диагностицирани с HIV по време на тяхната бременност.

4.2. Анализ на резистентни мутации

За анализ на резистентните мутации и тяхното фенотипно отражение върху терапията беше използван световно признатият стандарт - онлайн приложението на Stanford University - HIVDB. Използваният алгоритъм е Version 9.5.1, актуализиран на 5 ноември 2023 г., което гарантира висока точност и съвременност на анализа.

В HIVDB са въведени три различни алгоритъма за анализ на резистентност, всеки от които служи за специфични цели:

1. **HIVDB Program** – стандартен инструмент за клиничен анализ на резистентност, който се използва за диагностика и оптимизиране на антиретровирусната терапия.
2. **Calibrated Population Resistance Tool (CPR)** – известен също като Surveillance Drug Resistance Mutations (SDRM), този алгоритъм е предназначен за наблюдение и оценка на ТЛР. Той изключва естествени полиморфизми, за да осигури по-точни данни за предавани мутации.
3. **Stanford (nonpolymorphic treatment-selected mutations)** – инструмент с минимални разлики от стандартизирания HIVDB Program, предназначен за научни изследвания.

В това проучване, за анализа бяха използвани първите секвенции, генерирани от изследваните пациенти, като общият брой секвенирани проби е 1654. От тях 892 пациенти (53,9%) са били наивни, т.е. нелекувани с антиретровирусни медикаменти към момента на вземане на пробата. Това е важен аспект, който предоставя информация за резистентност при пациенти, които не са били изложени на терапия, и съответно служи като основа за разбиране на трансмисионната резистентност.

Поради различията в подходите на трите алгоритъма, всяка секвенция беше анализирана с всички инструменти. За целите на нашия анализ обаче, в окончателните резултати приложихме алгоритъма, използван за клинични цели (HIVDB Program). Този методичен подход осигурява цялостен и изчерпателен анализ на мутационните профили.

Анализ на резистентността при HIV с използване на HIVDB

Stanford HIVDB използва точкова система за оценка на резистентността, като на всяка мутация се присъждат наказателни точки, базирани на експериментални данни и клинични проучвания. Общата оценка за резистентност към даден медикамент се получава чрез сумиране на точките за всички идентифицирани мутации.

Модел за оценка на резистентността

Системата отчита пет различни нива на лекарствена резистентност, всяко от които отразява степента на намалената чувствителност на вируса към антиретровирусната терапия. Нивото „чувствителен“ се определя при по-малко от 10 наказателни точки, когато вирусът запазва пълната си чувствителност към медикамента. Ако сумата на наказателните точки е между 10 и 14, резистентността се категоризира като „потенциално ниска“, което означава, че наличните мутации могат да повлияят на ефикасността на терапията, но не в значителна степен. При стойности между 15 и 29 точки, вирусът демонстрира „ниско ниво на резистентност“, което може да доведе до частично намалена ефективност на терапията. „Средно ниво на резистентност“ се наблюдава при 30-59 наказателни точки, когато вирусът значително намалява

чувствителността си към медикамента, но терапията все още може да бъде частично ефективна. „Високо ниво на резистентност“ настъпва при 60 или повече наказателни точки, което означава пълна или почти пълна загуба на ефективност на лекарството.

Алгоритъм за анализ на резистентни мутации

HIVDB използва сложен алгоритъм за анализ на различните модели на мутации, наречени DRM pattern scores. В този модел, комбинациите от мутации се анализират чрез присъщите им наказателни точки, като се изследва тяхното комбинирано въздействие върху резистентността към конкретни медикаменти. Например, мутациите L74I/V и M184I/V поотделно допринасят с 30 и 15 наказателни точки спрямо абакавир (ABC), докато тяхната комбинация води до кумулативна стойност от 60 точки, което съответства на високо ниво на резистентност към медикамента. При протеазни инхибитори (PI), например, комбинацията от мутациите M46I/L, I54V и V82A води до значителна загуба на чувствителност към лопинавир/г (LPV/r) със сумирано наказание от 65 точки. В допълнение към това, когато на една и съща позиция се наблюдават различни мутации, се взема предвид тази, която има най-голямо въздействие върху лекарствената резистентност.

Фенотипни и генотипни аспекти

Фенотипните анализи *in vitro* показват, че някои мутации могат да доведат до намалена вирусна репликация. Това има важно значение при определяне на дългосрочната ефективност на терапията. Генотипните анализи разкриват кои мутации са селектирани в резултат на предишно лечение и как те повлияват на бъдещите терапевтични опции.

Някои мутации могат да доведат до повишена чувствителност към определени медикаменти. Например, M184I/V намалява резистентността на вируса към зидовудин (AZT) и тенофовир (TDF), което се отразява чрез присвояване на -10 наказателни точки за тези медикаменти. Този аспект е от значение при ротацията на терапевтичните режими с цел постигане на оптимален вирусологичен отговор.

Оценка на качеството на секвенциите

По време на анализа на генотипната резистентност се извършва оценка на качеството на секвенциите по различни параметри. Геномното покритие се оценява въз основа на позициите на първата и последната база от анализирания фрагменти, като се използва референтната секвенция на HIV-1. Изследва се процентът на смесените нуклеотидни позиции, включително транзиции и трансверсии. Анализът включва също идентифициране на рамкови измествания при разчитане на генома, инсерции, делеции, наличие на стоп-кодони и мутации, свързани с APOBEC-медирана хипермутация.

Класификация на резистентните мутации

Резистентните мутации се класифицират според тяхното влияние върху лекарствената чувствителност. Полиморфните мутации се срещат и при нелекувани пациенти и обикновено имат слаб ефект върху резистентността. За разлика от тях, непалиморфните резистентни мутации се появяват под натиска на антиретровирусното лечение и са свързани с клинично значима резистентност. Фенотипните мутации от своя страна могат да имат пряко влияние върху нивото на резистентност, особено когато се комбинират с други мутации.

Мутациите в гените, кодиращи протеаза (PR) и обратна транскриптаза (RT), се разделят на три основни подгрупи. Основните мутации, свързани с резистентност, обикновено имат най-силно въздействие върху лекарствената чувствителност и се

оценяват с високи наказателни стойности (30–60 точки). Допълнителните мутации сами по себе си не причиняват резистентност, но могат да засилят ефекта на главните мутации. „Други“ мутации представляват варианти без пряко влияние върху резистентността, но могат да бъдат селектирани в присъствието на терапевтични медикаменти.

HIVDB предоставя стандартизиран метод за анализ на резистентността чрез детайлна точкова система, което позволява надеждна интерпретация на генетичния профил на вируса. Чрез включването на фенотипни, генотипни и биоинформатични анализи, системата подпомага вземането на информирани терапевтични решения и оптимизирането на антиретровирусната терапия. Оценката на резистентността е от съществено значение за поддържането на ефективността на лечението, намаляването на вероятността за терапевтичен неуспех и ограничаването на разпространението на резистентни щамове.

4.2.1. Анализ на резистентните мутации при различни категории от изследваната популация

Анализът на разпределението на HIV-1 субтиповете и резистентността към антиретровирусна терапия сред изследваната популация разкрива важни различия между категориите, като в някои случаи се установяват статистически значими разлики (таблица 4). За статистическата обработка на данните беше използван хи-квадрат тест за независимост (χ^2), който позволява да се оцени наличието на асоциация между категориалните променливи, като пол, вероятен път на инфекция, страна на произход, субтип на вируса и други.

В случаите, когато честотите на някои категории бяха ниски, беше приложен тестът на Фишер, който осигурява по-точна оценка на вероятността за статистическа зависимост при малки извадки. Всички анализи бяха проведени с ниво на статистическа значимост $\alpha = 0,05$, като р-стойности под този праг бяха считани за статистически значими.

В допълнение, за някои части от анализа, като например разпределението на HIV-1 субтиповете между различни трансмисивни категории или географски произход на инфекцията, където беше необходимо да се оцени високата статистическа надеждност при анализа на множество хипотези, или при сравняването на големи набори от данни, беше приложен по-строг критерий за значимост $P < 0,001$. Използването на този по-строг праг позволи да се идентифицират резултати с висока степен на значимост, които са по-малко вероятни да бъдат случайни. Приложението на различни критерии за значимост в зависимост от специфичните данни и контекста, осигури по-добра прецизност и надеждност на направените заключения.

Таблица 4. Обобщение на антиретровирусна резистентност в изследваната популация.

Характеристика	Изследвани проби 1654	Проби с резистентни мутации 519 (31,4%)	<i>P</i> ¹
Пол			
Мъже	1396 (84,4)	451 (32,3)	0.0677
Жени	258 (15,6)	68 (26,4)	
Вероятен път на HIV-1 инфекция			< 0.001*
ХЕТ	670 (40,5)	217 (32,4)	-
МСМ	762 (46,1)	272 (35,7)	0.188
ИВН	199 (12,0)	27 (13,6)	< 0.001*
МСМ + ИВН	23 (1,4)	3 (13,0)	0.050
Страна на произход			
България	1588 (96)	499 (31,4)	0.8932
Друга страна	66 (4,0)	20 (30,3)	
Вероятна страна на придобиване на инфекцията			
България	1390 (84,0)	429 (30,9)	0.3114
Друга страна	264 (16,0)	90 (34,1)	
Регион в страната			
София – столица	793 (47,9)	230 (29,0)	0.0497*
Друг регион	861 (52,1)	289 (33,6)	
Бременност			
Бременни жени	43 (16,7)	13 (30,2)	0.5705
Жени без бременност	215 (83,3)	55 (25,6)	
СПИ			
Да	346 (20,9)	120 (34,7)	0.1517
Не	1308 (79,1)	399 (30,5)	
Секс срещу заплащане			
Да	49 (3,0)	11 (22,4)	0.2113
Не	1605 (97,0)	508 (31,7)	
Лица лишени от свобода			
Да	83 (5,0)	14 (16,9)	0.0033*
Не	1571 (95,0)	505 (32,1)	

*Статистически значими разлики ($p < 0.05$)**P-стойности изчислени с Fisher's Exact Test****Антиретровирусна резистентност при двата пола**

Анализът на резистентността сред изследваната популация разкрива важни различия между категориите. При изследването на половата принадлежност се установи, че мъжете представляват 84,4% от пробите (1396 от 1654), като 32,3% от тези проби (451) имат резистентни мутации. За жените, които съставляват 15,6% от общия брой проби (258), резистентност е установена при 26,4% от случаите (68 проби). Разликата между половете не е статистически значима ($p = 0.0677$), въпреки че се наблюдава тенденция за по-висока честота на резистентност при мъжете с 5,9 процентни пункта.

Вероятен път на HIV-1 инфекция (трансмисионна група)

Разглеждането на вероятния път на инфектиране предоставя най-важните статистически данни за възможните механизми за разпространение на резистентност. При лицата, инфектирани по хетеросексуален път, които представляват 40,5% от всички проби (670), резистентност е установена при 32,4% от случаите (217 проби). Групата на МСМ, формира 46,1% от пробите (762), като 35,7% от тези проби (272) показват резистентност. Разликата между МСМ и хетеросексуалната група не е статистически

значима ($p = 0.188$), въпреки наблюдаваната тенденция за по-висока честота на резистентност. За разлика от това, ИВН, които представляват 12,0% от пробите (199), показват значително по-нисък процент резистентност – само 13,6% (27 проби). Тази стойност е силно статистически значима ($p < 0.001$) спрямо хетеросексуалната група и показва различна епидемиологична динамика в тази популация. При комбинираната категория МСМ + ИВН, която включва само 23 проби, резистентност е установена при 13,0% от случаите (3 проби), като разликата спрямо хетеросексуалната група е гранично значима ($p = 0.050$). Общият многогрупов анализ потвърждава силно статистически значими различия между всички трансмисионни групи ($p < 0.001$).

Страна на произход

Статистическият анализ на страната на произход не показва значими различия между местни и чуждестранни пациенти. Сред българските граждани, които съставляват 96,0% от всички проби (1588), резистентност е установена в 31,4% от случаите (499 проби). За чуждестранните граждани, които формират 4,0% от пробите (66), 30,3% от тях (20 проби) показват резистентност. Разликата между двете групи не е статистически значима ($p = 0.8932$), показвайки практически идентични нива на резистентност.

Вероятна страна на придобиване на инфекцията

Когато се разглежда вероятната страна на придобиване на инфекцията, инфекция, придобита в България, е регистрирана в 84,0% от пробите (1390), от които 30,9% (429 проби) са с резистентност. В случаите на инфекция, придобита в друга държава (264 проби, 16,0%), резистентност е установена в 34,1% от случаите (90 проби). Разликите между двете групи не са статистически значими ($p = 0.3114$), въпреки наблюдаваната тенденция за по-висок процент резистентност при инфекции, придобити извън България, с 3,2 процентни пункта.

Регион в страната

По отношение на регионалното разпределение се установи статистически значима разлика между столицата и останалите региони ($p = 0.0497^*$). Най-голям брой проби са регистрирани в София – столица (793 проби, 47,9%), като 29% от тях (230) показват резистентност. За останалите региони на страната, които включват 861 проби (52,1%), резистентност е установена в 33,6% от случаите (289). Тази значима разлика от 4,6 процентни пункта подчертава различията в епидемиологичната картина между урбанизираната столица и периферните области, като показва по-висока честота на резистентност извън столицата.

Бременност

При анализ на бременността бяха разгледани две категории: бременни жени и жени без бременност. От 43 проби, събрани от бременни жени, 13 (30,2%) са с резистентност, докато при жените без бременност (215 проби) 25,6% (55 проби) показват резистентност. Тези разлики не са статистически значими ($p = 0.5705$), което предполага, че бременността не оказва влияние върху честотата на резистентни мутации. Разликата от 4,6 процентни пункта може да се дължи на случайни вариации.

Наличие на сексуално предавани инфекции (СПИ)

В проучването 20,9% от всички изследвани проби (346) са от лица с документирана СПИ, като при 34,7% от тях (120 проби) са установени резистентни мутации. В сравнение с групата на лицата без СПИ, която обхваща 1308 проби, от които 30,5% (399 проби) показват резистентност, разликата не е статистически значима ($p = 0.1517$). Въпреки

липсата на статистическа значимост, наблюдаваната тенденция за по-висока честота на резистентност при лица със СПИ с 4,2 процентни пункта разлика предполага потенциална клинична значимост, която заслужава внимание в бъдещи изследвания.

Секс срещу заплащане

При лицата, които съобщават за секс срещу заплащане, резистентност е установена при 22,4% от пробите (11 от 49), докато за тези, които не съобщават за такава активност, резистентност е регистрирана в 31,7% от пробите (508 от 1605). Тази разлика не е статистически значима ($p = 0.2113$). Интересното наблюдение е, че групата със секс срещу заплащане показва по-нисък процент резистентност с 9,3 процентни пункта, което може да се дължи на по-редовно тестване и лечение в тази популация, или на малкия размер на извадката.

Лица лишени от свобода

При анализа на лицата лишени от свобода се установи силно статистически значима разлика ($p = 0.0033^*$). От 83 проби, събрани от лица в затвори, само 16,9% (14 проби) са с резистентност, което е значително по-ниско в сравнение с лицата, които не са лишени от свобода, при които резистентност е регистрирана в 32,1% от пробите (505 от 1571). Тази драматична разлика от 15,2 процентни пункта предизвиква особен интерес и ясно показва, че контролираната среда в затворническите заведения играе силна протективна роля спрямо развитието на резистентност.

Нашият анализ, разкрива важни детайли за различните рискови групи и тяхната уязвимост към разпространение на резистентни мутации. Най-значими различия се наблюдават при вероятния път на HIV-1 инфекция, като групата на ИВН, показва драматично по-ниски нива на резистентност (13,6%) в сравнение с ХЕТ (32,4%) и МСМ (35,7%). Тази находка представлява критично звено в усилията за разбиране на епидемиологичната динамика и контрола на разпространението на резистентни щамове. По-ниските нива на резистентност сред лицата лишени от свобода (16,9% срещу 32,1% в общата популация) предизвикват особен интерес и подчертават необходимостта от повишено внимание за разбиране на факторите, влияещи върху тяхната протективна среда. Регионалните различия между София-столица и останалите области на страната показват статистически значима вариация, която подчертава значението на географските и социалните фактори в динамиката на резистентността. Въпреки липсата на статистическа значимост, данните за сексуално предаваните инфекции предполагат потенциална връзка с развитието на резистентност, което изисква интегрирани подходи за диагностика и лечение. Наблюдаваните тенденции в половото разпределение и начина на придобиване на инфекцията допълнително обогатяват разбирането за сложната епидемиологична картина. Тези находки потвърждават важността на адаптиране на здравните политики към нуждите на различните уязвими групи, както на национално, така и на международно ниво. Освен това, резултатите подчертават необходимостта от продължаващо наблюдение и анализ на факторите, водещи до развитие на резистентност, с цел оптимизиране на лечението и предотвратяване на разпространението на резистентни щамове.

4.2.2. Резистентни мутации към NRTI

Анализът на резистентността към антиретровирусна терапия разкрива съществена информация за разпределението и честотата на NRTI мутациите в изследваната популация. Въз основа на резултатите са идентифицирани, както общият брой мутации, така и броят на пациентите с множество мутации (таблица 5 и фигури 6 и 7).

Данните показват, че от общо 298 идентифицирани мутации, най-често срещаната е S68G, която се наблюдава в 185 случая (11,2% от всички мутации). Следващите по честота мутации включват S68SG (17 случая, 1,0%), M41L (15 случая, 0,9%) и M184V (12 случая, 0,7%). Останалите мутации, като T215D (7 случая, 0,4%), A62V (6 случая, 0,4%) и L74V (4 случая, 0,2%), имат по-ниска честота, но също така подчертават разнообразието от наблюдавани резистентни профили. В редки случаи, като например мутациите D67N, K219KN и T215TN, честотата е само 0,1% (1 случай). Тези данни отразяват разпространението на специфични NRTI мутации в изследваната популация.

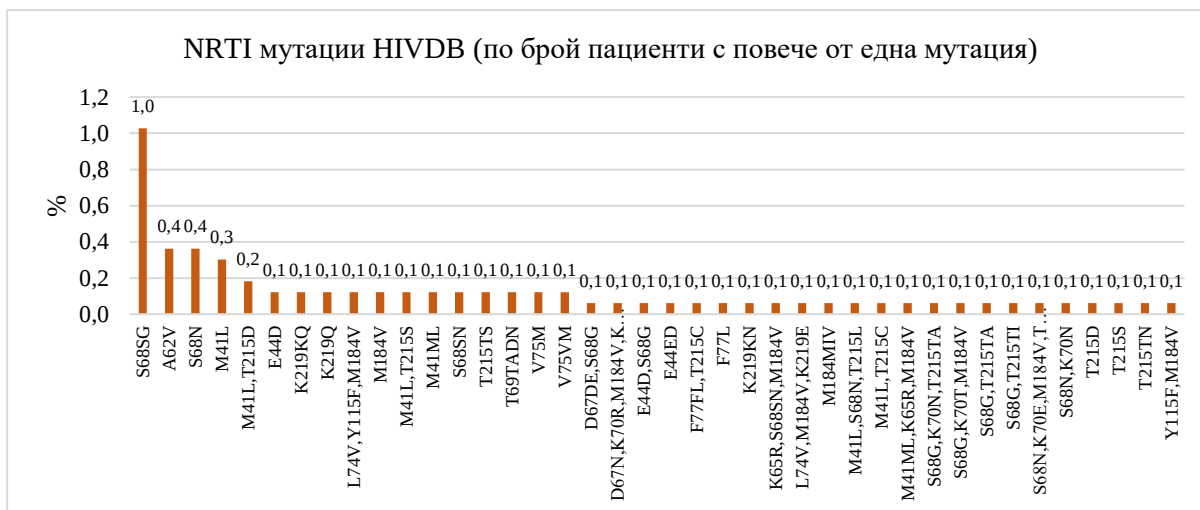
При анализа на броя пациенти с повече от една мутация бяха установени 84 случая (5,1% от общия брой пациенти). Най-честата комбинация е S68SG, която се среща при 17 пациенти (1,0%). Други често срещани мутации сред пациентите с множество мутации включват A62V и S68N (по 6 случая всяка, 0,4%), както и M41L (5 случая, 0,3%). Установени са и по-сложни комбинации, като например D67N, K70R, M184V и K219Q, които се наблюдават при 1 пациент (0,1%). Други редки комбинации включват L74V, Y115F и M184V (2 случая, 0,1%). Тези резултати подчертават сложността на резистентните профили и значението на идентифицирането на пациенти с множество мутации.

Наличието на висока честота на мутацията S68G показва, че тя може да има съществена роля в резистентността към NRTI терапия в изследваната популация. Освен това комбинациите от мутации при определени пациенти, предполагат потенциално по-висока степен на резистентност, която може да повлияе на терапевтичните резултати. Установените редки мутации и комбинации изискват допълнително внимание, тъй като те могат да бъдат индикатори за уникални резистентни механизми или нововъзникващи щамове на вируса. Важно е тези мутации да бъдат включени в рутинния мониторинг и оценка на резистентността, за да се гарантира ефективността на прилаганите терапевтични схеми.

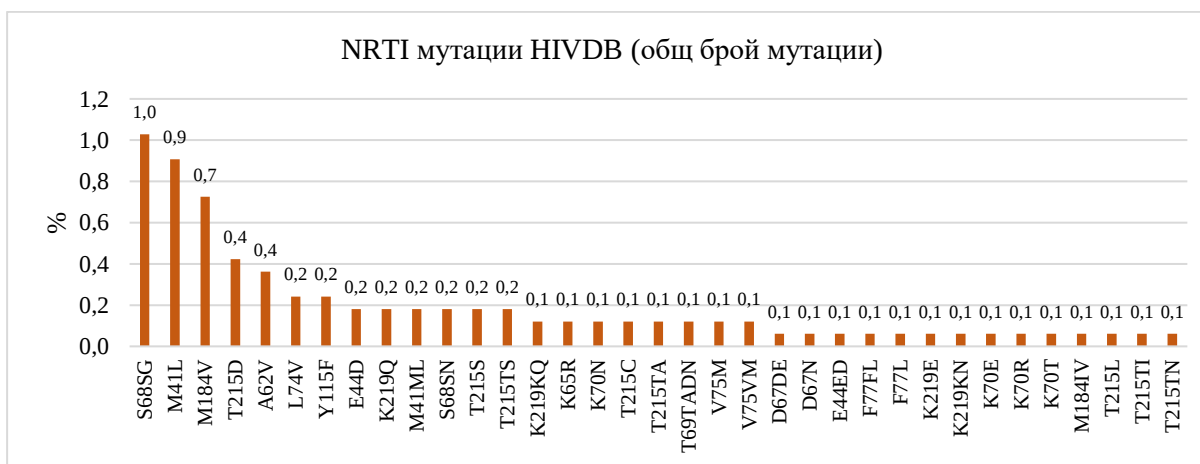
Таблица 5. Анализ на резистентни мутации към NRTI HIVDB. (А) Резистентни мутации по брой изследвани пациенти. (Б) Общ брой резистентни мутации.

А			Б		
NRTI мутации HIVDB (по брой изследвани пациенти (някои проби са с повече от една мутация))	брой	%	NRTI мутации HIVDB (общ брой мутации)	Брой	%
S68SG	17	1,0	S68G	185	11,2
A62V	6	0,4	S68SG	17	1,0
S68N	6	0,4	M41L	15	0,9
M41L	5	0,3	M184V	12	0,7
M41L,T215D	3	0,2	T215D	7	0,4
E44D	2	0,1	A62V	6	0,4
K219KQ	2	0,1	L74V	4	0,2
K219Q	2	0,1	Y115F	4	0,2
L74V,Y115F,M184V	2	0,1	E44D	3	0,2
M184V	2	0,1	K219Q	3	0,2
M41L,T215S	2	0,1	M41ML	3	0,2
M41ML	2	0,1	S68SN	3	0,2
S68SN	2	0,1	T215S	3	0,2
T215TS	2	0,1	T215TS	3	0,2
T69TADN	2	0,1	K219KQ	2	0,1
V75M	2	0,1	K65R	2	0,1
V75VM	2	0,1	K70N	2	0,1
D67DE,S68G	1	0,1	T215C	2	0,1
D67N,K70R,M184V,K219Q	1	0,1	T215TA	2	0,1
E44D,S68G	1	0,1	T69TADN	2	0,1
E44ED	1	0,1	V75M	2	0,1
F77FL,T215C	1	0,1	V75VM	2	0,1
F77L	1	0,1	D67DE	1	0,1
K219KN	1	0,1	D67N	1	0,1
K65R,S68SN,M184V	1	0,1	E44ED	1	0,1
L74V,M184V,K219E	1	0,1	F77FL	1	0,1
M184MIV	1	0,1	F77L	1	0,1
M41L,S68N,T215L	1	0,1	K219E	1	0,1
M41L,T215C	1	0,1	K219KN	1	0,1
M41ML,K65R,M184V	1	0,1	K70E	1	0,1
S68G,K70N,T215TA	1	0,1	K70R	1	0,1
S68G,K70T,M184V	1	0,1	K70T	1	0,1
S68G,T215TA	1	0,1	M184IV	1	0,1
S68G,T215TI	1	0,1	T215L	1	0,1
S68N,K70E,M184V,T215D	1	0,1	T215TI	1	0,1
S68N,K70N	1	0,1	T215TN	1	0,1
T215D	1	0,1	Тотал	298	18,0
T215S	1	0,1			
T215TN	1	0,1			
Y115F,M184V	1	0,1			
Тотал	84	5,1			

Забележка: Стойностите в % са закръглени.



Фигура 6. Резистентни мутации към NRTI HIVDB по брой изследвани пациенти.



Фигура 7. Резистентни мутации към NRTI HIVDB по брой резистентни мутации

Фенотипно изражение на резистентността към NRTI

Анализът на фенотипния ефект от идентифицираните NRTI мутации, предоставя важна информация за нивото на резистентност към специфични медикаменти. Общият процент пациенти с резистентност към NRTI клас медикаменти е 15,4% (таблица 6 и фигура 8). Разпределението на резистентността към отделни медикаменти показва разнообразни профили. За абакавир (ABC) потенциално ниска резистентност се наблюдава при 0,3% от пациентите, ниска резистентност при 0,1%, средна резистентност при 0,1% и висока резистентност при 0,4%. При зидовудин (AZT) 1% от пациентите показват потенциално ниска резистентност, 0,6% ниска резистентност, 0,4% средна резистентност и 0,1% висока резистентност. Ставудин (D4T) е свързан с потенциално ниска резистентност при 0,5% от пациентите, ниска резистентност при 1%, средна резистентност при 1% и висока резистентност при 0,1%.

По отношение на DDI, 1,1% от пациентите проявяват потенциално ниска резистентност, 0,9% ниска резистентност, 0,2% средна резистентност и 0,3% висока резистентност. Емтрицитабин (FTC) и ламивудин (3TC) показват сходни профили, с 0,1% пациенти с потенциално ниска резистентност и без случаи на резистентност на по-високи нива. За тенофовир (TDF) потенциално ниска резистентност е наблюдавана при 0,3% от пациентите, докато ниска резистентност е регистрирана при 0,1%.

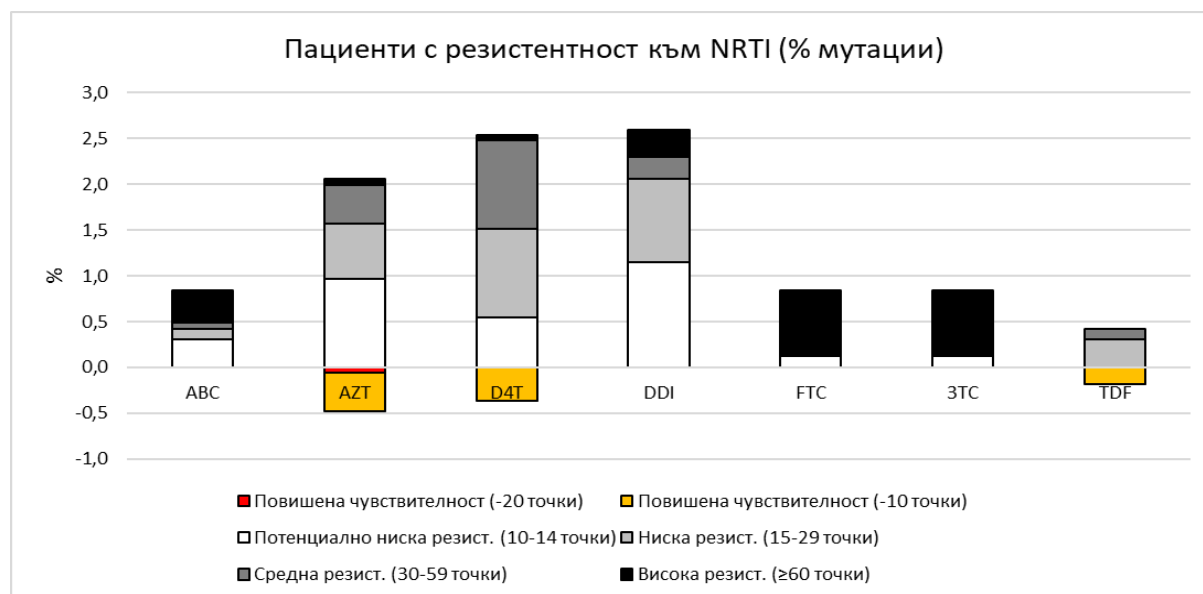
Тези данни демонстрират, че нивата на резистентност варират значително между различните медикаменти. Медикаментите ABC, AZT и D4T показват по-високи нива на

резистентност, което подчертава необходимостта от повишено наблюдение и оптимизиране на терапевтичните схеми, включващи тези медикаменти. В същото време, ниските нива на резистентност към FTC и 3TC, предоставят алтернативни терапевтични възможности.

Анализът на NRTI мутациите предоставя ценна информация за честотата и разпространението на различни резистентни профили. Наличието на сложни комбинации от мутации, подчертават необходимостта от индивидуализиран подход при лечението на HIV-инфекция. Тези резултати служат като основа за оптимизиране на антиретровирусната терапия и предотвратяване на разпространението на резистентни щамове на вируса.

Таблица 6. Фенотипно отражение на ефекта от резистентни мутации към NRTI.

NRTI % мутации към общия брой изследвани	Повишена чувствит. (-20 точки)	Повишена чувствит. (-10 точки)	Потенци- ално ниска резист. (10-14 точки)	Ниска резист. (15-29 точки)	Средна резист. (30-59 точки)	Висока резист. (≥60 точки)	Общ пац. с резист. в класа	% с в
ABC	0,0	0,0	0,3	0,1	0,1	0,4	15,4	
AZT	-0,1	-0,4	1,0	0,6	0,4	0,1		
D4T	0,0	-0,4	0,5	1,0	1,0	0,1		
DDI	0,0	0,0	1,1	0,9	0,2	0,3		
FTC	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,7		
3TC	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,7		
TDF	0,0	-0,2	0,0	0,3	0,1	0,0		



Фигура 8. Фенотипно отражение от резистентни мутации към NRTI.

4.2.3. Резистентни мутации към NNRTI

Изследването идентифицира основните NNRTI мутации и тяхното разпространение в изследваната популация, като обхваща както общия брой мутации, така и пациентите с множество мутационни профили (таблица 7 и фигури 9 и 10).

Сред всички установени мутации, V106I беше най-често срещаната, като тя се идентифицира в 109 случая, представляващи 6,6% от всички мутации. Други значими мутации включват E138A с честота от 76 случая (4,6%) и V179D с 39 случая (2,4%).

Мутациите E138G (25 случая, 1,5%), V106VI (19 случая, 1,1%) и K103N (18 случая, 1,1%) също се открояват като важни. Някои мутации, като K101E (8 случая, 0,5%) и E138EA (6 случая, 0,4%), са по-рядко срещани, но също така отразяват разнообразието на резистентните профили. Много редки мутации, като K238KN и Y181C, се наблюдават в единични случаи (0,1%), допълвайки разнородността на наблюдаваните мутации.

При разглеждането на пациентите с повече от една мутация, V106I отново се открие като най-честата, наблюдавана при 101 пациенти (6,1%). Следващите по честота мутации сред тази група бяха E138A (68 пациенти, 4,1%) и V179D (35 пациенти, 2,1%). Други мутации като E138G (20 пациенти, 1,2%) и V106VI (14 пациенти, 0,8%) също са отчетени. В допълнение, към единичните мутации бяха установени сложни комбинации, като например E138A и V179D, които се срещат при 1 случай (0,1%). Редки комбинации, включващи K101E, E138G и G190A, също се наблюдават в единични случаи. Тези сложни профили подчертават значителното разнообразие в резистентните механизми сред пациентите.

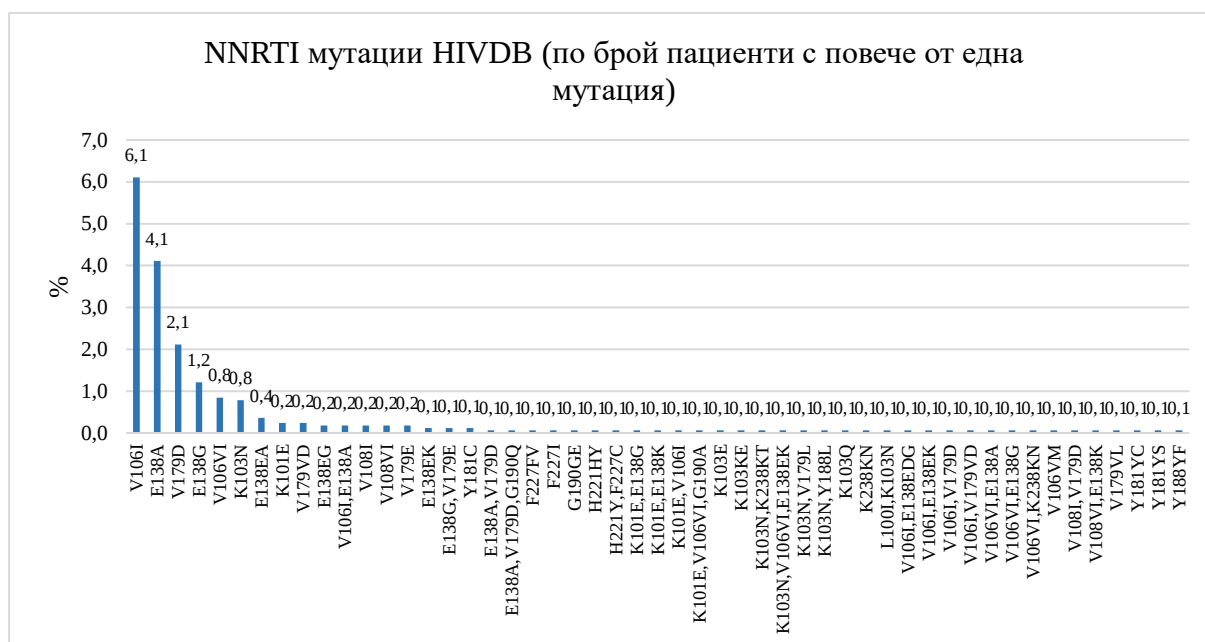
Честото наличие на мутацията V106I предполага, че тя играе важна роля в развитието на резистентността към NNRTI терапията. Значителният дял на мутациите E138A и V179D подчертава тяхното клинично значение и потенциалното им въздействие върху ефективността на терапията. Установените редки мутации и сложни комбинации изискват допълнително проучване, тъй като те могат да сигнализират за поява на нови резистентни механизми или да отразяват еволюционни адаптации на вируса. Тези резултати акцентират върху необходимостта от задълбочено наблюдение и персонализиран подход при терапията.

Изследванията за NNRTI мутациите предоставя ценна информация за резистентните профили и тяхното разпределение в изследваната популация. Те подчертават важността на нашия детайлен анализ на мутационния профил на всеки пациент за адаптиране на терапевтичните режими и подобряване на клиничните резултати.

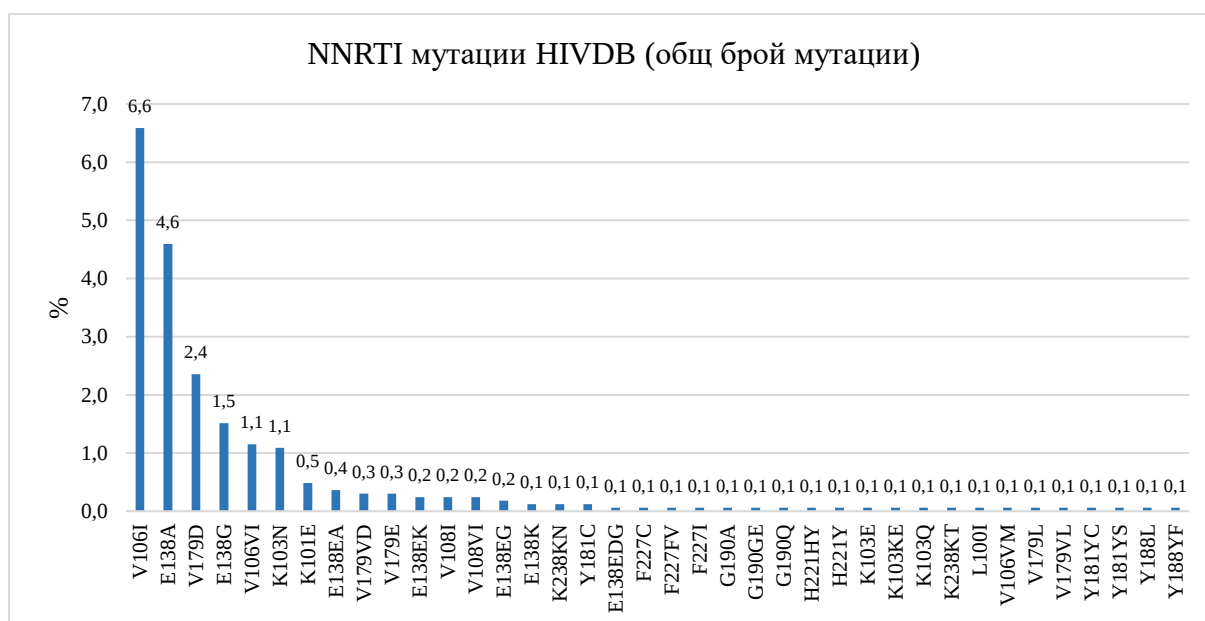
Таблица 7. Анализ на резистентни мутации към NNRTI HIVDB. **А.** Резистентни мутации по брой изследвани пациенти. **Б.** Общ брой резистентни мутации.

А			Б		
NNRTI мутации HIVDB (по брой пациенти с повече от една мутация)	Брой	%	NNRTI мутации HIVDB (общ брой мутации)	Брой	%
V106I	101	6,1	V106I	109	6,6
E138A	68	4,1	E138A	76	4,6
V179D	35	2,1	V179D	39	2,4
E138G	20	1,2	E138G	25	1,5
V106VI	14	0,8	V106VI	19	1,1
K103N	13	0,8	K103N	18	1,1
E138EA	6	0,4	K101E	8	0,5
K101E	4	0,2	E138EA	6	0,4
V179VD	4	0,2	V179VD	5	0,3
E138EG	3	0,2	V179E	5	0,3
V106I,E138A	3	0,2	E138EK	4	0,2
V108I	3	0,2	V108I	4	0,2
V108VI	3	0,2	V108VI	4	0,2
V179E	3	0,2	E138EG	3	0,2
E138EK	2	0,1	E138K	2	0,1
E138G,V179E	2	0,1	K238KN	2	0,1
Y181C	2	0,1	Y181C	2	0,1
E138A,V179D	1	0,1	E138EDG	1	0,1
E138A,V179D,G190Q	1	0,1	F227C	1	0,1
F227FV	1	0,1	F227FV	1	0,1
F227I	1	0,1	F227I	1	0,1
G190GE	1	0,1	G190A	1	0,1
H221HY	1	0,1	G190GE	1	0,1
H221Y,F227C	1	0,1	G190Q	1	0,1
K101E,E138G	1	0,1	H221HY	1	0,1
K101E,E138K	1	0,1	H221Y	1	0,1
K101E,V106I	1	0,1	K103E	1	0,1
K101E,V106VI,G190A	1	0,1	K103KE	1	0,1
K103E	1	0,1	K103Q	1	0,1
K103KE	1	0,1	K238KT	1	0,1
K103N,K238KT	1	0,1	L100I	1	0,1
K103N,V106VI,E138EK	1	0,1	V106VM	1	0,1
K103N,V179L	1	0,1	V179L	1	0,1
K103N,Y188L	1	0,1	V179VL	1	0,1
K103Q	1	0,1	Y181YC	1	0,1
K238KN	1	0,1	Y181YS	1	0,1
L100I,K103N	1	0,1	Y188L	1	0,1
V106I,E138EDG	1	0,1	Y188YF	1	0,1
V106I,E138EK	1	0,1	Тотал	346	20,9
V106I,V179D	1	0,1			
V106I,V179VD	1	0,1			
V106VI,E138A	1	0,1			
V106VI,E138G	1	0,1			
V106VI,K238KN	1	0,1			
V106VM	1	0,1			
V108I,V179D	1	0,1			
V108VI,E138K	1	0,1			
V179VL	1	0,1			
Y181YC	1	0,1			
Y181YS	1	0,1			
Y188YF	1	0,1			
Тотал	320	19,3			

Забележка: Стойностите в % са закръглени.



Фигура 9. Резистентни мутации към NNRTI HIVDB по брой изследвани пациенти.



Фигура 10. Резистентни мутации към NNRTI HIVDB по брой резистентни мутации.

Фенотипно изражение на резистентността към NNRTI

Анализът на фенотипния ефект от идентифицираните NNRTI мутации, дава съществена информация за степента на резистентност към различни медикаменти в този клас. Данните разкриват, че при 19,3% от пациентите е идентифицирана резистентност към NNRTI медикаменти. Различията в разпределението на резистентността сред отделните медикаменти са значителни (таблица 8 и фигура 11).

За DOR е отчетено, че 0,8% от пациентите имат потенциално ниска резистентност. По-ниски нива на резистентност са регистрирани при 0,2% от пациентите с ниска резистентност, същият процент със средна резистентност, и 0,3% с висока резистентност. EFV демонстрира разнообразен профил, като 4,8% от пациентите са с потенциално ниска резистентност, 1,1% са с ниска, 0,2% със средна и 1,4% с висока резистентност. ETR се

откроява с 9,1% от пациентите, проявяващи потенциално ниска резистентност, докато ниска резистентност е установена при 1,0%, средна при 0,4%, а висока при 0,1%.

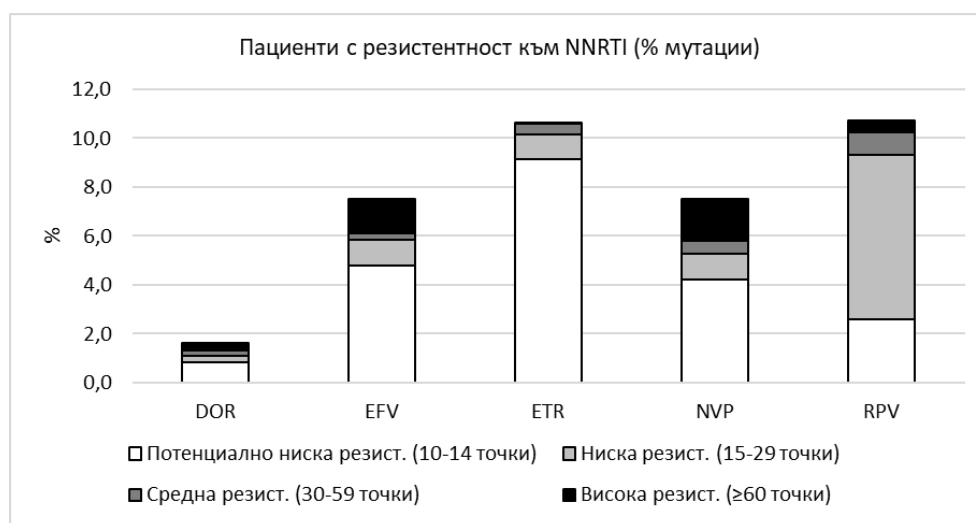
NVP е свързан с 4,2% от пациентите, които демонстрират потенциално ниска резистентност, докато 1,0% са с ниска резистентност, 0,5% със средна и 1,7% с висока резистентност. RPV показва по-различно разпределение, като 2,6% от пациентите са с потенциално ниска резистентност, 6,7% с ниска резистентност, 0,9% със средна и 0,5% с висока резистентност.

Резултатите показват, че резистентността към NNRTI медикаменти варира значително между различните лекарства. Етравирин се откроява като медикамент с най-висок дял пациенти, проявяващи потенциално ниска резистентност, докато рилпивирин показва най-висок процент пациенти с ниска резистентност. Тези различия подчертават значението на персонализираната терапия, при която изборът на медикаменти е съобразен с мутационния профил на вируса при конкретния пациент. Това е особено важно за постигането на оптимални клинични резултати и минимизиране на риска от неуспех на терапията.

Настоящият анализ предоставя основа за подобряване на терапевтичните стратегии за пациенти с NNRTI резистентност. Данните акцентират върху необходимостта от редовен мониторинг и мониторинг на мутационните профили, както при наивни за АРТ, така при пациенти на терапия за по-ефективно управление на терапията и ограничаване на разпространението на резистентни мутации.

Таблица 8. Фенотипно отражение на ефекта от резистентни мутации към NNRTI.

NNRTI % мутации към общия брой изследвани	Потенциално ниска резист. (10-14 точки)	Ниска резист. (15-29 точки)	Средна резист. (30-59 точки)	Висока резист. (≥60 точки)	Общ брой пац. с резист. в класа
DOR	0,8	0,2	0,2	0,3	19,3
EFV	4,8	1,1	0,2	1,4	
ETR	9,1	1,0	0,4	0,1	
NVP	4,2	1,0	0,5	1,7	
RPV	2,6	6,7	0,9	0,5	



Фигура 11. Фенотипно отражение от резистентни мутации към NNRTI.

4.2.4. Резистентни мутации към РІ

Главни РІ мутации

Анализът на главните РІ мутации разкрива значителна хетерогенност, като най-често срещаната мутация е L90M. Тази мутация беше идентифицирана в 18 случая, което съставлява 1,1% от всички регистрирани РІ мутации. Наличието на L90M е показателно за нейното значимо участие в механизмите на резистентност към протеазните инхибитори, което я прави ключов маркер за проследяване в клиничната практика (таблица 9 и фигура 12). След L90M, с по-ниска честота са отчетени мутациите D30N и M46L, всяка от които е регистрирана в 3 случая (0,2%). Въпреки сравнително малкия си дял, тези мутации играят роля в намаляването на ефективността на специфични протеазни инхибитори и могат да сигнализират за поява на частична резистентност. Особен интерес представлява мутацията M46ML, открита в 2 случая (0,1%). Тази мутация представлява вариант на M46 и може да отразява еволюционен механизъм, който позволява адаптиране на вируса към терапевтичния натиск. Единични случаи са отчетени за мутациите I47V и M46I, като всяка от тях съставлява 0,1%. Въпреки, че се срещат рядко, те също са от значение за проучването, тъй като могат да бъдат асоциирани с развитие на кръстосана резистентност към различни класове лекарства. Общият брой на основните РІ мутации възлиза на 28, което съставлява 1,7% от всички мутации, включени в анализа. Това подчертава тяхната сравнително по-висока честота в сравнение с допълнителните РІ мутации и тяхната роля в определяне на терапевтичните стратегии.

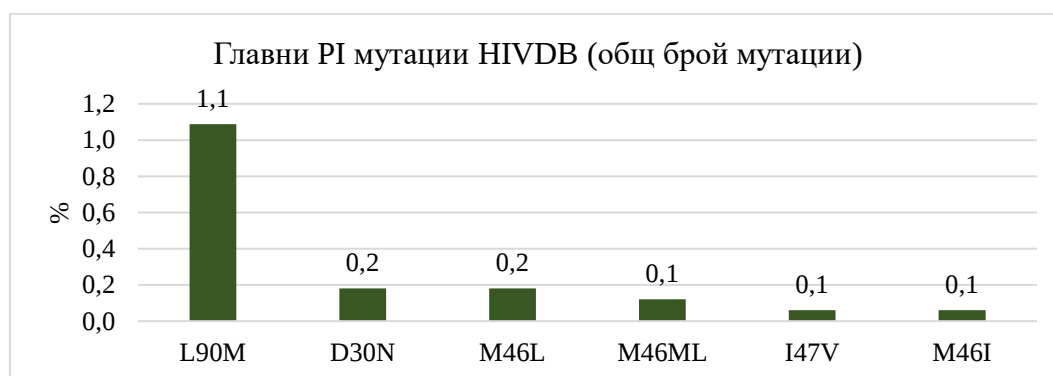
Допълнителни РІ мутации

Допълнителните РІ мутации разкриват още по-голямо разнообразие и допълват картината на резистентните механизми в изследваната популация, (таблица 9 и фигура 13). Най-често идентифицираната мутация сред тази група е L33LF, която е установена в 4 случая (0,2%). След нея следват L33F, N88D и Q58E, като всяка от тях е отчетена в 3 случая (0,2%). Тези мутации, въпреки че са по-редки от основните, представляват ключови индикатори за наличието на различни мутационни профили, които могат да променят чувствителността към терапията. Мутацията L10F е регистрирана в 2 случая (0,1%) и може да играе роля в комбинация с други мутации за намаляване на ефективността на протеазните инхибитори. Редки мутации като F53FY, F53L, K43KT и L10LF са наблюдавани само в единични случаи, всяка с дял от 0,1%. Въпреки ограничената си честота, тези мутации могат да имат значение в контекста на комбинации с други мутации и да бъдат индикатор за бъдещи адаптации на вируса. Общият брой допълнителни РІ мутации е 19, което съставлява 1,1% от всички мутации.

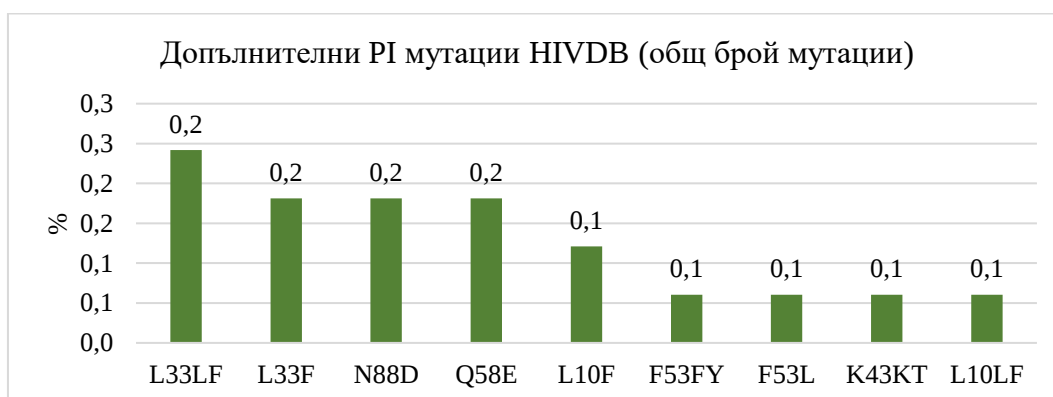
Протеазните инхибитори се използват все по-рядко в клиничната практика и като следствие от това, резистентните мутации към РІ в нашето проучване са много по-рядко срещани, в сравнение с тези при NRTI и NNRTI. Наличието на разнообразни РІ мутации както сред главните, така и сред допълнителните профили показва значително хетерогенно разпространение на резистентността към протеазните инхибитори. Честото идентифициране на мутацията L90M я утвърждава като водеща причина за резистентност в изследваната популация, докато по-редки мутации като M46ML, I47V и L33LF могат да сигнализират за появата на нови механизми на резистентност. Допълнителните мутации допълват основната картина, демонстрирайки сложността на вирусната адаптация и еволюция. Особено внимание трябва да се обърне на редките мутации и техните потенциални комбинации, тъй като те могат да имат важно клинично значение и да влияят върху избора на терапевтични режими.

Таблица 9. Анализ на резистентни мутации към PI HIVDB. (A) Главни резистентни мутации по брой изследвани пациенти. (B) Допълнителни резистентни мутации по брой изследвани пациенти. Стойностите в % са закръглени.

(A) Главни PI мутации HIVDB (общ брой мутации)	Брой	%	(B) Допълнителни PI мутации HIVDB (общ брой мутации)	Брой	%
L90M	18	1,1	L33LF	4	0,2
D30N	3	0,2	L33F	3	0,2
M46L	3	0,2	N88D	3	0,2
M46ML	2	0,1	Q58E	3	0,2
I47V	1	0,1	L10F	2	0,1
M46I	1	0,1	F53FY	1	0,1
Тотал	28	1,7	F53L	1	0,1
			K43KT	1	0,1
			L10LF	1	0,1
			Тотал	19	1,1



Фигура 12. Главните резистентни мутации към PI HIVDB по общ брой мутации.



Фигура 13. Допълнителните резистентни мутации към PI HIVDB по общ брой мутации.

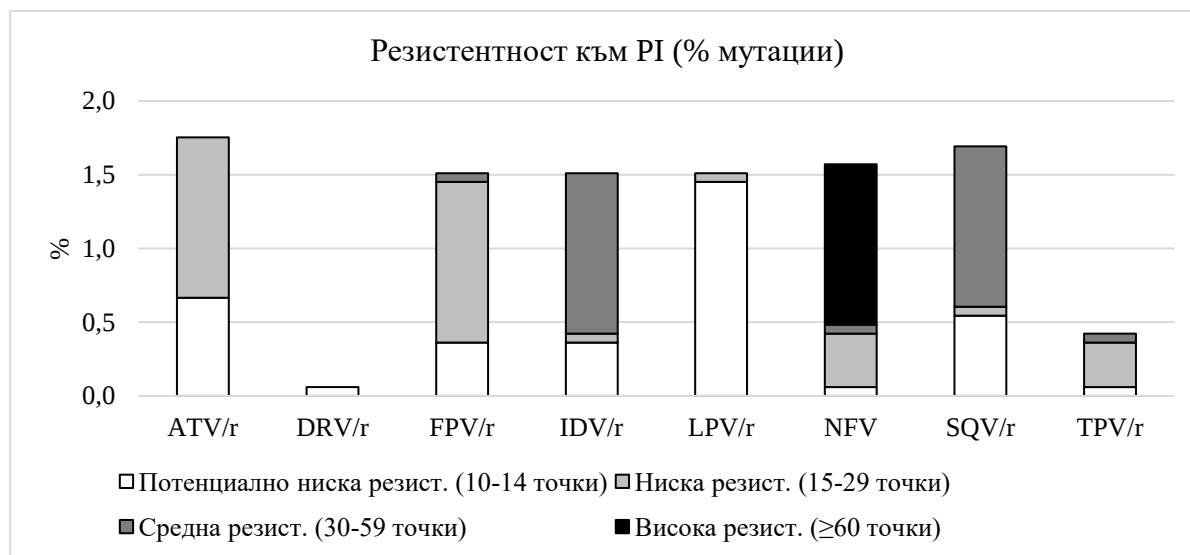
Фенотипно изражение на резистентността към PI медикаменти

Изследването на фенотипната резистентност към протеазни инхибитори (PI) показва, че 1,7% от пациентите имат различна степен на резистентност към PI медикаменти, като разликите между отделните лекарства са значителни. Резистентността към PI медикаменти е изразена по различен начин сред отделните лекарства, (таблица 10 и фигура 14). Например, лопинавир/ритонавир (LPV/r) се откроява с най-висок дял пациенти с потенциално ниска резистентност, което предполага, че той може да остане ефективен дори при наличие на някои мутации. В същото време, нелфинавир (NFV) показва сравнително високи нива на силна

резистентност, което го прави по-малко подходящ за пациенти с напреднала резистентност. При атазанавир/ритонавир (ATV/r) се наблюдава запазена чувствителност при повечето пациенти, което го прави предпочитан избор за терапия в случаи на мутации с нисък риск за развитие на резистентност. Фосампренавир/ритонавир (FPV/r) и саквинавир/ритонавир (SQV/r) демонстрират разнообразие в нивата на резистентност – от ниска до умерена, което предполага, че те могат да бъдат полезни в специфични терапевтични стратегии, когато другите опции са ограничени. Особено интересен е профилът на нелфинавир (NFV), който показва по-голям дял на висока резистентност в сравнение с останалите медикаменти. Това подчертава нуждата от повишено внимание при използването му, особено в случаи на пациенти с комплексен мутационен профил. На свой ред, TPV/r (типранавир/ритонавир) и дарунавир/ритонавир (DRV/r) показват много ниски нива на резистентност, което ги прави перспективни опции за терапия. Данните от проучването ясно подчертават, че изборът на медикамент трябва да се основава на индивидуалния мутационен профил на вируса при всеки пациент. Това е от ключово значение за постигане на оптимални резултати, особено при пациенти с високи нива на резистентност.

Таблица 10. Фенотипно отражение на ефекта от резистентни мутации към PI.

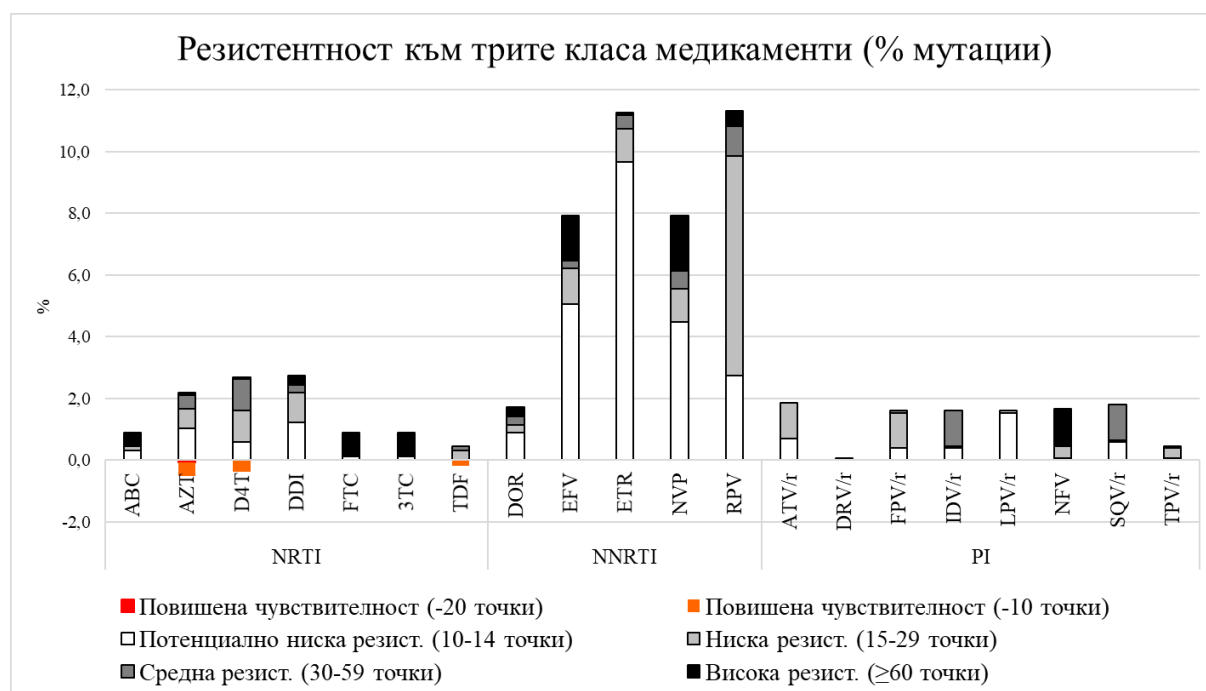
PI % мутации към общия брой изследвани	Потенциално ниска резист. (10-14 точки)	Ниска резист. (15-29 точки)	Средна резист. (30-59 точки)	Висока резист. (≥60 точки)	Общ брой пац. с резист. в класа
ATV/r	0,7	1,1	0,0	0,0	1,7
DRV/r	0,1	0,0	0,0	0,0	
FPV/r	0,4	1,1	0,1	0,0	
IDV/r	0,4	0,1	1,1	0,0	
LPV/r	1,5	0,1	0,0	0,0	
NFV	0,1	0,4	0,1	1,1	
SQV/r	0,5	0,1	1,1	0,0	
TPV/r	0,1	0,3	0,1	0,0	



Фигура 14. Фенотипно отражение от резистентни мутации към PI.

4.2.5. Обобщение на резистентността към трите класа антиретровирусни медикаменти

Изследването на фенотипната резистентност към трите основни класа антиретровирусни медикаменти – NRTI (нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза), NNRTI (ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза) и PI (протеазни инхибитори) – предоставя детайлна картина на степента на резистентност и нейното разпределение. Общите нива на резистентност са 15,4% за NRTI, 19,3% за NNRTI и 1,7% за PI, като всеки клас демонстрира специфични характеристики и различия в разпространението на резистентността (фигура 15).



Фигура 15. Фенотипно отражение от резистентни мутации към NRTI, NNRTI и PI.

Резистентност към NRTI медикаменти

Резистентността към NRTI медикаменти се наблюдава при значителен дял от пациентите (15,4%). Най-високи нива на резистентност се регистрират при AZT и DDI, като AZT показва значителна честота на потенциално ниска (1,0%) и ниска резистентност (0,6%), докато DDI демонстрира висок дял на потенциално ниска резистентност (1,2%) и ниска резистентност (1,0%). Медикаменти като FTC и 3TC проявяват висока степен на резистентност, особено в категорията за висока резистентност (0,8%). Това показва специфични ограничения за тяхната ефективност при пациенти с комплексен мутационен профил. Въпреки това, TDF запазва сравнително ниски нива на резистентност, което го прави предпочитан избор в определени клинични ситуации.

Резистентност към NNRTI медикаменти

NNRTI медикаментите демонстрират най-високата обща резистентност (19,3%), като разликите в профилите на отделните медикаменти са значителни. Етравирин (ETR) се откроява с 9,7% от пациентите, показващи потенциално ниска резистентност, което го прави най-засегнатия медикамент в тази категория. Високите нива на потенциално ниска резистентност при EFV (ефавиренц) (5,1%) и NVP (невирапин) (4,5%) подчертават

ограничената им ефективност при определени вирусни мутации. От друга страна, RPV (рипивирин) демонстрира най-висок дял пациенти с ниска резистентност (7,1%), което го прави медикамент с по-стабилен профил в някои терапевтични стратегии. Все пак е налице умерена до висока резистентност (1,0% до 0,5%), което ограничава неговата приложимост при определени случаи.

Резистентност към PI медикаменти

PI медикаментите показват най-ниски нива на резистентност (1,7%) в сравнение с останалите два класа, което подчертава запазената им ефективност като терапевтичен избор. LPV/r (лопинавир/ритонавир) се откроява с най-висок процент пациенти с потенциално ниска резистентност (1,5%), което го прави стабилна опция в много терапевтични ситуации. Въпреки това, NFV (нелфинавир) демонстрира най-висок дял на пациенти с висока резистентност (1,2%), което ограничава неговата употреба при случаи с комплексни мутации.

Особено внимание заслужава DRV/r (дарунавир/ритонавир), който все още е препоръчван от терапевтичните ръководства като първи избор за пациенти с резистентен вирусен профил. Данните показват, че резистентност към дарунавир е установена в изключително редки случаи. Това го прави един от най-ефективните медикаменти в класа на протеазните инхибитори и предпочитана опция при сложни клинични сценарии.

Други PI медикаменти, като IDV/r (индинавир/ритонавир) и SQV/r (саквинавир/ритонавир), демонстрират умерена резистентност, което изисква внимателно проследяване на мутационния профил преди тяхното прилагане. TPV/r (типранавир/ритонавир) остава с ниски нива на резистентност, но се използва по-рядко поради специфичните си ограничения.

Данните от анализа показват, че резистентността към различните класове антиретровирусни медикаменти варира значително. NNRTI медикаментите демонстрират най-високи нива на резистентност, което изисква повишено внимание при тяхното предписване. NRTI медикаментите показват по-умерена резистентност, докато PI медикаментите запазват най-ниска честота на резистентност, което ги прави ключова част от терапевтичните режими. Тези резултати подчертават значението на персонализираната терапия, базирана на детайлна оценка на мутационния профил на вируса. Редовният мониторинг и адаптация на терапията спрямо специфичния резистентен профил са критични за постигане на оптимални клинични резултати и минимизиране на риска от терапевтичен неуспех.

4.2.6. Резистентност при различни категории от изследваната популация

Разпространение на резистентни мутации при двата пола.

В настоящото изследване е анализирана честотата на резистентни мутации на различните класове медикаменти (Главни PI, Допълнителни PI, NRTI и NNRTI) при 258 жени и 1396 мъже. Общо са идентифицирани 623 случая на резистентност към медикаменти, като разпределението между половете показва различни тенденции (таблица 11). За клас Главни PI са установени 28 резистентни мутации, от които само 2 (0.78%) са при жените и 26 (1.86%) при мъжете. Разликата между двете групи не достига статистическа значимост ($p = 0.296$), което показва сходно разпространение на тези мутации между половете. Допълнителните PI мутации са значително по-редки, с общо 19 идентифицирани случая. От тях 4 (1.55%) са при жените и 15 (1.07%) при мъжете. Разликата отново не е статистически значима ($p = 0.521$), което предполага, че този клас

мутации е равномерно разпределен между половете. При клас NRTI са регистрирани 254 резистентни мутации. Жените имат 31 случая (12.02%), докато мъжете – 223 случая (15.97%). Макар че процентите при мъжете са по-високи, разликата между двете групи не достига статистическа значимост ($p = 0.111$). Това подсказва, че честотата на мутациите в този клас медикаменти не се влияе съществено от пола. Най-голям брой резистентни мутации са установени при клас NNRTI – общо 322 случая. Жените са с 41 случая (15.89%), докато мъжете – с 281 случая (20.13%). Въпреки че мъжете имат по-голям дял от тези мутации, разликата между групите не е статистически значима ($p = 0.124$).

Общият брой идентифицирани резистентни мутации за всички класове медикаменти е 623. Разпределението между половете показва 78 случая (30.23%) при жените и 545 случая (39.04%) при мъжете. Тази разлика е статистически значима ($p = 0.008$), което сочи, че общата честота на резистентност към медикаменти е значително по-висока при мъжете в сравнение с жените. Резултатите от анализа показват, че макар в отделните класове медикаменти да няма значими различия в разпределението на резистентните мутации между половете, общият брой резистентни мутации показва статистически значима разлика, като мъжете имат по-висока честота.

Таблица 11. Разпространение на резистентни мутации при двата пола.

Класове медикаменти	Брой с резист. мутации.	Ж =258	М =1396	p-стойност
PI главни	28 (4,49)	2 (0,14)	26 (1,86)	0.296
PI допълнителни	19 (3,05)	4 (1,55)	15 (1,07)	0.521
NRTI	254 (40,77)	31 (12,02)	223 (15,97)	0.111
NNRTI	322 (51,69)	41 (15,89)	281 (20,13)	0.124
Total	623 (100)	78 (30,23)	545 (39,04)	0.008

Разпространение на резистентни мутации сред различните трансмисионни категории

Анализирана е честотата и абсолютният брой на резистентни мутации в различните класове медикаменти сред различни уязвими групи: ХЕТ (670 души), МСМ (762 души), ИВН (199 души) и МСМ+ИВН (23 души). Общо са идентифицирани 623 случая на резистентност към медикаменти, като разпределението между групите показва различни тенденции (таблица 12).

Резистентността свързана с главните PI мутации включват общо 28 случая (4.49%), от които 7 (1.04%) са при ХЕТ, 21 (2.76%) при МСМ, и няма установени случаи при ИВН и МСМ+ИВН. Разликата между групите ХЕТ и МСМ е статистически значима ($p < 0.050$), докато разликите между останалите групи не са значими ($p > 0.05$). PI Допълнителни мутациите включват 19 случая (3.05%). От тях 9 (1.34%) са при ХЕТ, 8 (1.05%) при МСМ, 2 (1.01%) при ИВН, и няма случаи при МСМ+ИВН. Разликите между групите не достигат статистическа значимост ($p > 0.05$). При клас NRTI са регистрирани 254 резистентни мутации (40.77%). ХЕТ имат 97 случая (14.48%), МСМ – 141 случая (18.50%), ИВН – 15 случая (7.54%), а МСМ+ИВН – 1 случай (4.35%). Разликите между групите ХЕТ и МСМ, ХЕТ и ИВН, както и между МСМ и ИВН са статистически значими ($p < 0.050$). NNRTI са най-засегнатият клас медикаменти с 322 резистентни мутации (51.69%). ХЕТ имат 149 случая (22.24%), МСМ – 157 случая (20.60%), ИВН – 13 случая (6.53%), а МСМ+ИВН – 3 случая (13.04%). Разликите между групите ХЕТ и ИВН, както и между МСМ и ИВН, са статистически значими ($p < 0.050$), докато разликата между ХЕТ и МСМ не е значима ($p > 0.05$).

Общият брой идентифицирани резистентни мутации е 623 (100%). ХЕТ са с 262 случая (39.1%), МСМ – 183 случая (24.02%), ИВН – 174 случая (87.44%), а МСМ+ИВН

– 4 случая (17.39%). Разликите между групите са статистически значими за повечето сравнения ($p < 0.050$), което подчертава важноста на груповоспецифичния анализ. Изследването показва, че както абсолютният брой, така и процентното разпределение на резистентните мутации варират значително между различните групи. Високите нива на резистентност в определени групи, като ИВН и МСМ, подчертават необходимостта от продължаващо наблюдение, интервенции и индивидуализирани стратегии за терапия.

Таблица 12. Резистентни мутации сред различните трансмисионни групи.

Класове медикаменти	Брой с резист. мут	ХЕТ=670	МСМ=762	ИВН=199	МСМ+ИВН=23	Р-стойност ХЕТ=670 vs МСМ=762	Р-стойност ХЕТ=670 vs ИВН=199	Р-стойност МСМ=762 vs ИВН=199
PI Главни	28 (4,49)	7 (1,04)	21 (2,76)	-	-	<0.050	0.361	<0.050
PI Допълнителни	19 (3,05)	9 (14,48)	8 (1,05)	2 (1,01)	-	0.633	1.000	0.956
NRTI	254 (40,77)	97 (14,48)	141 (18,5)	15 (7,54)	1 (4,35)	<0.050	<0.050	<0.050
NNRTI	322 (51,69)	149 (22,24)	157 (20,60)	13 (6,53)	3 (13,04)	0.478	<0.050	<0.050
Total	623 (100)	262 (39,1)	183 (24,02)	174 (87,44)	4 (17,39)	<0.050	<0.050	<0.050

Разпространение на резистентни мутации сред сексуални работници и лица със СПИ.

Проведен е анализ на честотата и абсолютния брой на резистентни мутации в различните класове медикаменти сред две групи: сексуални работници (49 души) и лица с други сексуално предавани инфекции (СПИ, 346 души). Общо са идентифицирани 623 случая на резистентност към медикаменти, като разпределението между групите показва различни тенденции (таблица 13).

Главните мутациите към PI включват общо 28 случая (4.49%), от които 1 (2.04%) е регистриран при сексуалните работници, а 8 (2.31%) при лицата с други СПИ. Разликата между двете групи не е статистически значима ($p = 1.000$). PI Допълнителни мутациите включват 19 случая (3.05%). От тях 1 (2.04%) е установен при сексуалните работници, а 3 (0.87%) при лицата с други СПИ. Разликата между групите също не е статистически значима ($p = 0.442$). При клас NRTI са регистрирани 254 резистентни мутации (40.77%). Сексуалните работници имат 6 случая (12.24%), докато лицата с други СПИ – 63 случая (18.21%). Разликата между групите не е статистически значима ($p = 0.421$). NNRTI е класът медикаменти с най-голям брой резистентни мутации – общо 322 случая (51.69%). Сексуалните работници имат 4 случая (8.16%), докато лицата с други СПИ – 69 случая (19.94%). Разликата между двете групи е статистически значима ($p < 0.050$), което предполага важни различия в разпространението на резистентността към този клас медикаменти.

Общият брой идентифицирани резистентни мутации за всички класове медикаменти е 623 (100%). Сексуалните работници са с 12 случая (24.49%), докато лицата с други СПИ имат 143 случая (41.33%). Разликата между двете групи е статистически значима ($p < 0.050$), което подчертава необходимостта от продължаващо наблюдение върху специфичните особености на тези популации.

Резултатите показват, че сексуалните работници представляват уязвима група по отношение на резистентността към медикаменти. Въпреки че общият брой резистентни

мутации сред тях е по-нисък в сравнение с лицата с други СПИ, високата честота на мутации при определени класове медикаменти, като NNRTI (8.16%), подчертава тяхната уязвимост. Сексуалните работници често са изложени на множество рискови фактори, включително ограничен достъп до здравни услуги и социални стигми, които могат да допринесат за по-висока честота на резистентност. Резултатите показват, че разпределението на резистентните мутации варира значително между сексуалните работници и лицата с други СПИ, особено за NNRTI и общия брой резистентни мутации, където разликите са статистически значими.

Таблица 13. Резистентни мутации сред сексуални работници и лица със СПИ.

Класове медикаменти	Брой с резист. мутации	Сексуални работници =49	Други СПИ =346	р-стойност Сексуални работници срещу други СПИ
PI Главни	28 (4,49)	1 (2,04)	8 (2,31)	1.000
PI Допълни	19 (3,05)	1 (2,04)	3 (0,87)	0.413
NRTI	254 (40,77)	6 (12,24)	63 (18,21)	0.421
NNRTI	322 (51,69)	4 (8,16)	69 (19,94)	0.049
Total	623 (100)	12 (24,49)	143 (41,33)	0.028

Разпространение на резистентни мутации при вируси изолирани от лица инфектирани в България и при инфектирани в чужбина

Проучена е честотата и абсолютния брой на резистентни мутации в различните класове медикаменти сред групите на „Инфектирани в България“ (1369 души) и „Въведен вирус“ (285 души). Общо са идентифицирани 623 случая на резистентност към медикаменти, като разпределението между групите показва различни тенденции (таблица 14).

Главните PI мутации включват общо 28 случая (4.49%). Сред лицата, инфектирани в България, са регистрирани 25 случая (1.83%), а сред групата с въведен вирус – 3 случая (1.05%). Разликата между двете групи не е статистически значима ($p = 0.457$). PI Допълнителни мутациите включват 19 случая (3.05%). От тях 15 случая (1.10%) са при лицата, инфектирани в България, а 4 случая (1.40%) при групата с въведен вирус. Разликата между двете групи също не е статистически значима ($p = 0.554$).

При клас NRTI са регистрирани 254 резистентни мутации (40.77%). Лицата, инфектирани в България, имат 199 случая (14.54%), докато групата с въведен вирус има 55 случая (19.30%). Разликата между двете групи е статистически значима ($p < 0.050$), което подчертава важни различия в честотата на мутациите за този клас медикаменти. NNRTI включва най-голям брой резистентни мутации – общо 322 случая (51.69%). Лицата, инфектирани в България, имат 265 случая (19.36%), докато групата с въведен вирус има 57 случая (20.00%). Разликата между двете групи не е статистически значима ($p = 0.805$).

Общият брой на резистентните мутации за всички класове медикаменти е 623 (100%). Сред лицата, инфектирани в България, са регистрирани 504 случая (36.82%), а сред групата с въведен вирус – 119 случая (41.75%). Разликата между групите не е статистически значима ($p = 0.123$). Анализът показва, че групата с „Въведен вирус“ има по-висока честота на резистентни мутации в сравнение с лицата, инфектирани в България, при почти всички класове медикаменти. Най-съществена е тази разлика за класа NRTI, където честотата на мутациите е 19.30% за „Въведен вирус“ спрямо 14.54% за „Инфектирани в България“. Това подчертава уязвимостта на групата с въведен вирус, вероятно поради особености в източниците на инфекцията или ограничен достъп до подходяща терапия.

Таблица 14. Резистентни мутации при лица инфектирани в България и чужбина.

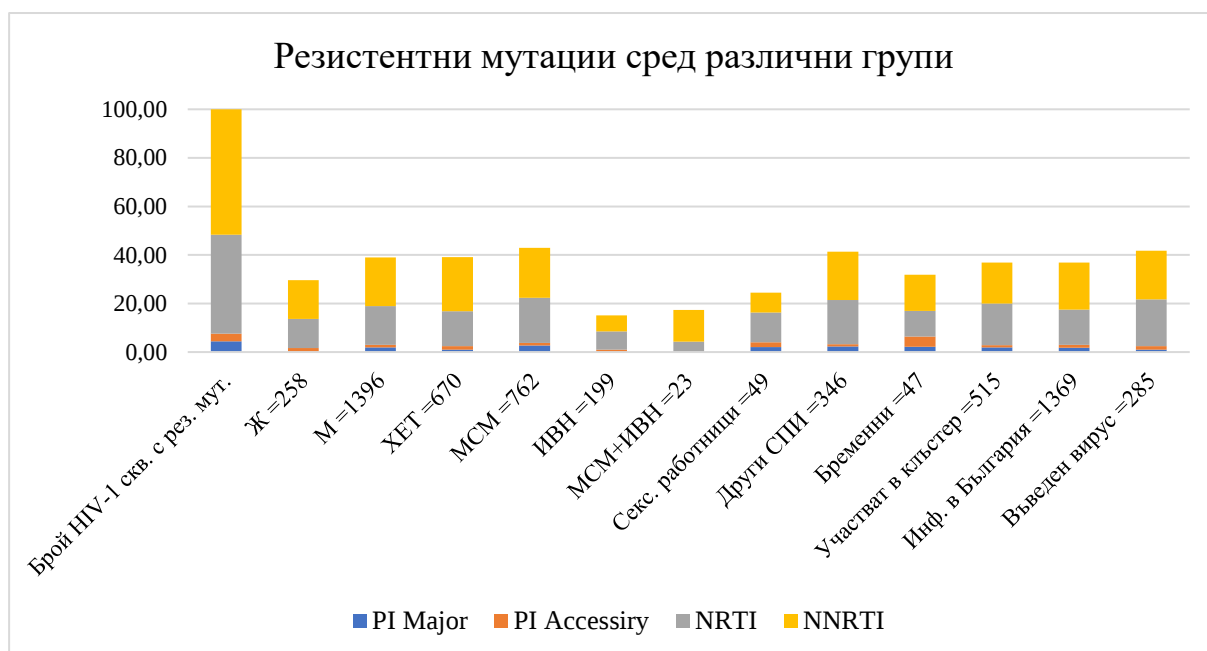
Класове медикаменти	Брой с резист. мутации.	Инф. в България =1369	Въведен вирус =285	p-стойност Инф. в България срещу въведен вирус
PI Главни	28 (4,49)	25 (1,83)	3 (1,05)	0.457
PI Допълни	19 (3,05)	15 (1,1)	4 (1,4)	0.554
NRTI	254 (40,77)	199 (14,54)	55 (19,3)	0.047
NNRTI	322 (51,69)	265 (19,36)	57 (20)	0.805
Total	623 (100)	504 (36,82)	119 (41,75)	0.123

Обобщение на анализа върху разпространението на резистентни мутации сред различни демографски и епидемиологични групи

Анализът изследва разпространението на резистентни мутации сред различни демографски и епидемиологични групи. Общият брой идентифицирани резистентни мутации е 623, като разпределението между групите показва значими различия (фигура 16).

Мъжете демонстрират по-висока честота на резистентност (39.04%) в сравнение с жените (30.23%). Макар че при отделните класове медикаменти липсват статистически значими различия между половете, общият брой резистентни мутации показва значима разлика ($p = 0.008$). При анализа на различните трансмисионни категории най-голям брой резистентни мутации е регистриран сред ХЕТ (39.1%), следвани от мъжете, които правят секс с мъже (МСМ, 24.02%), инжекционно употребяващите наркотици (ИВН, 87.44%) и комбинираната група на МСМ и ИВН (17.39%). Статистически значими разлики се наблюдават между някои групи, особено за класовете NRTI и NNRTI, като групата на ИВН е с най-висок риск от резистентност. Сексуалните работници демонстрират обща честота на резистентност от 24.49%, докато лицата с други сексуално предавани инфекции (СПИ) – 41.33%. Значима разлика ($p = 0.049$) е установена за класа NNRTI и общия брой резистентни мутации, което подчертава необходимостта от индивидуализирани подходи към тези групи. Лицата с въведен вирус имат по-висока честота на резистентност (41.75%) в сравнение с инфектираните в България (36.82%). Най-съществена разлика е установена за класа NRTI ($p = 0.047$), което подчертава уязвимостта на групата с въведен вирус.

Резултатите от анализа подчертават значителни различия в разпространението на резистентни мутации сред различните групи. Особено уязвими са групите на ИВН, сексуалните работници и лицата с въведен вирус.



Фигура 16. Обобщение на резистентни мутации в различни демографски и епидемиологични групи.

4.3. Субтипирание и филогенетичен анализ

4.3.1. Идентификация и анализ на субтиповете на HIV-1 въведени и разпространени в България

В настоящото проучване успешно са секвенирани и анализирани фрагменти от *pol* ген на HIV-1, изолирани от кръвни проби от 1654 лица с HIV-1 инфекция. Разнообразието от HIV-1 субтипове играе критична роля в разбирането на разпространението на вируса и предоставя ценна информация за молекулярната епидемиология, включително разпространението на генетични варианти и механизмите на вирусна адаптация. В рамките на това национално проучване беше извършен подробен анализ на субтиповете на HIV-1, което предоставя ценна информация за епидемиологичните характеристики на вируса в страната, включително въвеждане от чужбина чрез трансгранична трансмисия, така и разпространение в рамките на страната.

Данните от проучването разкриват, че най-разпространеният субтип в изследваната популация е В, който представлява 56,0% от всички случаи (таблица 15 и фигура 17). Това потвърждава доминиращата роля на субтип В в националния контекст. Следващите по честота субтипове са 01_AE (12,6%) и 02_AG (7,5%), които често се срещат в епидемии в Югоизточна Азия и Африка, но тяхното присъствие в настоящото проучване подчертава глобалния характер на вируса и сложните миграционни потоци, влияещи върху разпространението на HIV-1. F1 (6,6%) и URF (4,5%) също показват значително присъствие, като URF (уникалните рекомбинантни форми), демонстрират сложността на вирусната еволюция в хода на епидемията. A1 (4,2%) и A6 (3,7%) допълват картината на значимите субтипове, като тяхното присъствие в популацията отразява влиянието на регионални епидемии в Русия, Украйна и други страни от бившия Съветски съюз. Порядко срещани субтипове като С (1,8%) също заслужават внимание, тъй като този субтип

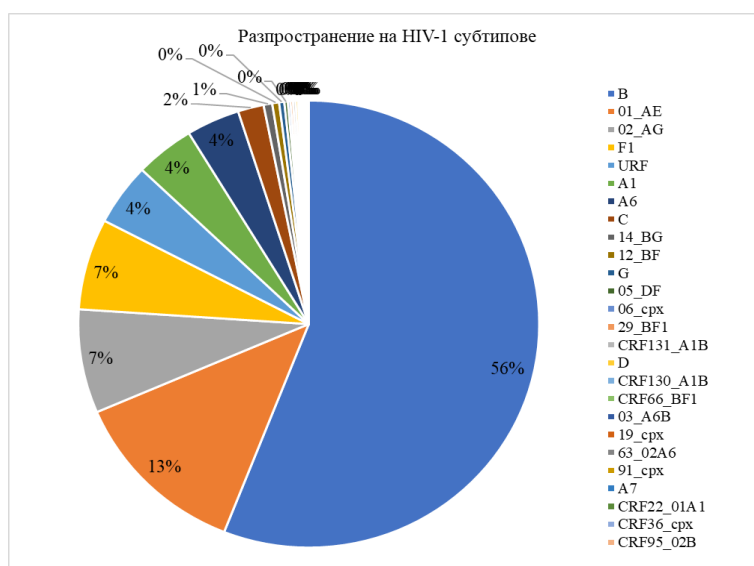
е свързан с високата честота на инфекциите в южната част на Африка, което предполага потенциален риск от трансмисия в други региони.

Рекомбинантните форми, включително 14_BG (0,6%) и 12_BF (0,5%), допълнително илюстрират генетичното разнообразие на вируса. Те подчертават сложността на разпространението и адаптацията на HIV-1 в различни географски и социални условия. Някои редки форми, като 05_DF, 06_cpx, 29_BF1, и CRF131_A1B, са идентифицирани с честота под 0,2%. Тези форми са изключително редки, но тяхното наличие сигнализира за необходимостта от изследвания и непрекъснато проследяване на новопоявяващи се варианти. Допълнително внимание заслужават единичните случаи на още по-редки субтипове, като 03_A6B, 19_cpx, 91_cpx, CRF22_01A1, и CRF95_02B. Тяхното идентифициране в рамките на това проучване е показател за изключителната чувствителност и прецизност на използваните методи за генотипиране.

Като цяло, анализът на субтиповете на HIV-1 в настоящото национално проучване разкрива изключително разнообразие от генетични варианти, което е от ключово значение за разбирането на епидемиологичните тенденции и разработването на ефективни стратегии за общественото здраве. Субтип В доминира, но наличието на значителен дял от други субтипове, като 01_AE, 02_AG, и F1, подчертава глобалния характер на епидемията. Освен това, идентифицирането на редки рекомбинантни форми показва сложността на вирусната еволюция и необходимостта от непрекъснат мониторинг.

Таблица 15. Двадесет и шест различни субтипове, CRFs и URFs.

№	Субтип	Брой	%
1	B	926	56,0
2	01_AE	208	12,6
3	02_AG	124	7,5
4	F1	109	6,6
5	URF	74	4,5
6	A1	69	4,2
7	A6	62	3,7
8	C	30	1,8
9	14_BG	10	0,6
10	12_BF	8	0,5
11	G	6	0,4
12	05_DF	4	0,2
13	06_cpx	3	0,2
14	29_BF1	3	0,2
15	CRF131_A1B	3	0,2
16	D	3	0,2
17	CRF130_A1B	2	0,1
18	CRF66_BF1	2	0,1
19	03_A6B	1	0,1
20	19_cpx	1	0,1
21	63_02A6	1	0,1
22	91_cpx	1	0,1
23	A7	1	0,1
24	CRF22_01A1	1	0,1
25	CRF36_cpx	1	0,1
26	CRF95_02B	1	0,1
	Тотал	1654	100,0



Фигура 17. Диаграма на двадесет и шест различни субтипове, CRFs и URFs.

4.3.2. Разпространение на резистентни мутации сред инфектирани с различни субтипове на HIV-1

В настоящото изследване е проведен подробен статистически анализ на разпределението на резистентните мутации сред различните субтипове на HIV-1. Основната цел е да се установи дали наблюдаваните разлики в честотата на резистентност сред субтиповете са статистически значими и да се предостави по-добро разбиране за епидемиологичните и терапевтичните последствия от тези различия.

Резултатите от анализа показват, че субтип **B**, който представлява 56% от всички изследвани случаи, демонстрира значителен дял от резистентни мутации (25,6%) (таблица 16 и фигура 18 A и B). Това се равнява на 237 резистентни мутации в рамките на този субтип. Статистическата значимост на този резултат е потвърдена с P -стойност < 0.050 , което показва, че разпределението на резистентните мутации в субтип B е значително спрямо останалите субтипове. Доминирането на субтип B е очаквано, като се има предвид неговата висока честота в други европейски страни, но идентифицирането на значим процент резистентност, подчертава необходимостта от непрекъснат мониторинг и адаптиране на терапевтичните подходи.

Субтип **F1**, който обхваща 6,6% от изследваните случаи, демонстрира най-високия процент резистентни мутации спрямо общия брой случаи в рамките на субтипа (94,5%). Това представлява 103 от общо 109 случая на субтип F1, в които са идентифицирани резистентни мутации. P -стойността за този субтип е изключително ниска ($P < 0.050$), което показва ясна статистическа значимост на наблюдаваните разлики. Уникалните рекомбинантни форми (**URF**) също демонстрират високи нива на резистентност, като 67,6% от случаите в тази група (50 от 74) съдържат резистентни мутации. Статистическата значимост на този резултат е потвърдена с $P < 0.050$, което предполага, че URF представлява важна група, която изисква специално внимание при планирането на терапевтични стратегии.

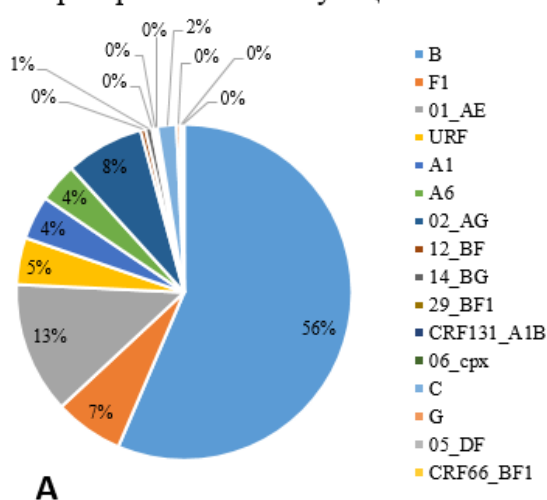
Въпреки че субтипове като **01_AE** и **A6** показаха умерени проценти на резистентни мутации (26,0% и 29,0%, съответно), техните P -стойности ($P = 0.266$ и $P = 0.904$) не показаха статистическа значимост. Това предполага, че разпределението на резистентността в тези субтипове може да е резултат от случайни фактори, а не от системни разлики. По-редките субтипове, като **29_BF1** и **CRF131_A1B**, показват 100% резистентност в наблюдаваните случаи (3 от 3). Тези резултати също са статистически значими ($P < 0.050$) и демонстрират критичната роля на редките субтипове в поддържането на резистентни популации. Субтиповете **A1** и **C**, които представляват 4,2% и 1,8% от общата извадка, демонстрират ниски нива на резистентни мутации (29,0% и 6,7%, съответно) и липса на статистическа значимост. Това предполага, че тези субтипове може да не играят значима роля в разпространението на резистентни мутации в популацията.

Изследването показва значителни различия в разпределението на резистентните мутации сред различните HIV-1 субтипове. Субтиповете B, F1 и URF се открояват с високи нива на резистентност и статистическа значимост, докато субтиповете A1, A6 и C показват по-ниски нива на резистентност без статистическа значимост. Тези резултати подчертават необходимостта от персонализирани терапевтични подходи, които отчитат генетичните особености на всеки субтип, както и необходимостта от по-нататъшни изследвания върху молекулярната основа на резистентността в различните субтипове.

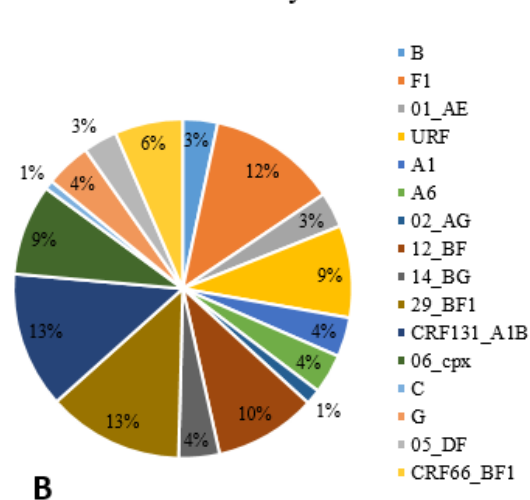
Таблица 16. Резистентни мутации спрямо субтиповете на HIV-1.

Субтип	Брой секвенции от съответния субтип	Брой резистентни мутации	% резистентни мутации спрямо съответния субтип	% резистентни мутации спрямо общия брой резистентни мутации = 519
B	926	237	25,6	45,7
F1	109	103	94,5	19,8
01_AE	208	54	26,0	10,4
URF	74	50	67,6	9,6
A1	69	20	29,0	3,9
A6	62	18	29,0	3,5
02_AG	124	14	11,3	2,7
12_BF	8	6	75,0	1,2
14_BG	10	3	30,0	0,6
29_BF1	3	3	100,0	0,6
CRF131_A1B	3	3	100,0	0,6
06_cpx	3	2	66,7	0,4
C	30	2	6,7	0,4
G	6	2	33,3	0,4
05_DF	4	1	25,0	0,2
CRF66_BF1	2	1	50,0	0,2
03_A6B	1			
19_cpx	1			
63_02A6	1			
91_cpx	1			
A7	1			
CRF130_A1B	2			
CRF22_01A1	1			
CRF36_cpx	1			
CRF95_02B	1			
D	3			
Grand Total	1654	519	NA	100,0

% резистентни мутации спрямо общия брой резистентни мутации



% резистентни мутации спрямо съответния субтип



Фигура 18. Резистентни мутации спрямо общия брой и спрямо субтиповете на HIV-1. А) Процент на резистентни мутации спрямо общия брой резистентни мутации и Б) Процент на резистентни мутации спрямо съответния субтип.

4.3.3. Разпространение на различните субтипове на HIV-1 при двата пола

В проучването беше изследвано разпределението на HIV-1 субтиповете сред мъже и жени, като се изчисляват Р-стойности за статистическа значимост на разликите. Р-стойностите показват вероятността наблюдаваните разлики да са случайни. Резултатите показват, че сред общо 1654 регистрирани случая, разпределението между мъже и жени е 84,4% и 15,6%, съответно (таблица 17 и фигура 19).

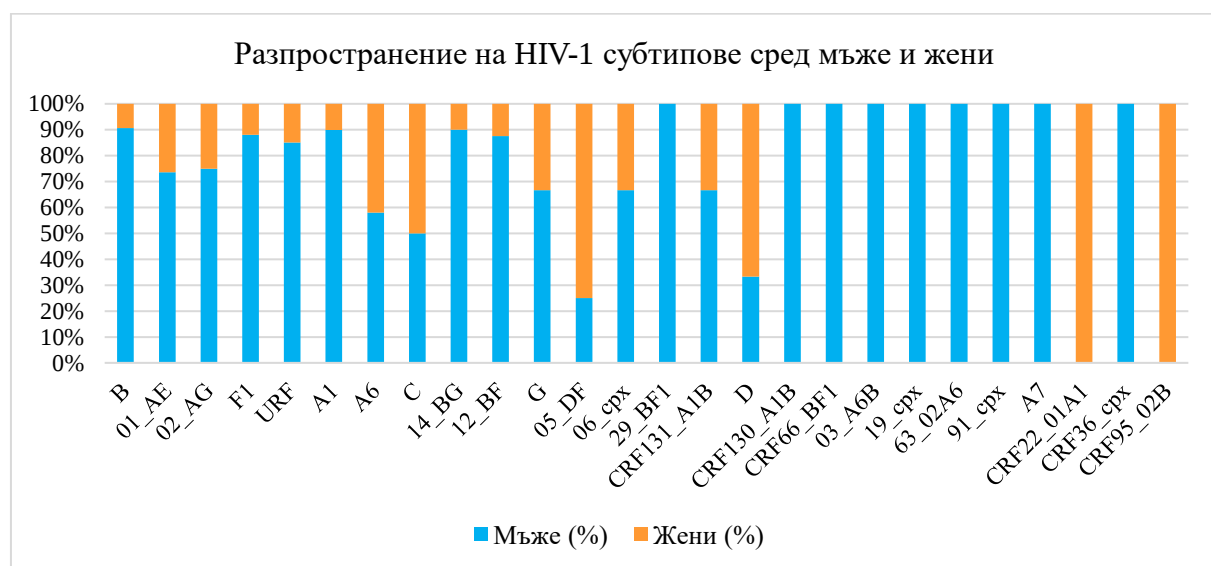
HIV-1 субтип В е най-разпространен (55,99%), като значителна част от случаите са регистрирани сред мъжете (90,6%). Р-стойността за този субтип беше $< 0,001$, което показва силно статистически значима разлика между половете. Субтип 01_AE (12,58%) също демонстрира значима разлика между половете, като случаите сред мъжете съставляват 73,6%, а сред жените – 26,4% ($P < 0,001$). Подобна тенденция се наблюдава и за субтиповете 02_AG ($P < 0,001$), F1 ($P < 0,001$) и URF ($P < 0,001$).

За разлика от тях, субтиповете А6 и С показват по-равномерно разпределение между половете. Например, при субтип А6 58,1% от случаите са сред мъжете, а 41,9% – сред жените. Субтип С е равномерно разпределен между мъжете и жените (50% срещу 50%). Някои редки субтипове, като 14_BG, 12_BF и 05_DF, показаха по-малък брой случаи.

В обобщение, резултатите от анализа потвърждават наличието на значими разлики в разпределението на HIV-1 субтиповете между половете, като тези разлики са най-изразени при основните субтипове В, 01_AE, 02_AG, F1 и URF. Наличието на неравномерно разпределение за някои субтипове вероятно е свързано с фактори като доминиращото разпространение на субтип В сред МСМ, 01_AE при венозни наркомани в област София и 02_AG при венозни наркомани в област Пловдив.

Таблица 17. Разпространение на различните субтипове на HIV-1 при двата пола.

HIV-1 Субтип	HIV-1 Субтип брой (%)	Мъже брой (%)	Жени брой (%)	P-стойност
B	926 (55,99)	839 (90,6)	87 (9,4)	< 0.001
01_AE	208 (12,58)	153 (73,6)	55 (26,4)	< 0.001
02_AG	124 (7,5)	93 (75)	31 (25)	< 0.001
F1	109 (6,59)	96 (88,1)	13 (11,9)	< 0.001
URF	74 (4,47)	63 (85,1)	11 (14,9)	< 0.001
A1	69 (4,17)	62 (89,9)	7 (10,1)	< 0.001
A6	62 (3,75)	36 (58,1)	26 (41,9)	< 0.001
C	30 (1,81)	15 (50)	15 (50)	
14_BG	10 (0,6)	9 (90)	1 (10)	
12_BF	8 (0,48)	7 (87,5)	1 (12,5)	
G	6 (0,36)	4 (66,7)	2 (33,3)	
05_DF	4 (0,24)	1 (25)	3 (75)	
06_cpx	3 (0,18)	2 (66,7)	1 (33,3)	
29_BF1	3 (0,18)	3 (100)		
CRF131_A1B	3 (0,18)	2 (66,7)	1 (33,3)	
D	3 (0,18)	1 (33,3)	2 (66,7)	
CRF130_A1B	2 (0,12)	2 (100)		
CRF66_BF1	2 (0,12)	2 (100)		
03_A6B	1 (0,06)	1 (100)		
19_cpx	1 (0,06)	1 (100)		
63_02A6	1 (0,06)	1 (100)		
91_cpx	1 (0,06)	1 (100)		
A7	1 (0,06)	1 (100)		
CRF22_01A1	1 (0,06)		1 (100)	
CRF36_cpx	1 (0,06)	1 (100)		
CRF95_02B	1 (0,06)		1 (100)	
Total	1654	1396 (84,4)	258 (15,6)	



Фигура 19. Разпространение на различните субтипове при двата пола.

4.3.4. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред различните трансмисионни групи

В настоящото проучване е извършен детайлен анализ на разпределението на HIV-1 субтиповете по трансмисивни категории: ХЕТ, МСМ, ИВН и комбинация от МСМ и ИВН. Данните за трансмисията са получени от въпросник за самооценка на пациентите по време на диагностицирането на HIV инфекцията. Анализът идентифицира статистически значими разлики в разпределението на субтиповете между различните трансмисивни категории, като беше използвана граница на значимост $P < 0,05$.

Резултатите показаха, че HIV-1 субтип В, който е най-разпространен (55,99%), има значителна асоциация с категориите МСМ ($P < 0,001$) и ХЕТ ($P < 0,001$) (таблица 18 и фигура 20). Това демонстрира доминиращото му разпространение сред ключовите трансмисивни групи. Субтипът беше установен като преобладаващ при МСМ, което подчертава високата уязвимост на тази група към този субтип. CRF01_AE (12,58%) също показва статистически значима асоциация с категориите ХЕТ ($P < 0,001$) и ИВН ($P < 0,001$). Неговото високо разпространение сред ИВН, предполага значителна връзка между този субтип и споделянето на инжекционни инструменти. CRF02_AG (7,5%) демонстрира значими разлики при категориите ХЕТ ($P < 0,001$), ИВН ($P < 0,001$) и МСМ+ИВН ($P < 0,001$). Този субтип е особено разпространен сред хората, които са изложени на множество рискови фактори, като комбиниране на сексуални и инжекционни рискови практики. Субтип F1 (6,59%) има значима връзка с МСМ ($P < 0,001$). Този субтип е силно разпространен сред МСМ, и сред ХЕТ предавания, което го прави важен обект на внимание при програми за профилактика. Резултатите за по-редките субтипове F1 и URF показаха незначими асоциации с някои трансмисивни категории ($P > 0,05$). Например, субтип F1 не демонстрира статистически значима връзка с ХЕТ ($P = 0,176$), докато субтип URF показва слаба асоциация с ХЕТ ($P = 0,282$). За разлика от тях, субтип С демонстрира силна значима асоциация с ХЕТ ($P < 0,001$).

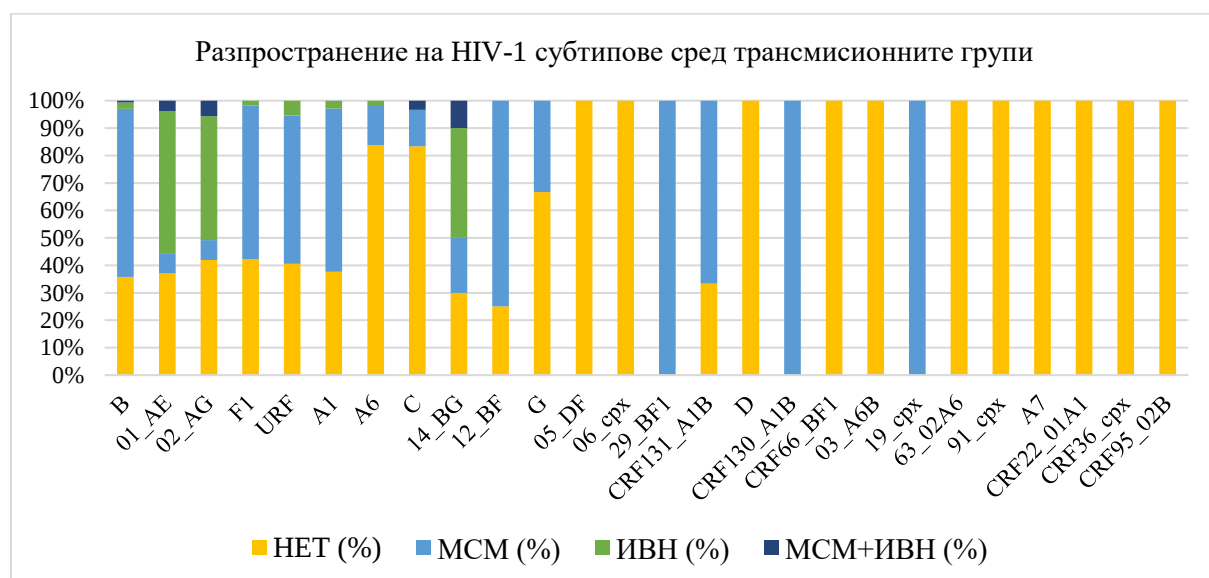
Данните подчертават значителното разпространение на субтиповете В, 01_AE, и 02_AG сред уязвимите групи, като МСМ, и хора, които употребяват инжекционни наркотици (ИВН). Групата МСМ показва висока концентрация на субтип В, което предполага специфична динамика на разпространението, вероятно свързана със социални и поведенчески фактори, като сексуалната мрежа и достъпа до профилактика. За групата ИВН значителното разпространение на субтипове като 01_AE и 02_AG, отразява ролята на споделяните инжекционни инструменти като основен механизъм на предаване.

В обобщение, анализът потвърждава, че разпределението на HIV-1 субтиповете варира значително между различните трансмисивни категории. Основните субтипове В, 01_AE и 02_AG показаха най-силно изразена асоциация с ключовите трансмисивни групи, като МСМ и ИВН. Наблюденията подчертават важността на насочените интервенции, като програми за профилактика и лечение, адаптирани към особеностите на тези уязвими групи.

Таблица 18. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред различните трансмисионни групи.

HIV-1 Субтип	ХЕТ	МСМ	ИБН	МСМ+ ИБН	Р*- стойности (ХЕТ)	Р*- стойности (МСМ)	Р*- стойности (ИБН)	Р*- стойности (МСМ+ ИБН)
B	331	567	22	6	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
01_AE	77	15	108	8	< 0.001	< 0.073	< 0.001	< 0.001
02_AG	52	9	56	7	< 0.001	< 0.115	< 0.001	< 0.001
F1	46	61	2	0	< 0.176	< 0.001		
URF	30	40	4	0	0,282	< 0.001		
A1	26	41	2	0	0,086	< 0.05		
A6	52	9	1	0	0.002	< 0.001		
C	25	4	0	1	< 0.001	< 0.001		
14_BG	3	2	4	1				
12_BF	2	6	0	0				
G	4	2	0	0				
05_DF	4	0	0	0				
06_cpx	3	0	0	0				
29_BF1	0	3	0	0				
CRF131_A1B	1	2	0	0				
D	3	0	0	0				
CRF130_A1B	0	2	0	0				
CRF66_BF1	2	0	0	0				
03_A6B	1	0	0	0				
19_cpx	0	0	0	0				
63_02A6	1	0	0	0				
91_cpx	1	0	0	0				
A7	1	0	0	0				
CRF22_01A1	1	0	0	0				
CRF36_cpx	1	0	0	0				
CRF95_02B	1	1	0	0				

*Р, Значими са стойности < 0,05



Фигура 20. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред различните трансмисионни групи.

4.3.5. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред лица инфектирани в България и чужбина

В настоящото проучване беше извършен статистически анализ на разпределението на HIV-1 субтиповете по произход на инфекцията: инфектирани в България и внесени вируси от чужбина. Данните за географския произход на придобиване на инфекцията е получен от въпросник за самооценка на пациентите по време на диагностицирането на HIV инфекцията. Анализът идентифицира статистически значими разлики в разпределението за някои от субтиповете.

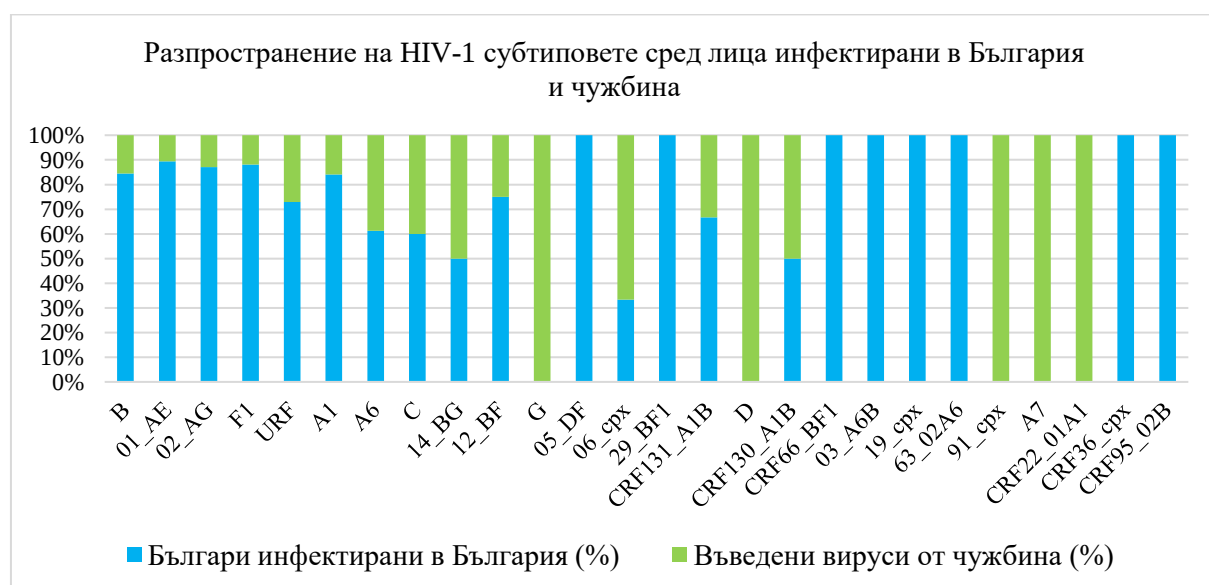
HIV-1 субтип **B**, който е най-разпространен в България, показва висока честота на инфекции, настъпили в страната (84,4%), и сравнително малък процент на внесени вируси (15,6%). Р-стойностите за тези разлики са силно значими ($P < 0,001$) (таблица 19 и фигура 21). Субтип **01_AE** също показва доминиращо разпространение сред инфектираните в България (89,4%), с нисък процент на внесени вируси (10,6%), като разликите са статистически значими ($P < 0,001$). Подобни тенденции се наблюдават при субтиповете **02_AG** и **F1**, които също демонстрират високи нива на разпространение в България (87,1% и 88,1%, съответно) с ниски проценти на внесени вируси ($P < 0,001$ за двата субтипа).

Субтип **A6** е интересен случай, при който процентът на внесените вируси е по-висок (38,7%) в сравнение с други субтипове, въпреки че все пак доминират инфекциите в България (61,3%). Р-стойността за разликите е незначима ($P > 0,05$). Това до известна степен може да се дължи и на притока на бежанци от Украйна след войната на Русия срещу Украйна от 2022 г., а преди това, от посещението на туристи от Русия и бившите страни на Съветския съюз.

Някои редки субтипове, като **05_DF**, **29_BF1**, и **CRF66_BF1**, показват изключително висока локална концентрация (100% инфекции в България). За разлика от тях, субтипове като **G**, **D**, и **A7** са изцяло внесени от чужбина (100%), което подчертава важноста на международното движение на хора за разпространението на тези субтипове. В обобщение, анализът показва, че основните HIV-1 субтипове, като **B**, **01_AE** и **02_AG**, доминират сред инфекциите, настъпили в България, докато някои по-редки субтипове са основно внесени. Наблюденията подчертават значението на епидемиологичния мониторинг и насочените интервенции за ограничаване на разпространението на HIV-1 в страната.

Таблица 19. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред инфектирани в България и чужбина.

HIV-1 Субтип	Инфектирани в България %	Инфектирани в чужбина %	P-value (България)	P-value (Внесени от чужбина)
B	84,4	15,6	< 0.001	< 0.001
01_AE	89,4	10,6	< 0.001	< 0.001
02_AG	87,1	12,9	< 0.001	< 0.001
F1	88,1	11,9	< 0.001	< 0.001
URF	73	27	< 0.001	< 0.001
A1	84,1	15,9	< 0.001	< 0.001
A6	61,3	38,7	0.110	0.110
C	60	40	0.157	0.157
14_BG	50	50		
12_BF	75	25		
G	0	100		
05_DF	100	0		
06_cpx	33,3	66,7		
29_BF1	100	0		
CRF131_A1B	66,7	33,3		
D	0	100		
CRF130_A1B	50	50		
CRF66_BF1	100	0		
03_A6B	100	0		
19_cpx	100	0		
63_02A6	100	0		
91_cpx	0	100		
A7	0	100		
CRF22_01A1	0	100		
CRF36_cpx	100	0		
CRF95_02B	100	0		



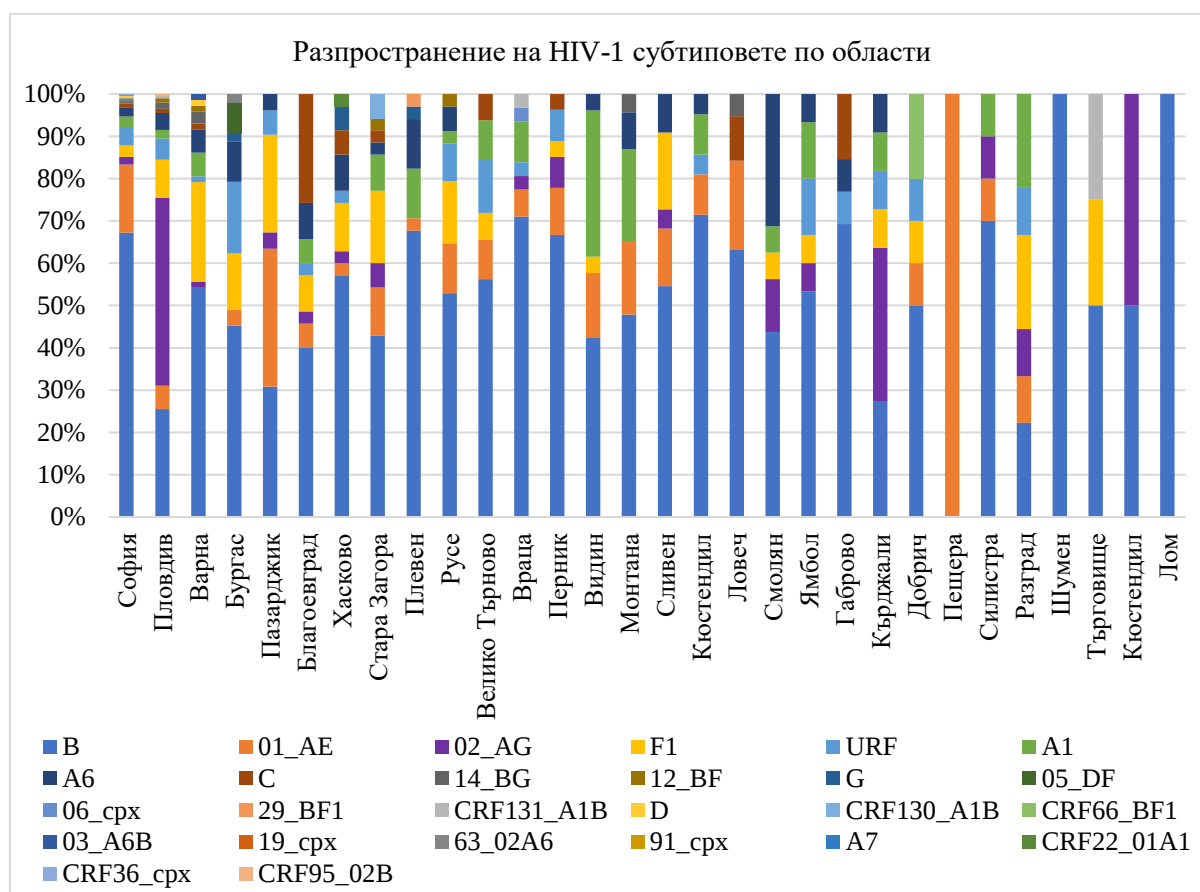
Фигура 21. Разпространение на HIV-1 субтиповете сред инфектирани в България и чужбина.

4.3.6. Разпространение на HIV-1 субтипове по области в България

Данните разкриват голямо разнообразие от HIV-1 субтипове, неравномерно разпределени по българските региони. София концентрира най-голям брой случаи с преобладаване на субтип В (533 случая), следван от 01_AE (128 случая) и значително присъствие на други варианти (фигура 22).

Регионалните различия са съществени - докато в Пловдив субтипът 02_AG (89 случая) превъзхожда В (51 случая), в други градове като Варна и Бургас се наблюдават различни модели на разпределение. Някои градове, като Пещера показват ограничено разнообразие.

Особено внимание заслужава присъствието на множество CRF и URF, които свидетелстват за сложна молекулярна епидемиология. Големите градове демонстрират по-голямо генетично разнообразие в сравнение с по-малките центрове.



Фигура 22 Разпространение на HIV-1 субтипове по области в България.

4.3.7. Обобщение върху анализа на HIV-1 субтиповете в България

Разнообразие на HIV-1 субтиповете

Настоящото проучване анализира разпространението на HIV-1 субтиповете в България при изследване на 1654 лица с HIV-1 инфекция. Разнообразието от HIV-1 субтипове е от съществено значение за по-доброто разбиране на епидемиологичните тенденции на епидемията в България (таблица 20).

Резултатите показват, че субтип В е най-разпространен, като представлява 56,0% от всички случаи. Следващите по честота субтипове са 01_AE (12,6%) и 02_AG (7,5%). Субтип F1 (6,6%) и URF (4,5%) също имат значимо присъствие, което показва сложността на вирусната еволюция и трансграничната динамика на инфекцията. A1 (4,2%) и A6 (3,7%) вероятно отразяват влиянието на регионални епидемии в Русия и Украйна. По-редките субтипове като С (1,8%), които са доминирали в Африка, също са открити в проучваната популация, което подчертава глобалния характер на HIV-1 разпространението. Някои рекомбинантни форми, включително 14_BG (0,6%) и 12_BF (0,5%), и дори по-редки субтипове като 05_DF, 06_crx и CRF131_A1B с честота под 0,2%, също са идентифицирани, което доказва високата чувствителност на прилаганите методи за генотипиране.

Анализът на резистентността към антиретровирусна терапия показва значителни разлики между субтиповете. Субтип В, който доминира сред изследваните случаи, също има висок процент на резистентни мутации (25,6%, $P < 0,050$). Субтип F1 демонстрира най-високия процент резистентни мутации (94,5%, $P < 0,050$), което означава, че почти всички случаи в тази група съдържат резистентни мутации. URF също показва значителна резистентност (67,6%, $P < 0,050$), което подчертава неговата роля в поддържането на резистентни вирусни популации. От друга страна, субтипове като 01_AE и A6 имат умерени нива на резистентност (26,0% и 29,0%), но разликите при тях не са статистически значими ($P = 0,266$ и $P = 0,904$). Редки субтипове като 29_BF1 и CRF131_A1B показват 100% резистентност, което е статистически значимо ($P < 0,050$) и предполага, че тези субтипове могат да играят важна роля в разпространението на резистентни щамове.

Разпределението на субтиповете по пол показва значими разлики. Мъжете съставляват 84,4% от всички случаи, а жените 15,6%. Субтип В е най-често срещан (55,99%), като преобладава при мъжете (90,6%, $P < 0,001$). Субтип 01_AE (12,58%) също показва значима разлика между половете (73,6% при мъжете, 26,4% при жените, $P < 0,001$). Подобна тенденция се наблюдава при 02_AG, F1 и URF ($P < 0,001$), докато субтип A6 (58,1% при мъжете, 41,9% при жените) и С (50%/50%), показват равномерно разпределение и липса на статистически значима разлика.

Анализът на субтиповете сред различните трансмисивни групи идентифицира значителни разлики. Субтип В доминира при МСМ ($P < 0,001$) и ХЕТ ($P < 0,001$), което показва високата уязвимост на тези групи. Субтип 01_AE ($P < 0,001$) и 02_AG ($P < 0,001$) са свързани основно с ИВН, като отразяват динамиката на разпространение сред венозни наркозависими. От по-редките субтипове, URF ($p = 0.032$), A6 ($p < 0.001$) и С ($p < 0.001$) показват статистически значими разлики по трансмисионни категории, докато A1 ($p = 0.086$) и F1 ($p = 0.176$) не достигат конвенционалното ниво на значимост ($P < 0.05$). Данните подчертават високата концентрация на субтип В сред МСМ, което може да се обясни със социални и поведенчески фактори, както и с по-ограничения достъп до превантивни мерки. От друга страна, субтипове като 01_AE и 02_AG са преобладаващи сред ИВН, което вероятно се дължи на споделените инжекционни инструменти.

Статистическият анализ на произхода на инфекцията показва, че основните субтипове (B, 01_AE и 02_AG) доминират сред инфектираните в България. Субтип B е най-разпространен (84,4%) сред инфектираните в страната, с $P < 0,001$, което доказва неговото локално разпространение. Субтип 01_AE (89,4%) и 02_AG (87,1%) също показват доминиращо разпространение в България. За разлика от тях, някои субтипове като G, D и A7 са 100% внесени от чужбина, което подчертава влиянието на международните пътувания върху разпространението на вируса. Субтип A6 (61,3% местни, 38,7% внесени, $P > 0,05$) може да отразява наскоро увеличеното движение на хора от Украйна и Русия.

Настоящото проучване разкрива изключително генетично разнообразие на HIV-1 в България, като субтип B е доминиращ, но съществува значителен дял от 01_AE, 02_AG, F1 и URF. Разпределението на субтиповете варира значително по пол, трансмисивна категория и произход на инфекцията. Субтиповете B, F1 и URF демонстрират високи нива на резистентност, докато A6 и C не показват значима разлика.

Таблица 20. Анализ върху HIV-1 субтиповете при различни категории.

HIV-1 Субтип	HIV-1 Субтип брой (%)	Пол		Трансмисионна категория				Място на инфектиране		Резистентни мутации
		Мъже (%)	Жени (%)	ХЕТ (%)	МСМ (%)	ИВН (%)	МСМ+ИВН (%)	Българи инфектирани в България (%)	Въведени вируси от чужбина (%)	Наличие на резистентна мутация (%)
B	926 (56)	839 (90,6)	87 (9,4)	331 (35,7)	567 (61,2)	22 (2,4)	6 (0,6)	782 (84,4)	144 (15,6)	237 (25,6)
01_AE	208 (12,6)	153 (73,6)	55 (26,4)	77 (37)	15 (7,2)	108 (51,9)	8 (3,8)	186 (89,4)	22 (10,6)	54 (26)
02_AG	124 (7,5)	93 (75)	31 (25)	52 (41,9)	9 (7,3)	56 (45,2)	7 (5,6)	108 (87,1)	16 (12,9)	14 (11,3)
F1	109 (6,6)	96 (88,1)	13 (11,9)	46 (42,2)	61 (56)	2 (1,8)		96 (88,1)	13 (11,9)	103 (94,5)
URF	74 (4,5)	63 (85,1)	11 (14,9)	30 (40,5)	40 (54,1)	4 (5,4)		54 (73)	20 (27)	50 (67,6)
A1	69 (4,2)	62 (89,9)	7 (10,1)	26 (37,7)	41 (59,4)	2 (2,9)		58 (84,1)	11 (15,9)	20 (29)
A6	62 (3,7)	36 (58,1)	26 ()	52 (83,9)	9 (14,5)	1 (1,6)		38 (61,3)	24 (38,7)	18 ()
C	30 (1,8)	15 (50)	15 (41,9)	25 (83,3)	4 (13,3)		1 (3,3)	18 (60)	12 (40)	2 (29)
14_BG	10 (0,6)	9 (90)	1 (10)	3 (30)	2 (20)	4 (40)	1 (10)	5 (50)	5 (50)	3 (30)
12_BF	8 (0,5)	7 (87,5)	1 (12,5)	2 (25)	6 (75)			6 (75)	2 (25)	6 (75)
G	6 (0,4)	4 (66,7)	2 (33,3)	4 (66,7)	2 (33,3)				6 (100)	2 (33,3)
05_DF	4 (0,2)	1 (25)	3 (75)	4 (100)				4 (100)		1 (25)
06_cpx	3 (0,2)	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)				1 (33,3)	2 (66,7)	2 (66,7)
29_BF1	3 (0,2)	3 (100)	0		3 (100)			3 (100)		3 (100)
CRF131_A1B	3 (0,2)	2 (66,7)	1 (33,3)	1 (33,3)	2 (66,7)			2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)
D	3 (0,2)	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100)					3 (100)	
CRF130_A1B	2 (0,1)	2 (100)	0		2 (100)			1 (50)	1 (50)	
CRF66_BF1	2 (0,1)	2 (100)	0	2 (100)				2 (100)		1 (50)
03_A6B	1 (0,1)	1 (100)	0	1 (100)				1 (100)		
19_cpx	1 (0,1)	1 (100)	0		1 (100)			1 (100)		
63_02A6	1 (0,1)	1 (100)	0	1 (100)				1 (100)		
91_cpx	1 (0,1)	1 (100)	0	1 (100)					1 (100)	
A7	1 (0,1)	1 (100)	0	1 (100)					1 (100)	
CRF22_01A1	1 (0,1)		1 (100)	1 (100)					1 (100)	
CRF36_cpx	1 (0,1)	1 (100)	0	1 (100)				1 (100)		
CRF95_02B	1 (0,1)		1 (100)	1 (100)				1 (100)		
	1654 (100)	1396 (84,4)	258 (15,6)	668 (40,4)	764 (46,2)	199 (12)	23 (1,4)	1369 (82,8)	285 (17,2)	519 (31,4)

4.4. Анализ на трансмисионните клъстери

В настоящото изследване е приложен филогенетичен анализ за идентификация на трансмисионни клъстери при HIV-1, като се обръща внимание на субтиповото разпределение и наличието на резистентни мутации в рамките на клъстерите. Използван е методът на максималната вероятност (Maximum Likelihood, ML) за реконструкция на филогенетични дървета, като най-подходящият модел на нуклеотидно заместване е избран сред 88 налични модела.

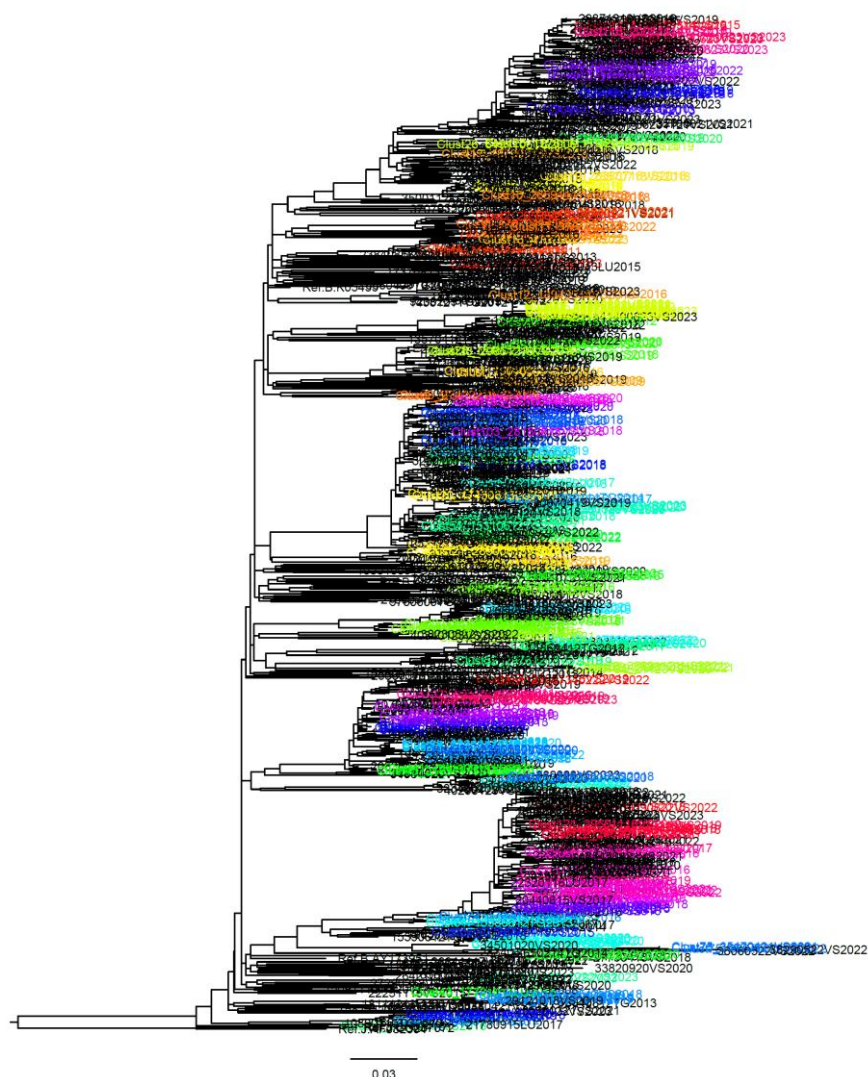
За дефиниране на клъстерите е приложен генетичен праг от 1,5%, който се използва широко в литературата за разграничаване на тясно свързани вирусни варианти. Филогенетичните дървета и съответните набори от секвенции са анализирани чрез ClusterPicker версия 1.3, като параметрите за класификация на клъстерите са Support threshold = 0.9 и Genetic distance threshold = 0.015. Допълнителна верификация на клъстерите е извършена с помощта на IQ-TREE версия 1.6.12.

Фокусът на анализа е насочен към субтиповете на HIV-1 и разпределението на мутациите, свързани с лекарствена резистентност, в рамките на трансмисионните клъстери. Настоящото изследване предоставя нови данни за епидемиологичните връзки между вирусните изолати, като може да допринесе за по-доброто разбиране на разпространението на лекарствено-резистентните варианти на HIV-1.

4.4.1. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип В

Филогенетичният анализ е извършен с реконструкция на филогенетично дърво, използвайки Maximum Likelihood (ML) алгоритъм и TVM+F+I+G4 като най-добър модел на еволюция, определен чрез Bayesian информационен критерий (BIC). Общият брой анализирани секвенции е 930 с дължина от 909 базови двойки. В резултат са идентифицирани 127 трансмисионни клъстера, съдържащи 298 секвенции (31.8% от общия брой).

Повечето клъстери са съставени от малък брой секвенции, като най-често те включват 2-3 секвенции (247 от общо 298 секвенции, или 82.9%). Клъстерите с повече от 6 секвенции са редки, като само 4 клъстера попадат в тази категория. Най-големият клъстер съдържа 10 секвенции. Това разпределение предполага ограничено локално предаване на вируса, без доминиращи разпространени клъстери с големи размери, Фигура 23.



Фигура 23. Филогенетични клъстери на HIV-1 субтип В. Филогенетичното дърво е реконструирано с Maximum Likelihood (ML) алгоритъм, използвайки IQ-TREE ver. 1.6.12, с 1000 повторения, използвайки програмата IQ-TREE ver. 1.6.12. Подборът на TVM+F+I+G4 като най-добър модел на еволюция е направен чрез Bayesian информационен критерий (BIC) измежду 88 тествани модела. Общият брой анализирани секвенции е 930, като дължината на секвенциите е 909 базови двойки. В резултат на анализа са идентифицирани 127 трансмисионни клъстера, съдържащи общо 298 секвенции (31.8% от всички анализирани секвенции). Цветните разклонения представляват статистически значими клъстери. Файл New_B.fasta_clusterPicks.nwk.figTree.

При протеазните инхибитори (PI) мутацията M46L е идентифицирана в клъстер 93, като тя намалява чувствителността към ATV и LPV. Мутацията L90M, която води до резистентност към SQV, IDV и NFV, е наблюдавана в клъстери 36 и 65. Допълнителната мутация L33F, която усилва резистентността в комбинация с други мутации, се открива в клъстер 16 (таблица 21).

Таблица 21. Резистентни мутации към PI в клъстери от HIV-1 субтип В.

PI мутации			
Главни PI резистентни мутации	Клъстер №	Допълнителни PI резистентни мутации	Клъстер №
M46L	93	L33F	16
L90M	36, 65		

При нуклеозидните инхибитори на обратната транскриптаза (NRTI), мутациите D67DE и S68G са идентифицирани в клъстер 73, което предполага намалена чувствителност към AZT и TDF. Мутацията S68G е установена в няколко клъстера (12, 25, 33, 62, 70, 73, 75), което подсказва нейното широко разпространение в локални вериги на предаване. Мутацията K219Q (клъстер 112) се асоциира с натрупването на допълнителни резистентни мутации, намаляващи ефективността на AZT (таблица 22).

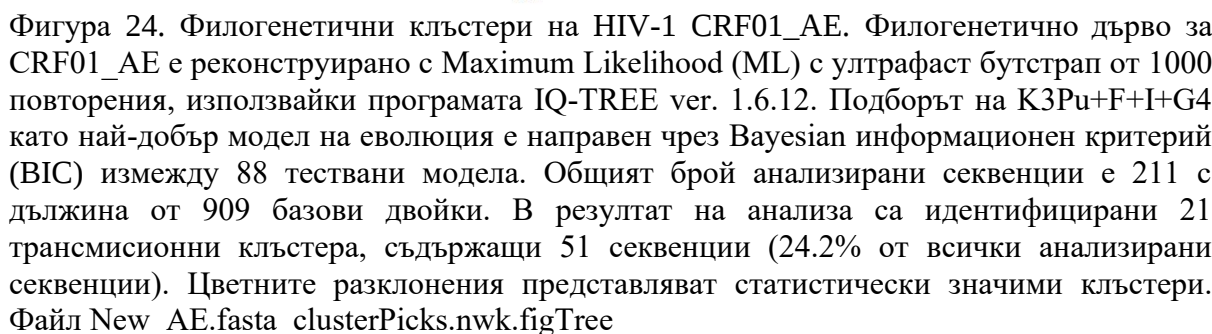
При ненуклеозидните инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTI), мутацията E138A е най-често срещаната и е идентифицирана в 9 клъстера (4, 9, 33, 41, 57, 64, 69, 96, 120). Тя е свързана с намалена чувствителност към RPV. Мутацията V179D, която може да повлияе на ефективността на EFV и NVP, се среща в 7 клъстера (26, 49, 56, 61, 63, 76, 88). Клъстер 33 съдържа двойна резистентност към NRTI (S68G) и NNRTI (E138A), което показва наличието на вирус с комбинирана резистентност към няколко класа антиретровирусни медикаменти (таблица 22).

Повечето клъстери при HIV-1 субтип В са малки, като най-честата големина е 2-3 секвенции. Ограниченият брой по-големи клъстери (над 6 секвенции) подсказва, че масовите разпространения в тази група са редки. Въпреки това, някои клъстери съдържат резистентни мутации, което има потенциално клинично значение. Най-често срещаните резистентни мутации са E138A, V179D (NNRTI) и S68G (NRTI). Присъствието на двойни резистентни профили в клъстери (например клъстер 33 с S68G и E138A), подчертава необходимостта от внимателен мониторинг на антиретровирусната терапия в тази популация. Резистентността към PI е по-рядко срещана, но мутациите M46L и L90M в отделни клъстери, могат да показват ограничено разпространение на вируси, резистентни към протеазни инхибитори.

Таблица 22. Резистентни мутации към NRTI и NNRTI в клъстери от HIV-1 субтип В.

NRTI резистентни мутации		NNRTI резистентни мутации	
Мутации	Клъстер №	Мутации	Клъстер №
D67DE,S68G	73	E138A	4,9,33,41,57,64,69,96,120
E44ED	82	E138EA	9
K219Q	112	E138EG	66
S68G	12, 25,33,62,70,73,75	E138EK	107
		E138G	28,39
		K101E,E138K	122
		K103KE	53
		V106I	7
		V108I	6
		V179D	26,49,56,61,63,76,88
		Y188YF	83

Повечето клъстери съдържат малък брой секвенции. Най-честият размер на клъстерите е 2 секвенции (32 от 51, или 62.7%), следван от клъстери с 3 секвенции (9 клъстера). Клъстерите с повече от 4 секвенции са редки, като само един клъстер съдържа 6 секвенции. Това разпределение показва, че предаването на CRF01_AE е ограничено до малки вериги на инфекция, което е характерно за локално разпространение (фигура 24).



Мутацията L33LF е идентифицирана в два клъстера (16, 17) и може да повлияе на чувствителността към протеазни инхибитори, усилвайки резистентността в комбинация с други мутации. Мутацията F53FY е установена в клъстер 20, което предполага наличие на вирусни варианти с намалена чувствителност към протеазни инхибитори (таблица 23). Мутацията S68G е открита в клъстер (8, 9, 10, 12, 19), което показва нейната разпространеност в локалните трансмисионни вериги. Тази мутация е свързана с намалена чувствителност към AZT и TDF. Мутацията S68SN е идентифицирана в клъстер 4, което допълнително подсказва за развитието на резистентност към NRTI в специфични клъстери. Мутацията V179VD е установена в клъстер 19 и е свързана с намалена чувствителност към EFV и NVP. Забележително е, че клъстер 19 съдържа двойна резистентност към NRTI (S68G) и NNRTI (V179VD), което подчертава наличието на вируси с комбинирана резистентност към различни класове антиретровирусни медикаменти.

Разпределението на клъстерите при CRF01_AE показва, че повечето от тях съдържат малък брой секвенции, което е характерно за ограничено локално разпространение. Въпреки това, присъствието на резистентни мутации като L33LF, F53FY, S68G и V179VD в няколко клъстера предполага потенциално натрупване на резистентност към различни антиретровирусни медикаменти. Двойната резистентност, наблюдавана в клъстер 19, изисква допълнително внимание, тъй като тези вирусни варианти могат да имат значителни клинични последици.

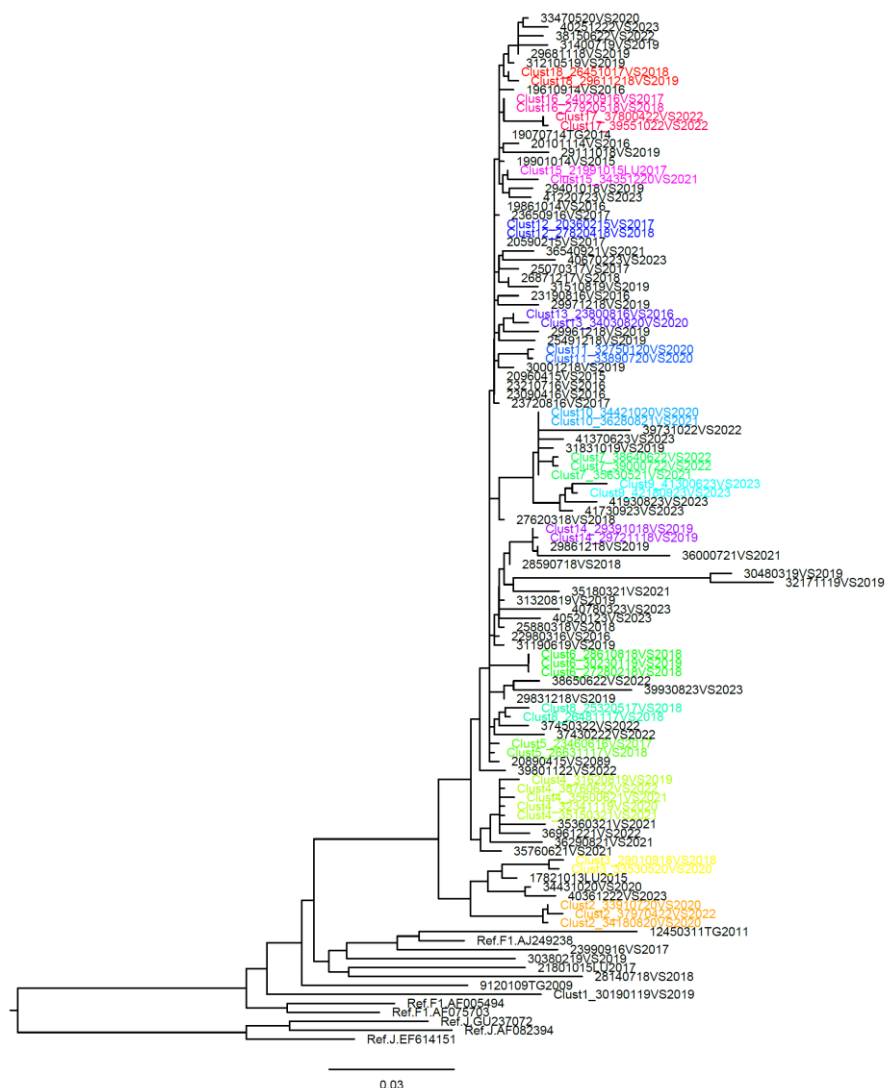
Таблица 23. Резистентни мутации към PI, NRTI и NNRTI в клъстери от CRF01_AE.

Допълнителни PI резистентни мутации		NRTI резистентни мутации		NNRTI резистентни мутации	
Мутации	Клъстер №	Мутации	Клъстер №	Мутации	Клъстер №
L33LF	16,17	S68G	8,9,10, 12,19	V179VD	19
F53FY	20	S68SN	4		

4.4.3. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип F

Анализът на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип F е проведен на 112 секвенции с дължина от 909 базови двойки. Общо са идентифицирани 18 трансмисионни клъстера, съдържащи 41 секвенции (36.6% от всички анализирани).

Повечето клъстери при HIV-1 субтип F съдържат малък брой секвенции. Най-често срещаният размер на клъстерите е 2 секвенции (26 от общо 41, или 63.4%). Клъстерите с 3, 5 и 6 секвенции са значително по-редки. Това разпределение показва, че предаването на HIV-1 субтип F в тази група е ограничено до малки вериги на инфекция, което е типично за локално разпространение (фигура 25).



Фигура 25. Филогенетични клъстери на HIV-1 субтип F. Филогенетично дърво реконструирано с Maximum Likelihood (ML) алгоритъм с ултрафаст бутстрап от 1000 повторения, използвайки програмата IQ-TREE ver. 1.6.12. Най-добрият модел на еволюция, определен чрез Bayesian информационен критерий (BIC) сред 88 тествани модела, е K3Ru+F+I+G4. Общият брой анализирани секвенции е 112 с дължина от 909 базови двойки. В резултат на анализа са идентифицирани 18 трансмисионни клъстера, съдържащи общо 41 секвенции (36.6% от всички анализирани секвенции). Цветните разклонения представляват статистически значими клъстери. Файл New_F.fasta_clusterPicks.nwk.figTree

Мутацията M46L е идентифицирана в два клъстера (1 и 2) и е свързана с намалена чувствителност към PI. Освен това, в клъстер 2 се наблюдава допълнителна мутация M46ML, която може да подсили резистентността. При NRTI мутацията S68G е установена в 8 клъстера (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), което предполага, че тя е широко разпространена в локалните трансмисионни вериги. При NNRTI мутацията E138A се наблюдава в клъстери 1 и 2. Мутацията V106I е най-често срещана и е установена в клъстери 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18. Клъстери 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 съдържат както мутацията S68G (NRTI), така и мутацията V106I (NNRTI), което предполага двойна резистентност в тези групи. Клъстер 10, който съдържа и S68SG, и V106VI, представлява особен интерес, тъй като тези мутации подсказват за наличие на

комбинирана резистентност към няколко класа антиретровирусни медикаменти, (таблица 24).

Разпределението на клъстерите при HIV-1 субтип F показва, че повечето от тях съдържат малък брой секвенции, което е характерно за ограничено локално разпространение. Наличието на резистентни мутации като M46L, M46ML, S68G, S68SG, E138A, V106I и V106VI в различни клъстери, подчертава потенциала за натрупване на резистентност към антиретровирусни терапии. Особен интерес представлява клъстер 10, който съдържа множество резистентни мутации, тъй като тези вирусни варианти могат да имат значителни клинични последици.

Таблица 24. Резистентни мутации в клъстери от HIV-1 субтип F.

Главни PI резистентни мутации		NRTI резистентни мутации		NNRTI резистентни мутации	
Мутации	Клъстер №	Мутации	Клъстер №	Мутации	Клъстер №
M46L	1,2	S68G	3,4,5,6,7,8,9,10	E138A	1,2
M46ML	2	S68SG	18	V106I	4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18
				V106VI	10

4.4.4. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип A (A1 и A6)

Филогенетичното дърво на HIV-1 субтип A (суб-субтипове A1 и A6) има две главни разклонения: долното разклонение представлява суб-субтип A6, а горното A1. Анализът разкри наличието на клъстери с малък брой секвенции. Повечето клъстери съдържат 2 секвенции (26 от общо 38 секвенции, или 68.4%). Клъстерите с 3 секвенции са по-редки (12 секвенции, или 31.6%). Това разпределение е типично за ограничено локално разпространение, при което вирусът се предава в малки вериги на инфекция (фигура 26).

резистентни мутации при А6 може да показва различна еволюционна динамика или по-нисък селекционен натиск в тази група.

Таблица 25. Резистентни мутации в клъстери от HIV-1 субтип А1.

NRTI резистентни мутации		NNRTI резистентни мутации	
Мутации	Клъстер №	Мутации	Клъстер №
S68N	5	K103N	7

4.4.5. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 CRF02_AG

Филогенетичното дърво за HIV-1 CRF02_AG е реконструирано с помощта на Maximum Likelihood (ML) алгоритъм, като са анализирани 129 секвенции с дължина от 909 базови двойки. Идентифицирани са 17 клъстера, съдържащи общо 38 секвенции (29.5% от всички анализирани секвенции). Повечето клъстери са съставени от малък брой секвенции. Клъстерите с 2 секвенции са най-често срещани (26 от общо 38 секвенции, или 68.4%). Клъстерите с 3 секвенции са по-редки (12 секвенции, или 31.6%). Това разпределение подсказва за ограничено локално разпространение на CRF02_AG, (фигура 27).

Резистентни мутации бяха идентифицирани в два клъстера. NRTI мутацията S68G е открита в клъстер 3 (таблица 26). Тази мутация е свързана с намалена чувствителност към нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза, което може да повлияе на ефективността на терапията с медикаменти като AZT и TDF. NNRTI мутацията K101E е установена в клъстер 1. Тази мутация е асоциирана с резистентност към ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза като EFV и NVP.

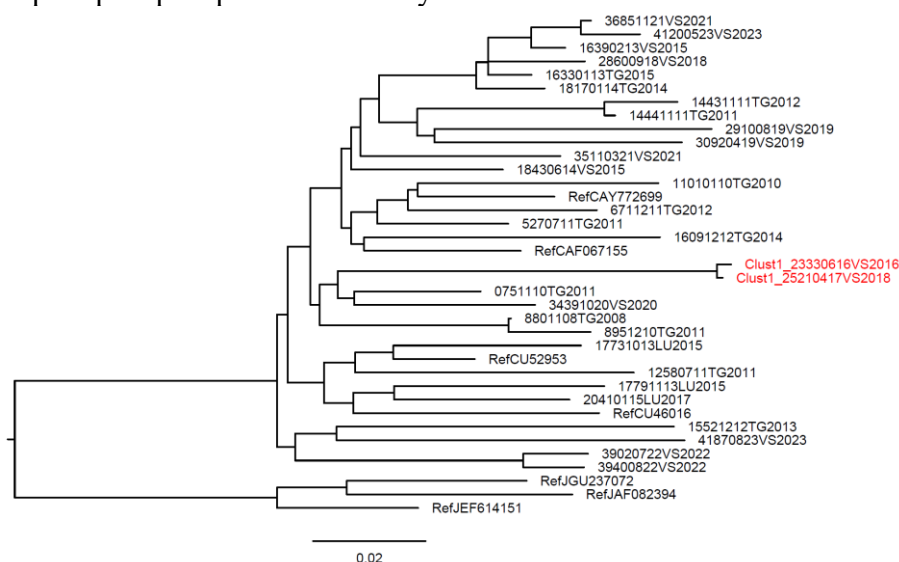
Клъстерите при HIV-1 CRF02_AG са предимно малки, с най-често срещани размери от 2 и 3 секвенции, което е характерно за ограничено локално разпространение. Резистентните мутации като S68G и K101E, идентифицирани в два различни клъстера, подчертават необходимостта от мониторинг на тези генотипове, тъй като те могат да компрометират ефективността на антиретровирусната терапия.

4.4.6. Анализ на филогенетичните клъстери при HIV-1 субтип С

Филогенетичното дърво за HIV-1 субтип С е реконструирано с Maximum Likelihood (ML) алгоритъм, използвайки програмата IQ-TREE ver. 1.6.12. Най-добрият модел на еволюция, избран чрез Bayesian information criterion (BIC), е TIM3+F+I+G4. Общият брой анализирани секвенции е 37, с дължина от 909 базови двойки.

В резултат на анализа е идентифициран само един клъстер, съдържащ 2 секвенции. Това представлява 5.4% от общия брой секвенции, включени във филогенетичното дърво. Наличието на само един клъстер с минимален размер подсказва, че разпространението на субтип С в тази популация е много ограничено и че инфекцията се предава в изолирани случаи (фигура 28).

Не са открити резистентни мутации в клъстера при този субтип. Това предполага липса на селекционен натиск за развитие на резистентност в разглежданите вирусни изолати. Филогенетичният анализ на HIV-1 субтип С разкрива много ограничено разпространение, с един идентифициран клъстер, съдържащ само 2 секвенции. Отсъствието на резистентни мутации е положителен индикатор за ефективността на антиретровирусната терапия в тази популация. Тези данни подчертават изолирания характер на разпространението на субтип С.



Фигура 28. Филогенетични клъстери на HIV-1 субтип С. Филогенетичното дърво е реконструирано с Maximum Likelihood (ML) алгоритъм с ултрафаст бутстрап от 1000 повторения, използвайки програмата IQ-TREE ver. 1.6.12. Най-добрият модел на еволюция, определен чрез Bayesian информационен критерий (BIC) сред 88 тествани модела, е TIM3+F+I+G4. Общият брой анализирани секвенции е 37 с дължина от 909 базови двойки, общ брой клъстери 1, общ брой секвенции участващи в клъстери 2. Цветните разклонения представляват статистически значим клъстер. Файл: C.fasta_clusterPicks.nwk.figTree.figTree.

4.4.7. Анализ на филогенетичните клъстери при URF

Уникалните рекомбинантни форми на HIV-1 играят важна роля в разпространението и еволюцията на вируса. Настоящият анализ цели да оцени

структурата на филогенетичните клъстери и да идентифицира резистентни мутации, които могат да повлияят на ефективността на антиретровирусната терапия.

Филогенетичното дърво, реконструирано с URFs на HIV-1, е анализирано чрез Maximum Likelihood (ML) алгоритъм. Общият брой анализирани секвенции е 77 с дължина от 909 базови двойки. Идентифицирани са 7 клъстера, съдържащи общо 29 секвенции (37.7% от всички анализирани секвенции) (таблица 27 и фигура 29). Клъстерите са разпределени по размер, като клъстерите с 2 секвенции са най-често срещани (8 секвенции, или 27.6% от всички клъстери). Клъстерите с 3 секвенции включват 6 секвенции, което представлява 20.7% от общия брой. Един клъстер съдържа 15 секвенции (51.7%), което го прави доминиращ по размер. Това разпределение показва хетерогенност в размера на клъстерите, с тенденция към наличие на няколко по-малки клъстера и един значително по-голям клъстер.

Анализът на NRTI резистентните мутации разкри, че мутацията S68G е идентифицирана в 6 клъстера (2, 3, 4, 5, 6, 7), което предполага нейното широко разпространение сред уникалните рекомбинантни форми. В клъстер 6 е установена комбинирана мутация S68G, T215TI, което подсказва за възможна повишена резистентност към антиретровирусните терапии.

Филогенетичният анализ на уникалните рекомбинантни форми на HIV-1 показва значително разнообразие в структурата на клъстерите, като един клъстер (с 15 секвенции) доминира по размер. Резистентните мутации, особено S68G, са широко разпространени в анализираните клъстери, а комбинираната мутация S68G, T215TI в клъстер 6 подчертава потенциалните предизвикателства за ефективността на антиретровирусната терапия.



Фигура 29. Филогенетични клъстери на URFs. Филогенетичното дърво е реконструирано с URFs на HIV-1, анализирано чрез Maximum Likelihood (ML) алгоритъм с ултрафаст бутстрап от 1000 повторения, използвайки програмата IQ-TREE

ver. 1.6.12. Най-добрият модел на еволюция, определен чрез Bayesian информационен критерий (BIC) сред 88 тествани модела, е TIM3+F+I+G4. Общият брой анализирани секвенции е 77 с дължина от 909 базови двойки, общ брой клъстери 7, общ брой секвенции участващи в клъстери 29. Цветните разклонения представляват статистически значим клъстер. Файл URF.fasta_clusterPicks.nwk.figTree

Таблица 27. Резистентни мутации в клъстери от HIV-1 URF.

NRTI резистентни мутации	
Мутации	Клъстер №
S68G	2,3,4,5,6,7
S68G,T215TI	6

4.5. Резултати от избрани публикации по темата на дисертацията

Въз основа на обширните данни, получени от анализа на 1654 секвенции от рол гена на HIV-1, изолирани от лица с HIV-1 инфекция в България за периода 1989-2023 г., бяха проведени серия от задълбочени специализирани изследвания. Тези анализи доведоха до публикуването на шест ключови научни статии в престижни международни списания, които представляват фокусирани проучвания на разпространението на антиретровирусната резистентност и HIV-1 субтипите в България.

Комплексността на HIV-1 епидемията в страната, изразена чрез значителното субтипово разнообразие и различните епидемиологични характеристики на отделните рискови групи, наложи прилагането на специализирани изследователски подходи за всеки основен субтип и популация. Всяка от представените публикации разглежда конкретни аспекти от молекулярната епидемиология, които изискват детайлен анализ и специфични методологии, надхвърлящи обхвата на общото изследване.

Първата публикация се фокусира върху лицата, употребяващи интравенозни наркотици, като изследва произхода и разпространението на HIV-1 сред тази уязвима популация. Анализът разкрива доминирането на циркулиращите рекомбинантни форми CRF01_AE и CRF02_AG сред интравенозните наркомани, като проследява тяхното географско разпределение и времевата динамика на въвеждането им в страната.

Втората и третата публикации представляват задълбочени анализи на най-разпространения субтип в България - субтип В. Чрез прилагане на Байесов коалесцентен подход и молекулярни часовници, тези изследвания реконструират еволюционната история на въвеждането и разпространението на тези варианти, като предоставят уникални данни за филогеографските връзки и демографската динамика на епидемията.

Четвъртото проучване е фокусирано върху втората най-разпространена форма на HIV-1 - CRF01_AE, като изследва специфично разпространение и характеристиките на тези вируси в българската популация.

Петата статия анализира произхода и разпространението на HIV-1 субтип С, един от първите HIV-1 щамове, въведени в България през ранните години на епидемията. Това изследване представя първия детайлен анализ на този субтип в региона на Югоизточна Европа и разкрива многобройните въвеждания от различни части на света.

Шестата публикация представлява всеобхватно проучване на трансмисионната антиретровирусна резистентност сред наивни за антиретровирусна терапия пациенти в България. Анализът на 1053 лица за периода 2012-2020 г. предоставя критично важни

данни за разпространението на резистентни мутации и тяхното групиране в трансмисионни клъстери от различни субтипове и рискови групи.

Тези публикации са публикувани в реномирани международни списания с импакт фактор и принадлежат към първи и втори квартали, което потвърждава тяхната научна стойност и международно признание. Те предоставят уникални данни за молекулярната епидемиология на HIV-1 в България и региона на Югоизточна Европа, като допринасят значително за разбирането на глобалното разпространение на вируса.

В следващите раздели са представени основните резултати от всяка от тези шест ключови публикации, като се подчертават специфичните находки и тяхната връзка с общите резултати на настоящата разработка. Този подход позволява по-лесно проследяване на данните и демонстрира как отделните изследвания допринасят за цялостната картина на HIV-1 епидемията в България.

4.5.1. Произход и разпространение на HIV-1 при ИВН в България.

Публикация: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134816302015?np=y>

Демографски характеристики на изследваната популация и разпределение на HIV-1 по рискови групи

Демографските и епидемиологичните характеристики на ИВН с HIV-1 бяха сравнени с тези на останалата HIV-1-позитивна популация, регистрирана в България до 2011 г. Резултатите показват, че 88,9% от HIV-1-инфектираните ИВН са мъже — значително по-висок дял в сравнение с другите рискови групи (88,9% спрямо 70,4%, $p < 0,001$). Възрастта на ИВН варира между 17 и 43 години, със средна стойност от 26,4 години. Делът на младите пациенти под 19 години е значително по-висок сред ИВН спрямо останалите групи (11,1% срещу 5,1%, $p < 0,0001$).

ИВН са съсредоточени основно в големите градове София и Пловдив, като делът им в Пловдив е съществено по-висок в сравнение с други групи (46,2% срещу 8,5%, $p < 0,0001$). Повечето от ИВН (96,4%) посочват България като вероятно място на инфектиране, докато само 3,6% съобщават за вероятно заразяване в чужбина. Делът на ромските лица сред ИВН с HIV-1 е значително по-висок спрямо другите групи (39,8% срещу 2,1%, $p < 0,0001$), а подобна тенденция се наблюдава и сред лицата, съобщили че са били в затвор (33,1% срещу 2,8%, $p < 0,0001$).

Честота на антиретровирусна резистентност при ИВН

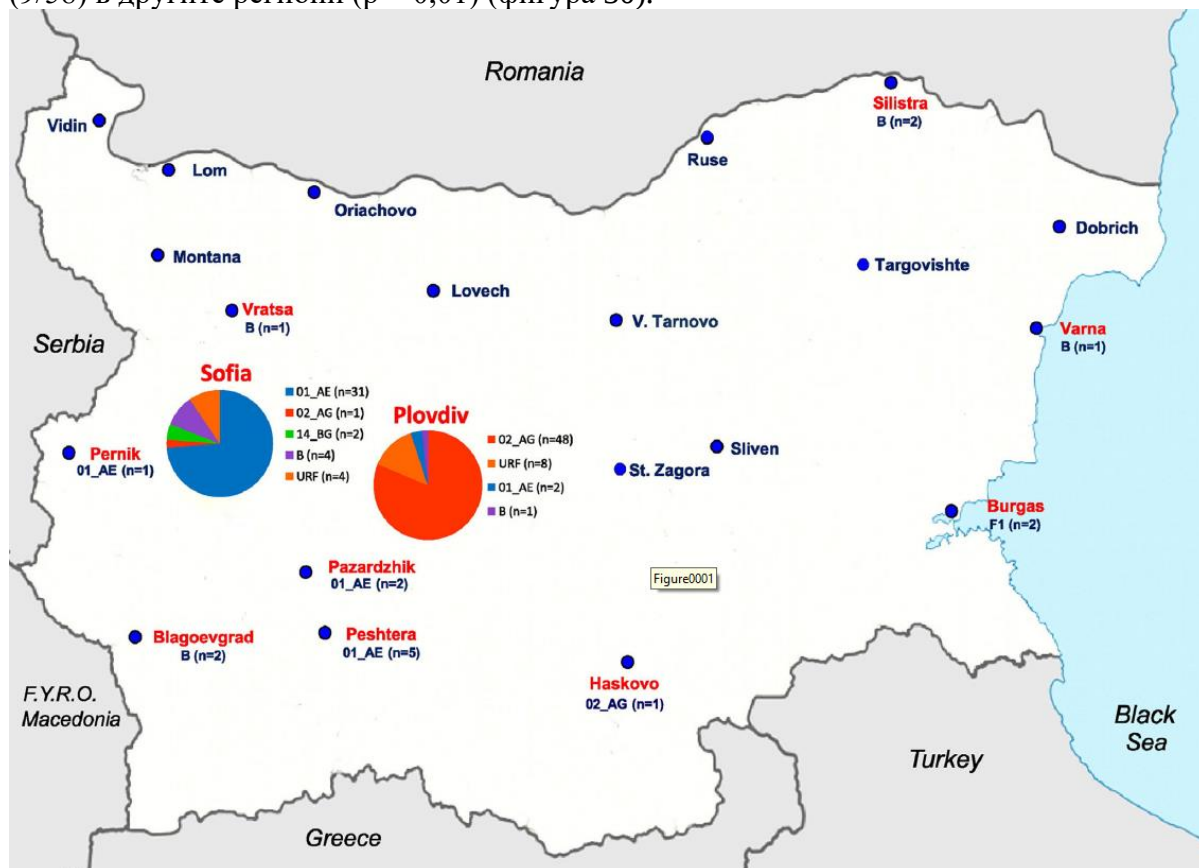
Общата честота на антиретровирусна резистентност в анализираната подгрупа от ИВН с HIV-1 възлиза на 6,8% (8/117), включително шест (5,1%) лекувани пациенти и два (1,7%) случая на предавани мутации при нелекувани индивиди. От тях, 2,6% (3/117) показват резистентност към NRTI (M41L, D67N, K70R, M184V, T215F, K219E), а 5,1% (6/117) към NNRTI (K103N, Y181C, Y188L, G190E). Резистентни мутации към PI не са установени. Единствената жена с резистентни мутации има шест мутации към NRTI; друг пациент показва резистентност както към NRTI, така и към NNRTI, а останалите шест индивида притежават единични мутации към една от двете групи.

HIV-1 субтипово разнообразие и географско разпределение при ИВН

Филогенетичният анализ разкрива широко субтипово разнообразие в групата на ИВН ($n = 117$), с преобладаване на CRFs, значителен дял URFs и под 9% случаи със субтип B. Сред 117-те pol секвенции, 42,7% ($n = 50$) са класифицирани като CRF02_AG,

35,0% (n = 41) като CRF01_AE, 10,3% (n = 12) са URFs, 8,5% (n = 10) субтип В, а по 1,7% (n = 2) — субтип F1 и CRF14_BG.

Географският анализ показва значимо преобладаване на CRF01_AE в София — 73,8% (31/42) срещу 13,3% (10/75) в другите региони ($p < 0,0001$). Обратно, 81,3% (48/59) от ИВН в Пловдив са инфектирани с CRF02_AG срещу 3,4% (2/58) в останалата страна ($p < 0,0001$). Субтип В е значително по-рядък в Пловдив — 1,7% (1/59) спрямо 15,5% (9/58) в другите региони ($p < 0,01$) (фигура 30).



Фигура 30. Географско разпределение на HIV-1 субтиповете сред ИВН в България. Кръговите диаграми показват разпределението на субтиповете в София и Пловдив. Броят на всеки субтип е посочен в скоби за по-малките градове. Градовете, в които са живели HIV-1-инфектирани ИВН, включени в нашето проучване, са отбелязани с червен текст.

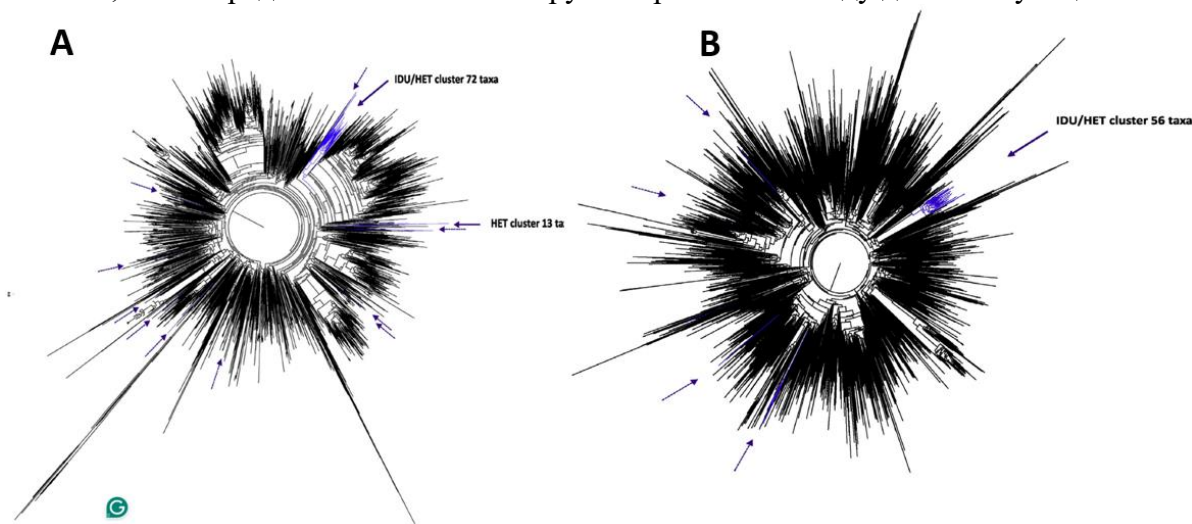
Сред лицата, съобщили че са били в затвор (n = 43, 36,8%) уникалните рекомбинантни форми доминират (11/12, 91,7%), докато при лицата, несъобщили за това, уникалните рекомбинантни форми са едва 8,3% (1/12), $p < 0,001$. Сравнението между лицата, съобщили че са били в затвор, и останалите показва значими разлики в честотата на CRF01_AE ($p < 0,01$), URFs ($p < 0,01$) и субтип В ($p < 0,05$), които преобладават сред лицата, съобщили че са били в затвор, за разлика от CRF02_AG ($p < 0,0001$), който е типичен за останалите. Разпределението на субтиповете при ромски и неромски пациенти е сравнително равномерно, без статистически значими разлики.

Разширен филогенетичен анализ на преобладаващите субтипове при ИВН

За изясняване на произхода на основните HIV-1 субтипове при ИВН в България, бяха създадени независими групи от pol секвенции за CRF01_AE и CRF02_AG, които включват данни от български ХЕТ индивиди и всички налични глобални pol секвенции за двата субтипа от GenBank (CRF01_AE, n = 4680; CRF02_AG, n = 2933). Последвалят

филогенетичен анализ, базиран на метод на максимална правдоподобност, идентифицира тясно свързани глобални секвенции и генетични взаимоотношения.

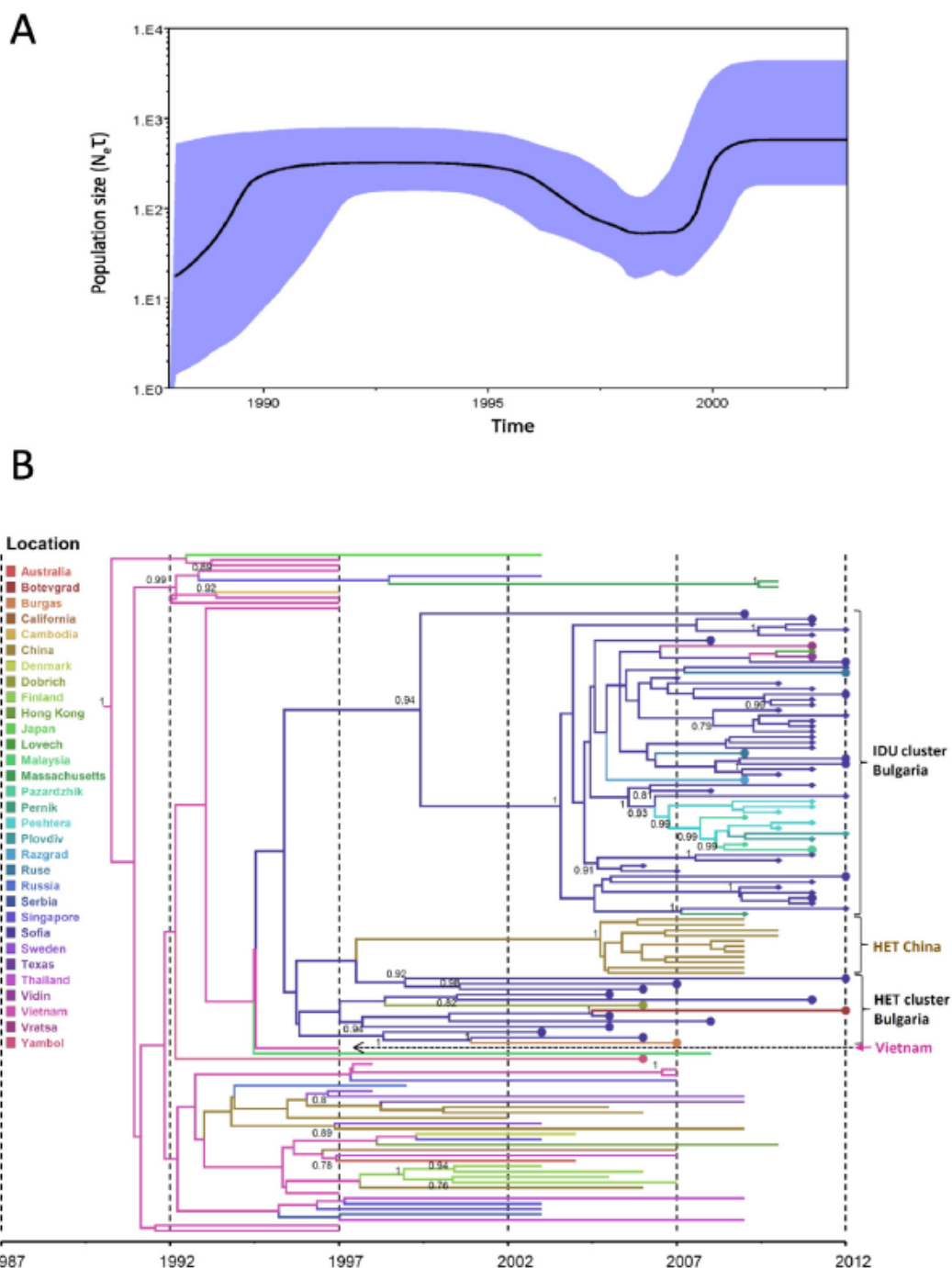
Филогенетичните дървета с максимална правдоподобност (фигура 31 А и В). показаха, че българските секвенции от ИВН формират отчетливи клъстери с висока статистическа значимост ($SH = 0,89$ за CRF01_AE и $SH = 0,98$ за CRF02_AG), което е силен индикатор за локални субепидемии. За разлика от тях, повечето секвенции от ХЕТ лица са разпръснати или формират малки, незначителни клъстери. Изключение правят 14 CRF01_AE и шест CRF02_AG секвенции от ХЕТ лица, които участват в клъстерите на ИВН, което предполага възможно вирусно преливане между двете популации.



Фигура 31 А и В. Глобално филогенетично дърво на CRF01_AE и CRF02_AG.

(А) Глобално филогенетично дърво на CRF01_AE. Филогенетичният анализ се основава на подравняване на секвенции от 721 нуклеотида от полимеразния (pol) ген на HIV-1 CRF01_AE. Той е изведен с помощта на 97 pol секвенции от България – 41 от ИВН и 56 от ХЕТ индивиди, както и 4680 pol секвенции на съответния CRF, налични в GenBank, използвайки FastTree. Стойностите на достоверност на разклоненията и клъстерите на дървото бяха оценени чрез теста на Shimodaira-Hasegawa и са представени като вероятности. Черните и сините разклонения показват съответно глобално разпространени и български pol секвенции. Непрекъснатите и прекъснатите лилави стрелки показват позициите на pol секвенциите само от български ИВН и съответно от български ХЕТ индивиди в дървото.

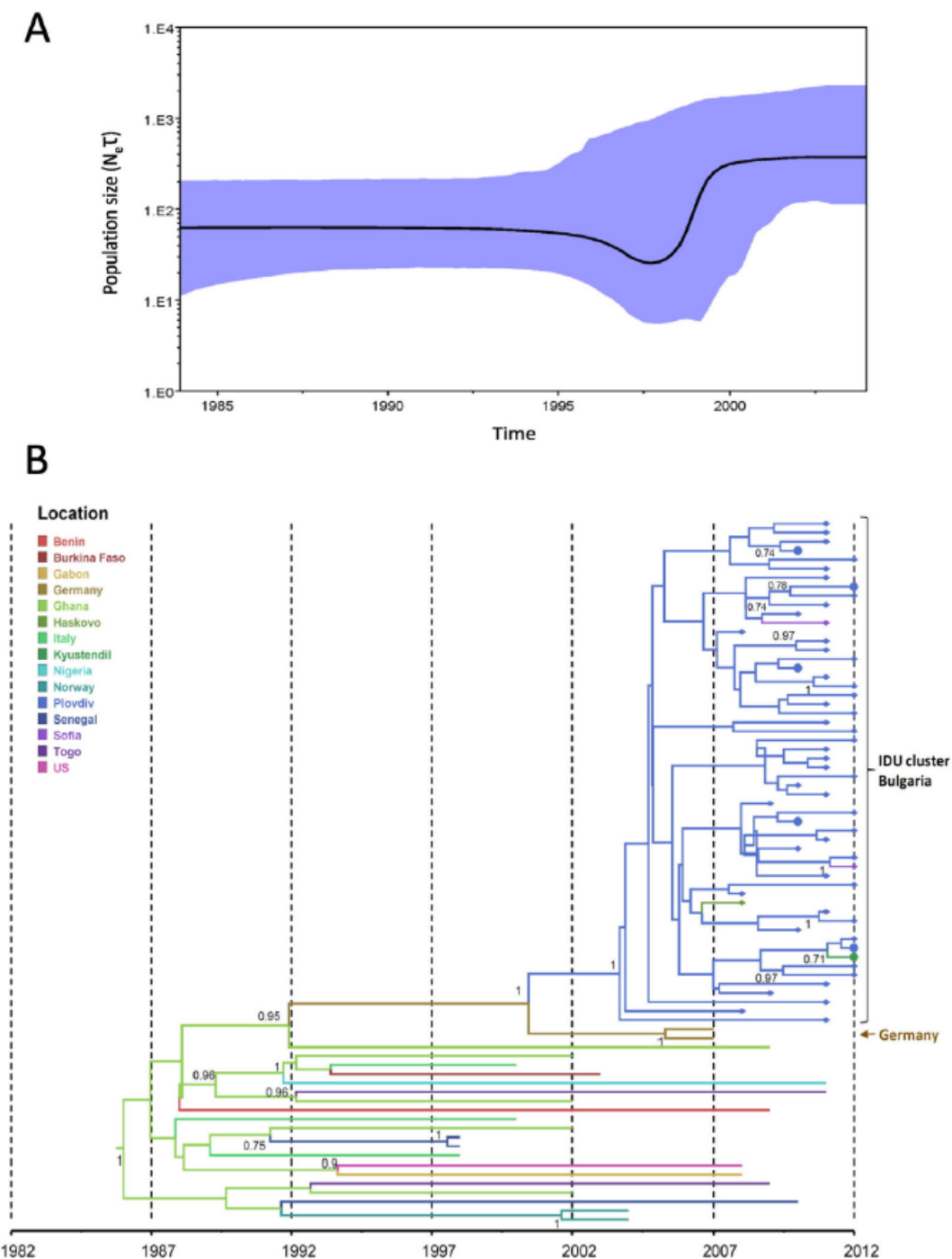
(В) Глобално филогенетично дърво на CRF02_AG. Филогенетичният анализ е базиран на подравняване на 774 нуклеотида от полимеразния (pol) ген на HIV-1 CRF02_AG. Той е изведен с помощта на 69 pol секвенции от България – 50 от ИВН и 19 от ХЕТ индивиди, както и 2933 pol секвенции на съответния CRF, налични в GenBank, използвайки FastTree. Стойностите на достоверност на разклоненията и клъстерите на дървото са оценени чрез теста на Shimodaira-Hasegawa и са дадени като вероятности. Черните и сините разклонения показват съответно глобално разпространени и български pol секвенции. Непрекъснатите и прекъснатите лилави стрелки показват позициите на pol секвенциите само от български ИВН и съответно от български ХЕТ индивиди в дървото.



Фигура 32. Филодинамика и филогеография на HIV-1 CRF01_AE в България. Филогенцията е изведена чрез Байесов анализ.

(А) Байесов "skyride" график, показващ предполагаемия растеж на епидемията от CRF01_AE в България. Изведените ефективни размери на популацията (N_e) във времето (в години) са съответно по Y- и X-осите.

(В) Филогенетично дърво, показващо най-скорошния общ предшественик и географското разпространение на CRF01_AE. Анализът включва 70 полимеразни (pol) секвенции от България – 41 секвенции от интравенозни наркомани (IDU - ИВН) и 29 от хетеросексуални (HET - ХЕТ) индивиди, както и 56 pol секвенции от други държави. Запълнените кръгове и ромбове в краищата на разклоненията показват съответно български ХЕТ и ИВН. Времевата скала в години е дадена по X-оста, а страната или градът на произход на секвенциите са обозначени с цвят и дефинирани в легендата.



Фигура 33. Филодинамика и филогеография на HIV-1 CRF02_AG в България. Филогенцията е изведена чрез Байесов анализ.

(А) Байесов "skyride" график, показващ предполагаемия растеж на епидемията от CRF02_AG в България. Изведените ефективни размери на популацията (N_e) във времето (в години) са съответно по Y- и X-осите.

(В) Филогенетично дърво, показващо най-скорошния общ предшественик и географското разпространение на CRF02_AG. Анализът включва 69 полимеразни (pol) секвенции от България – 50 секвенции от интравенозни наркомани (IDU - ИВН) и 19 от хетеросексуални (HET - ХЕТ) индивиди, както и 22 pol секвенции от други държави. Запълнените кръгове и ромбове в краищата на разклоненията показват съответно български ХЕТ и ИВН. Времевата скала в години е дадена по X-оста, а страната или градът на произход на секвенциите са обозначени с цвят и дефинирани в легендата.

Пространствено-времева динамика на CRF01_AE и CRF02_AG субепидемиите

Хронологията на въвеждането и еволюционната динамика на CRF01_AE и CRF02_AG сред ИВН и ХЕТ популации в България е изследвана чрез Байесов коалесцентен анализ в BEAST. Байесовият skyline анализ за CRF01_AE разкри двуфазен растеж: логаритмичен подем преди 1990 г., последван от плато (1990–1996), и нов кратък експоненциален растеж около 2000 г., достигнал стабилност скоро след това (фигура 32 А). За CRF02_AG се наблюдава стабилен растеж между 1985 и 1998 г., последван от краткотрайно ускорение и последващо плато (фигура 33 А).

Времето на най-скорошния общ предшественик за CRF01_AE е около 1992 г., свързана с хетеросексуален пациент от Ямбол, с последващо разпространение в София до 1995 г. (95% HPD: 1993–1996), главно сред ХЕТ лица. Прехвърлянето към ИВН в София е датирано около 2003 г. (95% HPD: 2000–2004), а до други градове като Пещера, Пловдив и Пазарджик — около 2006 г. (95% HPD: 2004–2008).

CRF02_AG е въведен по-късно — около 2000 г. (95% HPD: 1996–2004), споделяйки общ произход с немски секвенции, като преносът от Германия до Пловдив е потвърден с дискретен Bayes Factor от 9,59 в SPREAD анализа. Този клъстер включва предимно ИВН от Пловдив с ограничено преливане в хетеросексуалната популация между 2009 и 2010 г.

4.5.2. Произход и разпространение на HIV-1 субтип В сред ХЕТ лица в България

Публикация: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/AID.2017.0167>

Демография на изследваната популация и разпределение по рискови групи

Демографските и епидемиологичните характеристики на ХЕТ лица, инфектирани с HIV-1, бяха сравнени с тези на други HIV-1-позитивни популации. Демографският анализ показва, че 62,8% от ХЕТ пациентите са мъже, съпоставимо, но статистически различимо от останалите рискови групи (МСМ и ИВН), при които мъжете съставляват 91,4% ($p < 0,01$).

Възрастовият диапазон при ХЕТ варира между 17 и 67 години със средна стойност от 33,4 години. Делът на младите индивиди (<19 г.) е значимо по-нисък сред ХЕТ в сравнение с другите трансмисионни групи (3,5% спрямо 10,9%, $p < 0,01$), докато делът на индивидите над 45 години е значително по-висок (18,7% при ХЕТ спрямо 4,3%, $p < 0,01$).

Макар че повечето инфекции са придобити на територията на България, относителният дял на ХЕТ лицата, съобщили, че са се заразили в чужбина, е по-висок в сравнение с останалите рискови групи (14,6% срещу 6,6%, $p < 0,01$).

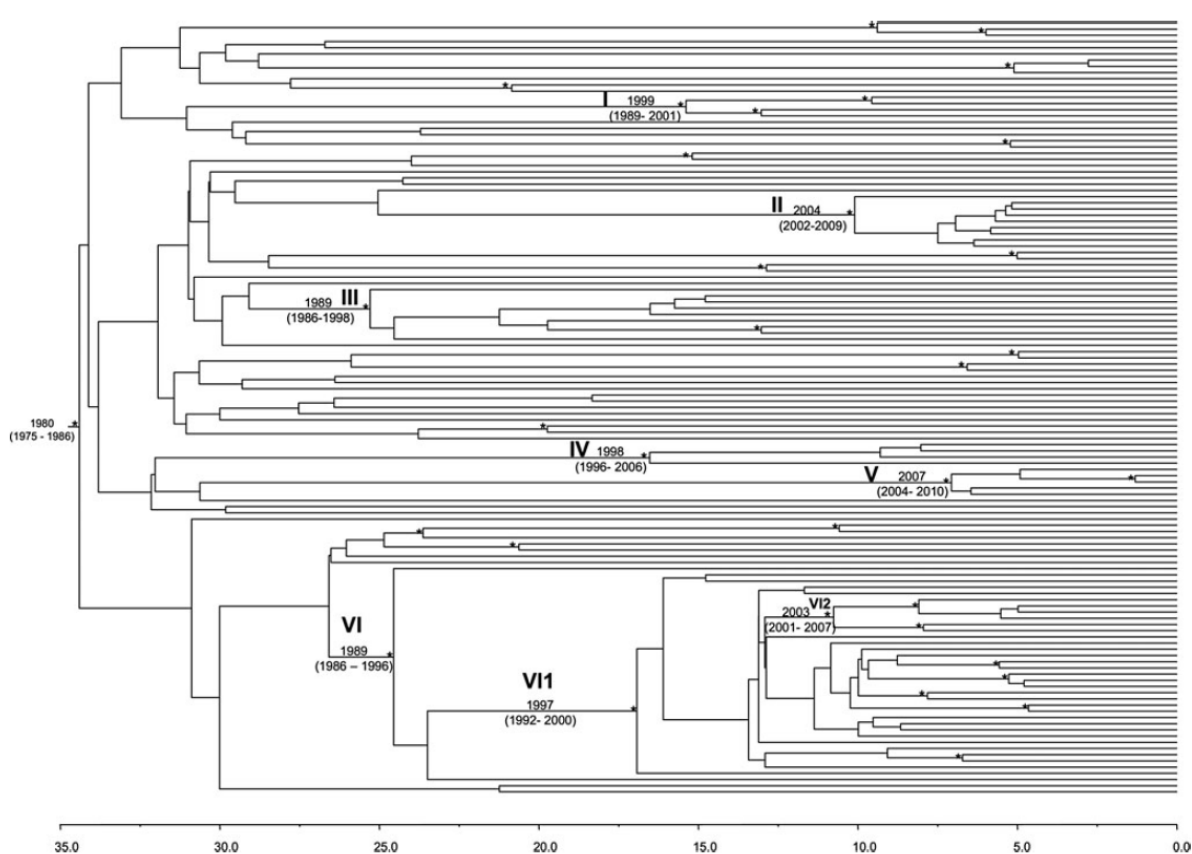
Генетично разнообразие на HIV-1 и разпределение на субтиповете при ХЕТ

Филогенетичният анализ на ХЕТ подгрупата ($n = 322$) показва значително генетично разнообразие на HIV-1, включващо множество CRF, URF, както и различни субтипове. Разпределението е следното: субтип В: 147 (45,7%), CRF01_AE: 64 (19,9%), CRF02_AG: 24 (7,5%), субтипове А1/А6: 24 (7,5%), субтип С: 23 (7,1%), субтип F1: 17 (5,3%), URFs: 13 (4,0%), CRF05_DF: 4 (1,2%), субтип G: 2 (0,6%), CRF04_crx, CRF29_BF, CRF14_BG, субтип Н: по 1 случай (0,3%). Анализът на половото разпределение показва, че субтип В е значимо по-често срещан при мъже (105; 71,4%) в сравнение с жени (42; 28,6%). Другите субтипове и CRF бяха разпределени относително равномерно между половете.

По отношение на географското разпределение, най-висока концентрация на случаи със субтип В беше установена в София (72 случая; 49%), докато останалите бяха разпръснати из страната.

Еволюционни оценки и демографска реконструкция

Средната еволюционна скорост за субтип В беше изчислена на базата на 125 български изолата. Сравнителният анализ на маргиналните вероятности показва, че моделът с релаксиран молекулярен часовник се вписва значително по-добре от строгия ($2\ln BF = 70,8$) (фигура 34).



Фигура 34. Байесово филогенетично дърво на субтип В сред ХЕТ лица в България. Времето на най-скорошния общ прародител, с интервал на достоверност, базиран на 95% HPD интервал, е посочено в години. Една звездичка (*) по протежение на клоновете представлява значима статистическа подкрепа за разклонението, обхващащ този клон (постериорна вероятност $>0,98$). Годишите на скалата са посочени в долната част на фигурата. HPD, най-висока постериорна плътност.

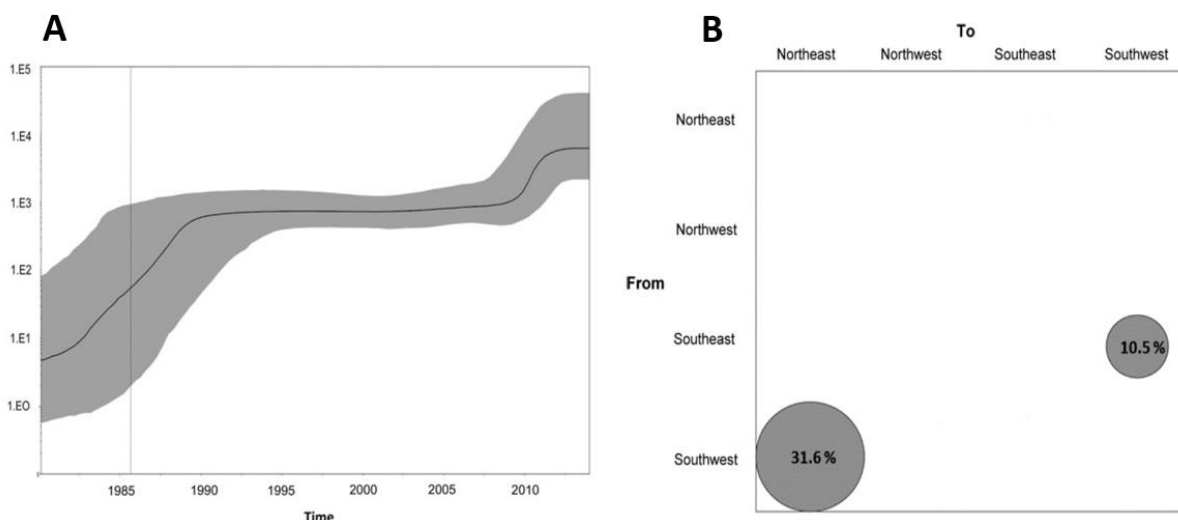
Байесовото дърво с максимална достоверност показва, че коренът на основната клада датира около 1980 г. (95% HPD: 1975–1986). Идентифицирани са шест основни кледи (I–VI), включително два подклада (VI1 и VI2).

Допълнително, анализът на *Bayesian Skyline Plot* (BSP) демонстрира, че моделът на популационна динамика по-добре описва данните в сравнение с константния и експоненциалния модели ($2\ln BF > 89$). Средната стойност на еволюционната скорост беше оценена на $1,7 \times 10^{-3}$ замествания/сайт/година (95% HPD: $1,026 \times 10^{-3} - 2,37 \times 10^{-3}$). BSP анализът (фигура 35 А). разкрива фаза на експоненциален растеж от началото на 1980-те до края на 1990-те, последвана от стабилизиране около 2008 г. и нова фаза на растеж до 2012 г., когато се наблюдава втора плато-фаза в епидемичната крива.

Анализ на генетичния поток между региони

Секвенциите от HIV-1 субтип В бяха категоризирани по географски региони: Североизток (Варна), Северозапад (Монтана), Югоизток (Бургас), и Югозапад (София и Пловдив). Изчисленията на вирусния генен поток показаха наличие на значимо географско структуриране (фигура 35 В).

Нулевата хипотеза за панмиксия беше отхвърлена чрез рандомизационен тест ($p < 0,0001$). Най-честата посока на вирусен поток беше от Югозапад към Североизток (31,6%), следвана от поток от Югоизток към Югозапад (10,5%).



Фигура 35. Байесов skyline plot и миграционен модел на субтип В сред ХЕТ лица в България. (А) Байесов skyline plot на на субтип В сред ХЕТ лица в България. Ефективният брой инфекции е показан на оста Y. Времето е показано на оста X. Сивата зона съответства на интервала на достоверност, базиран на 95% HPD интервал.

(В) Миграционен модел на циркулацията на HIV-1 субтип В в България. Диаграмата показва честотата на генния поток (миграции) в България към/от различни географски области. Повърхността на всеки кръг е пропорционална на процента наблюдавани миграции в генеалогията с максимална правдоподобност. Миграциите са изведени от втория набор от данни с модифицирана версия на алгоритъма на Слаткин и Мадисън (1): Североизток; (2): Северозапад; (3): Югоизток; (4): Югозапад. HIV, вирус на човешката имунна недостатъчност.

4.5.3. Анализ на резистентните мутации на суб-епидемията от субтип В в България

Публикация: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/4/441>

Характеристики на HIV-1 субтип В инфекциите в България

През периода 1988–2018 г. в България са идентифицирани 663 инфекции с HIV-1 субтип В. Първите случаи на субтип В инфекция са диагностицирани през 1988 г., след което броят им нараства стабилно до 2014 г., когато са установени 85 случая. През 2018 г. са регистрирани 104 нови случая.

В началото на епидемията случаите са предимно свързани с хетеросексуално (ХЕТ) предаване. Между 1989 и 2004 г. броят на новите HIV диагнози сред MSM, е рядък (един или нито един случай годишно), но след това нараства бързо, достигайки 70 нови случая през 2018 г. и общо 377 MSM (включително едно лице, съобщаващо MSM и интравенозни наркотици). Регистрирани са 256 ХЕТ инфекции. Диагнозите на HIV-1 субтип В при интравенозни наркомани (ИВН) ($n = 22$), предаване от майка на дете (МД, $n = 4$) и чрез контаминирана кръв ($n = 4$) са редки през този период на изследване. От инфекциите със субтип В, 593 са при мъже и 70 при жени. Възрастта при

диагностициране варира от 1 до 73 години. Въз основа на интервюта с пациенти, предполага се, че 585 инфекции са възникнали в България, докато 78 са възникнали в други страни, предимно в Европа ($n = 63$).

Сред участниците, инфектирани със субтип В, 593 от 663 (89,4%) са мъже, докато сред тези с инфекции извън субтип В, 612 от 819 (74,7%) са мъже. Процентът на мъжете с инфекция от субтип В е статистически значимо по-висок от този при инфекции извън субтип В ($p < 0,0001$). Процентът на участниците с инфекция от субтип В, които вероятно са се инфектирали в България (88,2%), е сходен с този при участниците с инфекции извън субтип В (86%, $p = 0,195$).

Установихме, че участниците с инфекция от субтип В имат по-ниски проценти на хетеросексуално (38,6% срещу 44,6%) предаване в сравнение с тези извън субтип В. Наблюдават се по-високи проценти на МСМ (56,7% срещу 20,3%) сред субтип В инфектираните в сравнение с не-субтип В групата, и значително по-ниски проценти на ИВН (3,3% срещу 30,9%). Разпределението на рисковите фактори за предаване между субтип В и не-субтип В групите се различава статистически значимо ($p < 0,0001$).

Произход на субтип В инфекциите в България

За извеждане на филогенетичните връзки на българските субтип В секвенции с тези от други страни са изведени 2596 глобални HIV-1 pol секвенции, с цел оценка на потенциалните произходи на суб-епидемията от субтип В в България. Секвенции, непосредствено предшествващи тези от България със силна подкрепа (Shimodaira-Hasegawa (SH) стойности $\geq 0,7$), са считани за потенциални източници на инфекции в България, с общата уговорка на молекулярно-епидемиологичните изследвания, че не всички инфектирани лица са проследени.

Изведени са 20 различни филогенетични клъстера, съдържащи български секвенции, вариращи от двойки ($n = 6$) и триади ($n = 5$) до голям клон от 552 български секвенции, както и една последователност от Кипър. Повечето от клоновете, съдържащи поне две български секвенции (6/8, 75,0%), включват секвенции извън България, които винаги предшестват българските секвенции и произхождат от множество страни, включително Израел, Германия, Великобритания, Русия, Япония, Бразилия, Перу и САЩ.

Например, непосредствено предшестваш най-силно подкрепения (SH = 0,98) най-голям български клон ($n = 552$) е клон (SH = 0,75), състоящ се от 31 секвенции, включително тези от САЩ ($n = 5$), Япония ($n = 2$), Израел ($n = 17$) и България ($n = 7$). В рамките на този клон от 31 таксона, всички не-български секвенции предшестват седемте български секвенции, като всички 17 секвенции от Израел формират най-близкия сестрински клон (SH = 0,91).

Непосредствено предшестваш втория най-голям клон от български секвенции ($n = 67$, SH = 0,99) е единична последователност от Израел от 2010 г. (SH = 0,81), последвана от единична последователност от Германия от 2010 г. (SH = 0,98), единична последователност от Перу от 2014 г. (SH = 0,9) и две секвенции от САЩ (SH = 0,8). 78 (11,8%) лица съобщават, че са придобили инфекциите си извън България. От тези 78 инфекции, мнозинството (63/78, 80,8%) се клъстерират в рамките на големия 553 таксона български + кипърски клон, като само две предшестват подклонове с 96 и 16 члена всеки.

Разпространение на резистентни мутации

Идентифицирани са 70 резистентни мутации, включително 13 към протеазни инхибитори (PI), 33 към нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NRTI) и 23 към ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTI). Най-

разпространените PI, NRTI и NNRTI мутации са L90M (21/44, 47,7%), M184V (17/95, 17,9%) и E138A (26/100, 26,0%) съответно.

4.5.4. Анализ на произхода на суб-епидемията от HIV-1 CRF01_AE в България

Публикация: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/116#cite>

Характеристики на HIV-1 CRF01_AE инфекциите в България

Първият случай на HIV-1 CRF01_AE инфекция в България е диагностициран през 1995 г. при мъж, съобщаващ само хетеросексуално поведение. В периода от следващите 11 години са идентифицирани едва 33 случая на този субтип, като по-голямата част от тях (81,8%) са при ХЕТ. През 1999 г. CRF01_AE е регистриран за първи път при предаване от майка на дете, а до 2002 г. вече се наблюдава разпространение сред ИВН.

През 2009 г. са идентифицирани 26 случая на инфекция с CRF01_AE, от които 18 (69,2%) са ИВН, а 3 (11,5%) са мъже, които имат секс с мъже и употребяват инжекционно наркотици (МСМ/ИВН). Това бележи избухване на инфекцията сред уязвими популации в столичния регион София. До 2011 г. се наблюдава ръст в броя на случаите – 31 за годината, включително 17 ИВН, 12 ХЕТ и двама МСМ.

В отговор на епидемичното нарастване, правителството предприема спешни мерки за ограничаване на разпространението на HIV сред ИВН, което води до намаляване на новорегистрираните случаи в следващите години. Въпреки това, от 2018 г. се наблюдава ново покачване – 17 случая през 2018 г. (от които 9 ИВН) и 22 през 2019 г. (14 ИВН).

До края на 2019 г. в България са регистрирани общо 270 случая на CRF01_AE инфекция. От тях 187 (69,3%) са мъже и 83 (30,7%) – жени. Делът на жените сред CRF01_AE-инфектираните е статистически по-висок в сравнение с този при други HIV субтипове (30,7% срещу 14,4%). Възрастта при диагноза варира от 0 до 63 години (средна стойност = 30,0; медиана = 29,0), като делът на лицата на възраст до 19 години е два пъти по-висок (10,4%) спрямо другите субтипове (4,8%).

Според данни от интервюта с пациенти, при 251 (93%) от случаите инфекцията е придобита в България, докато при 19 (7%) – в чужбина. Това показва значително по-висок дял на локално придобити CRF01_AE инфекции (93%) спрямо останалите субтипове (83,2%, $p < 0,0001$). С изключение на един случай, свързан с Тайланд, останалите инфекции, придобити в чужбина, са от европейски страни: Франция ($n = 4$), Германия ($n = 3$), Гърция ($n = 2$), Испания ($n = 4$), Сърбия ($n = 1$), Русия ($n = 1$), Турция ($n = 1$) и Обединеното кралство (UK; $n = 2$).

Произход на HIV-1 CRF01_AE инфекциите в България

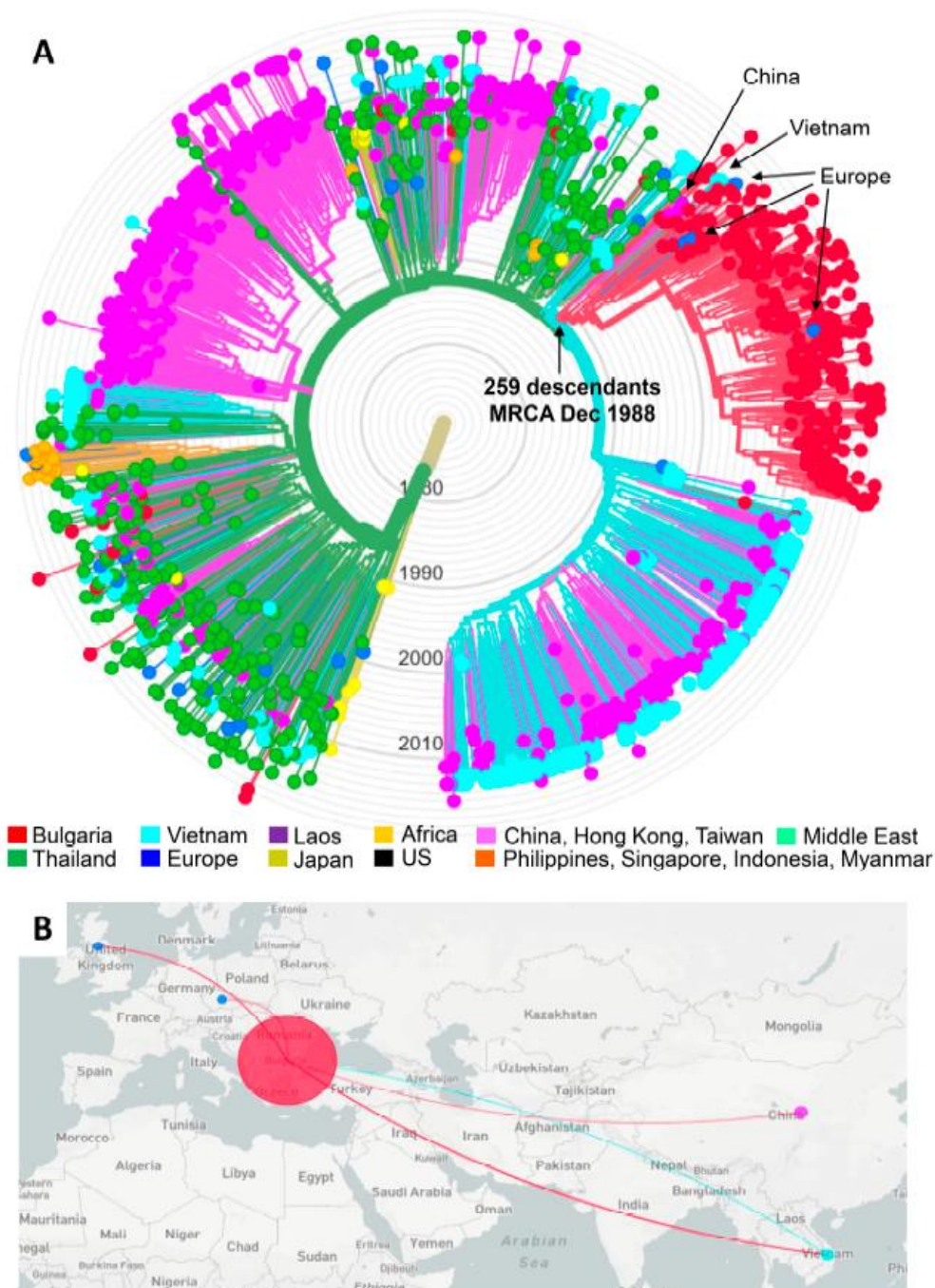
Общо 1458 глобални секвенции на HIV-1 CRF01_AE *pol* региона бяха използвани за филогенетично сравнение с 270 български секвенции, с цел проследяване на възможните източници на субепидемията от CRF01_AE в България.

Филогенетичното дърво, получено чрез ML анализ с Nextstrain, показва, че повечето предавания на CRF01_AE се случват в Азия, където се наблюдава регионална изолация след локално въвеждане (напр. Китай), както и по-широко разпространение и смесване между различни географски райони, включително Тайланд и Виетнам.

В България са установени 19 изолирани случаи на CRF01_AE инфекция с диагнози от 1995 до 2019 г., показващи филогенетична близост до секвенции от Тайланд, Виетнам, Китай и, в един случай, Швеция. От тези 19 случая, 16 (84,2%) съобщават само хетеросексуално предаване (ХЕТ) като рисков фактор, включително два случая на инфекция, придобита извън страната.

Анализът на максимална правдоподобност чрез Nextstrain разкрива доминиращ филогенетичен клон, включващ мнозинството от българските CRF01_AE секвенции. Този клон съдържа две разклонения: по-голямо разклонение с 248 български секвенции (от 1996–2019 г.) и 11 чуждестранни, и по-малко разклонение с 4 български и 15 чуждестранни секвенции. По-голямото разклонение е определено като клъстер от епидемичен взрив на CRF01_AE.

Молекулярното датиране установи, че най-скорошният общ предшественик на клъстера от епидемичния взрив е датиран към 21.12.1988 г. (доверителен интервал: 20.04.1988 г. – 27.03.1990 г.). Оценената еволюционна скорост е $1,23 \times 10^{-3}$ нуклеотидни замествания/сайт/година (фигура 36).



Фигура 36. Nextstrain анализ на глобални HIV-1 CRF01_AE секвенции. (А) Дървото на ML беше конструирано с използване на 270 секвенции от България и 1458 глобални CRF01_AE секвенции. Стрелките показват българския клъстер на разпространение,

включващ изведена дата на най-скорошния общ предшественик (CI, доверителен интервал). (В) Изведени географски маршрути на предаване с потенциални произходи, обозначени с цветни линии, свързващи страни, както е показано в (А). Визуализацията в Nextstrain изведе пътищата на предаване и географското разпространение на клъстера. Тюркоазената линия, водеща от Виетнам към България, предполага, че първоначалният източник на клъстера в страната вероятно произхожда от Виетнам. С разрастването на епидемията сред ИВН в България, вирусът се разпространи обратно към Виетнам, както и към Китай, Великобритания и Чешката република — потвърдено от червените линии в Nextstrain, показващи възможни посоки на ретрансмисия.

4.5.5. Анализ на произхода и разпространението на HIV-1 субтип С в България.

Публикация: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/2/263>

Демографски характеристики на изследваната популация

В това национално изследване са анализирани 37 лица, диагностицирани с HIV/СПИН между 1986 и 2017 г. Мъжете и жените са представени почти поравно: 19 (51,4%) мъже и 18 (48,6%) жени. Мнозинството от лицата, $n = 34$ (91,9%), приписват инфекцията си на хетеросексуален контакт. Едно лице (2,7%) съобщава за контакт между мъже, едно е хемофилик (2,7%), заразен в ранните години на епидемията, а едно е новородено (2,7%), заражено чрез вертикално предаване.

Възрастта варира от новородено до 62 години, със средна възраст на изследваната популация от 34,3 години. Според данните от пациентите, 28 (75,7%) се подозират, че са заразени в България, докато девет (24,3%) съобщават, че вероятно са заразени в чужбина по време на пътуване или престой извън страната, например в Германия ($n = 2$), Южна Африка ($n = 1$) или Конго ($n = 1$). Един пациент е бежанец от Сомалия.

Въвеждане и разпространение на HIV-1 субтип С в страната

Първите случаи на HIV/СПИН в България са открити през 1986 г. сред ХЕТ лица и пациенти с хемофилия. По-късно един от тези случаи е тестван за антиретровирусна резистентност и е установено, че е заразен с HIV-1 субтип С. През първите пет години, от 1986 до 1990 г., общо 87 лица са диагностицирани с HIV-1 в страната. От 15 от тези пациенти е изолиран и генотипизиран вирусът, като е открито широко разнообразие от HIV-1 субтипове: пет (33,3%) лица, заразени с HIV-1 субтип С; три (20,0%) със субтип А1; три (20,0%) със субтип В; и по едно (6,7%) със субтип F1, H, CRF04_srx, както и един неклассифициран клейд.

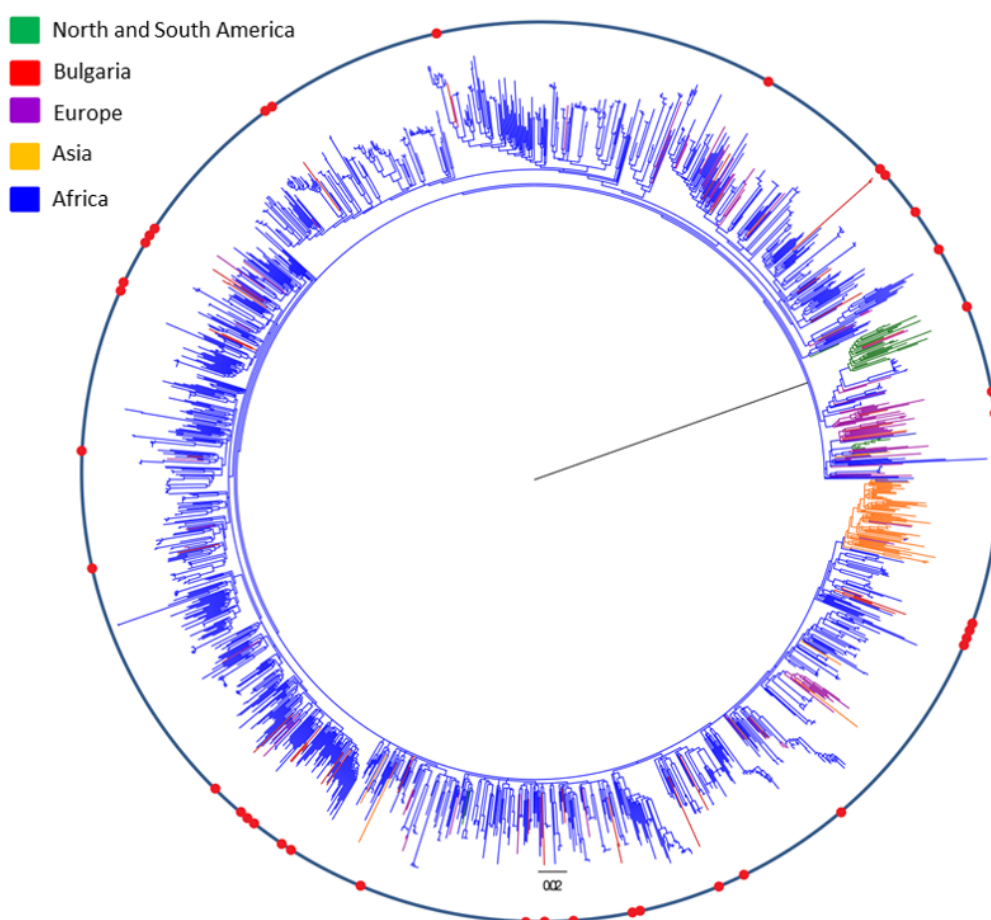
Резултатите показват, че субтип С е бил един от първите HIV-1 щамове, въведени в България. Епидемиологичната информация за местоживеенето на лицата, заразени с този конкретен щам, разкрива, че HIV-1 субтип С се е разпространявал неравномерно сред различните региони на страната. Най-големите градове не са били най-засегнати, докато са съществували специфични области в слабо населени региони, където HIV-1 субтип С вероятно е бил въведен случайно с относително по-голям брой случаи.

Множество въвеждания на HIV-1 субтип С в България, страни на произход и предаване в страната

Филогенетичните взаимоотношения между българските и субтип-референтните секвенции показват, че българските секвенции са групирани в отделен филогенетичен клъстер с $>99\%$ bootstrap подкрепа на максималната правдоподобност, а референтните субтип С секвенции се разклоняват от българския клъстер, показвайки висока филогенетична прилика.

За по-нататъшно изследване на потенциалния произход на HIV-1 субтип С в България, беше изведено подравняване, съставено от 1768 глобално селектирани HIV-1 pol секвенции. Този набор от данни комбинира 37 български секвенции с 1731 специално селектирани HIV-1 субтип С секвенции от глобалното търсене, от които 1532 произхождат от Африка, 98 от Европа, 67 от Азия и 34 от Северна и Южна Америка.

Филогенетичното дърво на максимална правдоподобност показва, че българските секвенции са разпръснати в цялото филогенетично дърво (фигура 37), което отхвърля сценария на едно основно събитие, последвано от регионално разпространение, но е съвместимо с хипотезата за множество въвеждания от различни страни за продължителен период от време.



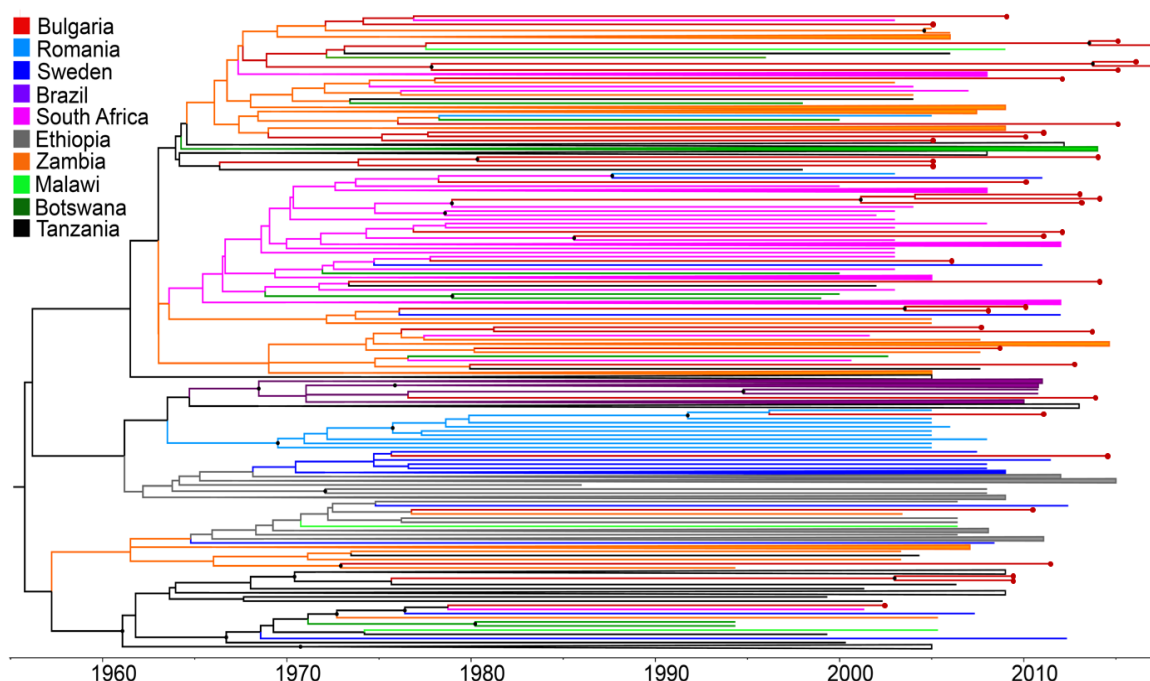
Фигура 37. Глобално филогенетично дърво с максимална правдоподобност за HIV-1 субтип С в България. Реконструкцията на дървото е изведена с помощта на Dataset-1, съдържащ 37 български секвенции и 1731 специално подбрани секвенции на HIV-1 субтип С от глобалното търсене. От тях 1532 секвенции произхождат от Африка, 98 – от Европа, 67 – от Азия и 34 – от Северна и Южна Америка. Червените точки в кръга показват позицията на българските секвенции върху филогенетичното дърво. Цветовете на разклоненията съответстват на цветовете на диаграма на съответния континент.

Мнозинството от българските секвенции ($n = 21$), изолирани от 13 мъже и 8 жени, са тясно свързани със секвенции от различни страни в Африка, Америка, Азия и Европа, показвайки множество въвеждания, последвани от последващо предаване на ограничен брой партньори. Само два високо подкрепени (100% bootstrap) монофилетични клейдове с >2 български секвенции са идентифицирани в ML дървото. Един клъстер включва

щамове, изолирани от двама мъже и една жена от регионите Габрово и Ловеч, докато другият е съставен от секвенции, изолирани от три жени, всички от региона Благоевград. Филогенетичното дърво също показва пет високо подкрепени (98–100% bootstrap) клейдове в София, два в Габрово и един в Благоевград.

Времева скала на въвежданията на HIV-1 субтип С в България

Байесови времево-машабирани филогении са изведени от редуцирания набор от данни на HIV-1 субтип С, който включва всички 37 нови изолата, след проверка за наличие на достатъчен времеви сигнал. Коренът на дървото се проследява до времето на най-скорошния общ предшественик на HIV-1 субтип С до 1954 г. (95% HPD: 1939–1966), което е в съгласие с други оценки. Както се очакваше, българските секвенции са междинно разпръснати в дървото поради многобройните независими въвеждания от различни географски региони на света (фигура 38). Задълбоченият анализ разкрива статистически значими ($p > 0,9$) клейдове, съдържащи само български секвенции, както и смесени клъстери от български и небългарски секвенции.

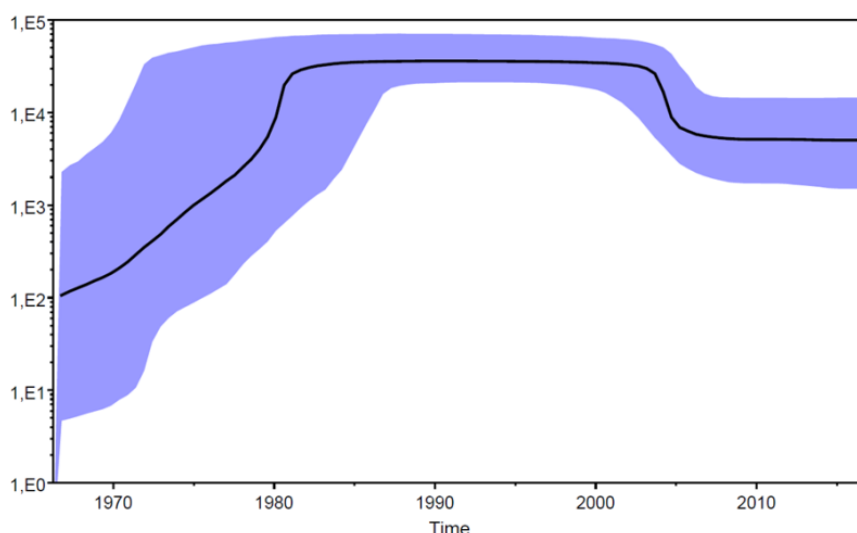


Фигура 38. Байесов молекулярен часовник анализ на HIV-1 субтип С в България. Байесово дърво с максимална достоверност на клъстерите и оценка на времето до най-скорошния общ предшественик (tMRCA). Реконструкцията на дървото е извършена с помощта на Dataset-2, съдържащ 300 секвенции, от които 37 са български, а 263 – избрани от глобалното търсене. Клъстери с постериорни вероятности $\geq 90\%$ са отбелязани с черни точки. Червените точки в края на червените линии показват българските секвенции. Скала с години е посочена в долната част на фигурата. Някои разклонения са свити за по-добра визуализация.

Общо данните показват, че от всички понастоящем налични HIV-1 субтип С щамове изолирани в България, 29 (78,4%) най-вероятно са въведени от чужбина, докато само осем (21,6%) са резултат от последващо местно разпространение. Общият филогеографски модел на разпространение показва поне седем страни като вероятен източник на множество въвеждания на HIV-1 субтип С в България. Повечето от

The map illustrates the distribution of 12 plant species across Bulgaria, with nodes representing specific locations and their associated sample sizes (n). The nodes are: TZ (n=5), BR (n=1), MW (n=2), Pleven, Lovech, Gabrovo, V. Tarnovo, St. Zagora, Sofia, Pazardzhik, Plovdiv, Blagoevgrad, Haskovo, Burgas, Varna, Dobrich, SE (n=3), ZA (n=8), ZM (n=9), and RO (n=1). Blue arrows indicate dispersal paths between nodes, with numbers representing the weight of the path. Red arrows highlight specific dispersal events, such as the path from Sofia to Pazardzhik and from Lovech to Gabrovo.

Коалесцентният анализ на популационната динамика на изолатите, образуващи HIV-1 субтип С клейда, демонстрира възходяща и низходяща тенденция, започвайки с експоненциална фаза от края на 60-те до 1980 г., последвана от постоянна фаза до около 2004 г. и кратко намаление, последвано от друга постоянна фаза (фигура 40).



(фигура 40). Байесов skyline plot, показващ предполагаемия растеж на HIV-1 субтип С по години. Предполагаемите ефективни популационни размери (N_e) са по оста y , а времето в години – по оста x .

В настоящото национално изследване анализирахме произхода и въвеждането на HIV-1 субтип С, един от ранно откритите субтипове в HIV/СПИН епидемията в България. Реконструкцията на Байесови времево-маштабирани филогении показва, че няколко български щамове се сегрегираха заедно в малки, но високо значими клъстери, докато други бяха смесени в по-големи клъстери, съдържащи щамове, изолирани от европейски и неевропейски страни. Нашият задълбочен, филогенетичен и филогеографски анализ на всички налични HIV-1 субтип С секвенции от български пациенти е съвместим със сценарий на множество ранни въвеждания в страната през 70-те години, последвани от ограничено местно разпространение в следващите години.

4.5.6. Трансмисионна резистентност в България (2012-2020)

Публикация: <https://doi.org/10.3390/v15040941>

Характеристики на изследваната популация

Общо 1053 клинични проби от наивни за антиретровирусна терапия лица с HIV-1 са изследвани в това проучване за периода от 2012 до 2020 г. Средната възраст на участниците към момента на поставяне на диагнозата е 36,0 години. Сред общия брой на HIV-1 инфекции с ТЛР, мнозинството 90,0% са мъже и вероятните пътища на придобиване на инфекцията включват МСМ 60,0%, ХЕТ лица 36,6% и интравенозни наркомани 3,3%.

Повечето от пациентите 80,0% съобщават, че вероятно са се заразили с HIV в България, а 20,0% посочват, че вероятно са придобили инфекцията в друга страна. Лицата заразени в чужбина се считат за мигранти и включват българи, вероятно инфектирани по време на пътуване или живот в чужбина и чужденци, които са били диагностицирани по време на посещението си в България.

Разпространение на HIV-1 субтипове в България (2012 - 2020)

Субтипирането и филогенетичният анализ показаха наличието на голямо разнообразие от HIV-1 с доминиране на субтип В 60,4%, следван от CRF01_AE 11,4%,

F1 6,9%, CRF02_AG 5,2%, A1 3,7%, A6 3,1%, URFs F1B 4,7%, C 1,2% и други субтипове и рекомбинантни форми с по-ниско преобладаване.

Уникалните рекомбинантни форми се дефинират като секвенции, които не са ясно причислени към определен субтип или циркулираща рекомбинантна форма и на филогенетичното дърво са позиционирани извън клъстер от известните референтни секвенции. Идентифицирани са многобройни URFs, някои от които са групирани в разклонения съдържащи най-малко 15 секвенции. REGA и COMET идентифицираха повечето от тях като рекомбинанти на B и F1, както и F1/B/D рекомбинанти.

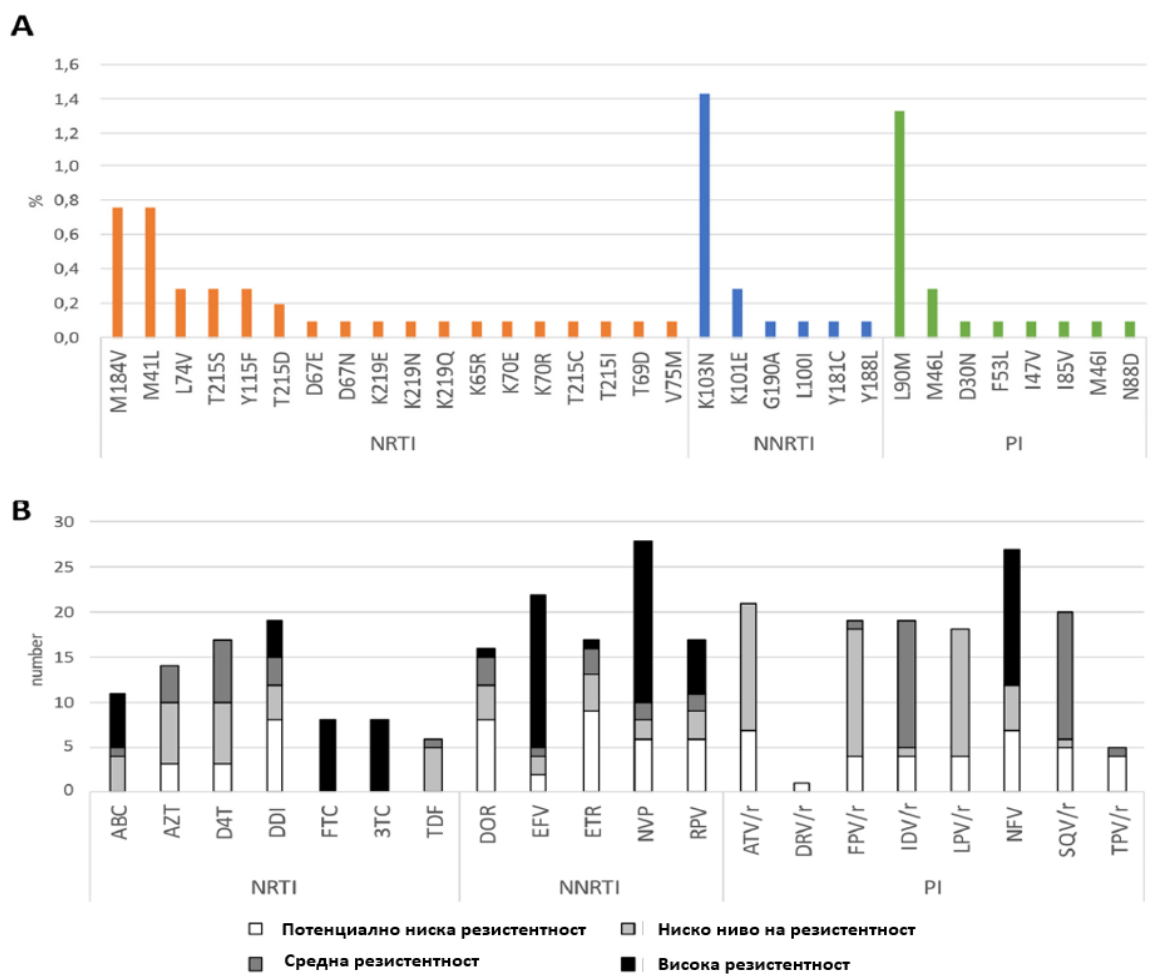
Резултати от анализа върху разпространението на трансмисионната антиретровирусна резистентност в България (2012-2020)

Общият брой на трансмисионната резистентност в изследваната популация е 60/1053 (5,7%), повечето от които са мъже 54/60 (90,0%). Разпространението на трансмисионната резистентност е най-високо сред мъжете, които правят секс с мъже 36/60 (60,0%), следвано от ХЕТ лица 22/60 (36,6%) и интравенозни наркомани 2/60 (3,3%).

Трансмисионната резистентност е открита при 12/60 (20,0%) от пациентите, които съобщават, че най-вероятно са се заразили с HIV-1 по време на пътуване или живот в чужбина. Най-голям брой случаи с ТЛР са открити при лица, заразени с HIV-1 субтип B 32/60 (53,3%), който е най-разпространеният субтип в изследваната популация.

От общо 1053 антиретровирусно наивни пациенти, включени в изследването, при 60 (5,7%) са установени мутации, свързани с ТЛР. От тези 60 случая, 23 пациенти (2,2% от общата извадка; 38,3% от резистентните) са с мутации към NRTI, 19 (1,8% от всички; 31,7% от резистентните) — към NNRTI, и 22 (2,1% от всички; 36,7% от резистентните) — към PI. При 4 пациента (0,4% от общата популация; 6,7% от резистентните) е установена резистентност към два лекарствени класа.

Двете най-често срещани мутации при NRTI са M184V и M41L, последвани от други 16 мутации. Най-честата мутация на NNRTI е K103N, която е идентифицирана при 15 (25%) секвенции. Най-често срещаната мутация към PI е L90M, идентифицирана при 14 (23,3%) изолата (фигура 41).

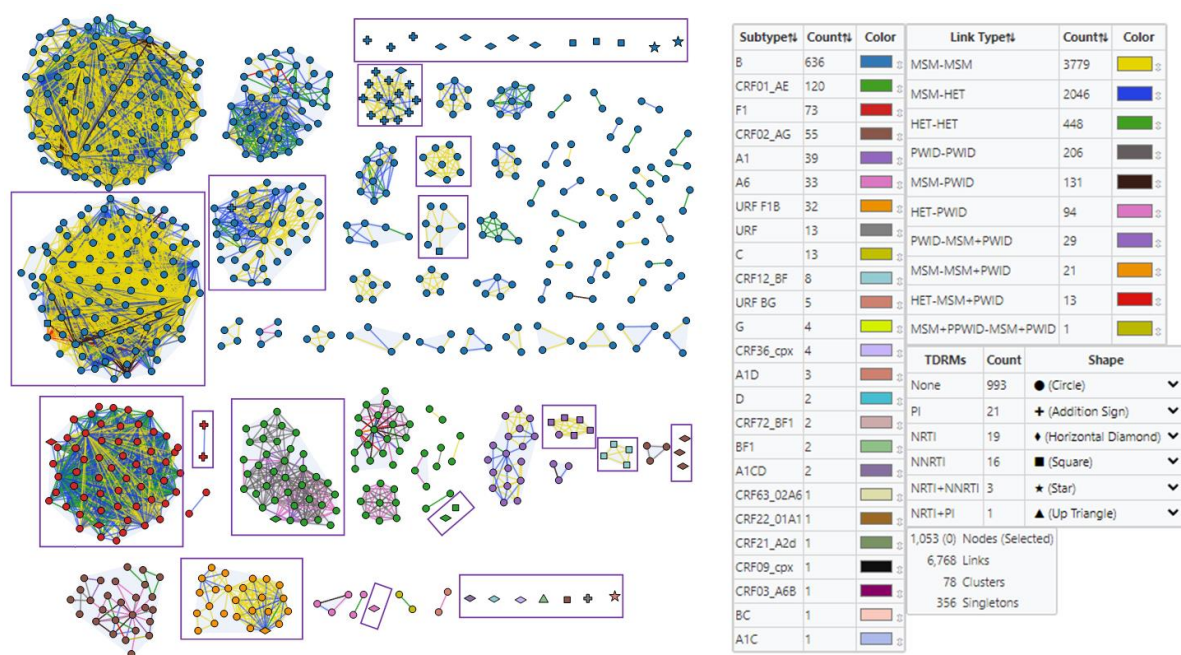


Фигура 41. Трансмисионна резистентност и прогнозирана фенотипна резистентност в България. (А) Съотношение на специфични мутации за лекарствена резистентност в HIV-1 полимеразните секвенции на новодиагностицирани, нелекувани с АРТ пациенти. (В) Брой пациенти с прогнозирана фенотипна резистентност въз основа на резултатите от Станфорд към специфични антиретровирусни медикаменти.

Анализ и характеризиране на трансмисионните клъстери с MicrobeTrace

Анализирането на трансмисионната мрежа при генетично отстояние $d = 1,5\%$ идентифицира общо 78 клъстера с различен брой на участващите секвенции (фигура 42). Двата най-големи клъстера съдържаха 100 и 97 секвенции от субтип В и по-голямата част от клъстерите 56/78 (72%) също бяха от субтип В. Идентифицирани са 8 CRF01_AE клъстера, вариращи по размер от 2 до 37 секвенции, три клъстера от субтип F1 с 2 до 63 секвенции, три клъстера от субтип A1 с 3 до 18 секвенции, два клъстера CRF02_AG с 3 и 27 секвенции, два малки клъстера от субтип A6 с две и три секвенции, един клъстер от 4 секвенции от CRF12_BF и един голям клъстер с 25 секвенции от URFs F1B.

За да се измерят различните видове на трансмисия, възникващи между лица с филогенетична връзка, връзките в клъстерите са оцветени според риска от предаване. Идентифицирани са общо 6768 връзки между възлите при $d = 1,5\%$. Предаването между МСМ ($3\ 779/6\ 768 = 55,8\%$) и между МСМ и ХЕТ ($2\ 046/6\ 768 = 30,2\%$) са преобладаващите пътища на предаване в клъстери от нелекувани с антиретровирусна терапия лица.



Фигура 42. Характеризиране на трансмисионните мрежи на HIV-1 при наивни за АРТ лица. Клъстери на HIV-1 pol секвенции, идентифицирани с помощта на MicrobeTrace с генетично отстояние (d) от 1,5%. Разклоненията са оцветени чрез окончателна класификация на субтипа, за което е използвана комбинация от методи за анализ. Формата на възела на разклонението показва типа резистентна мутация. Клъстерите са групирани по размер и субтип, представени са и единични секвенции с ТЛР, а секвенциите без резистентни мутации, които не се групират са изключени. Клъстери и единични елементи с ТЛР са представени в полетата на фигурата. Краищата (връзките) са оцветени според категорията на риска от предаване ХЕТ, МСМ, ИВН, МСМ+ИВН.

Трансмисионни групи участващи в състава на клъстерите

За да измерим различните видове на трансмисия, възникващи между лица с филогенетична връзка, връзките в клъстерите са оцветени според риска от предаване. Идентифицирани са общо 6768 връзки между възлите при $d = 1,5\%$. Предаването между МСМ и МСМ ($3\ 779/6\ 768 = 55,8\%$) и между МСМ и ХЕТ ($2\ 046/6\ 768 = 30,2\%$) са преобладаващите пътища на предаване в клъстери от нелекувани с АРТ лица, те са последвани от предаване между ХЕТ и ХЕТ ($448/6\ 768 = 6,7\%$), между ИВН и ИВН ($206/6\ 768 = 3,0\%$), между ИВН и МСМ или ХЕТ ($479/6\ 768 = 7,1\%$ комбинирани), и сред МСМ-ИВН и четири други рискови групи ($64/6\ 768 = 0,9\%$). В най-големите клъстери от субтип В и F1 бяха установени смеси от потенциални трансмисионни двойки от МСМ-МСМ, МСМ-ХЕТ и ХЕТ-ХЕТ. За разлика от това, при клъстерите от CRF01_AE по-голям потенциал за трансмисия имаше сред ИВН. Някои клъстери, формирани от изолати само или с преобладаване на мъже, също имаха трансмисионни двойки от МСМ-МСМ и МСМ-ХЕТ. Анализът на пола на индивидите, самоопределящи се като ХЕТ в трансмисионните връзки между МСМ и ХЕТ, показва, че $96,2\%$ (1968 от 2046) са мъже. Това може да е индикация за наличие на неотчетени бисексуални контакти, неотразени в данните от самоотчитане.

Резултатите от нашите изследвания не предполагат насоченост, а по-скоро описват потенциалния тип на предаване, възникващо в клъстерите. Идентифицирани са смесица от по-скорошни и по-отдавнашни инфекции в тези силно генетично разнообразни трансмисионни клъстери. Също така се установява, че секвенциите изолирани от голяма част от мъжете, съобщаващи за риск от предаване чрез ХЕТ контакти, (271/1053), имат

филогенетични връзки с MCM, което предполага възможни неразкрити контакти с MCM.

Анализ на клъстерите с трансмисионна резистентност

Анализът на трансмисионната мрежа при $d = 1,5\%$ идентифицира 14-членен клъстер в субтип В, съдържащ 13 секвенции с мутация L90M към PI и една с мутация T215TS към NRTI. По-голямата част от генетичните връзки в този клъстер са между MCM 40/58 (69%), последвани от MCM, и ХЕТ лица 17/58 (29,3%).

Пет секвенции от субтип А1 с мутация K103N към NNRTI са групирани с А1 секвенция, която няма резистентна мутация. Всичките 15 филогенетични връзки в този шестчленен клъстер са между MCM. Три CRF12_BF секвенции с мутация K103N към NNRTI се групират в секвенция с три мутации, K103N, V106VI и E138EK към NNRTI.

Изследвани са клъстерите със и без ТЛР, както и негрупирани секвенции със и без ТЛР, за да се анализира връзката с пола, риска от предаване и субтипа. Резултатите от групирането показаха продължаващо разпространение на някои резистентни мутации в трансмисионните мрежи, състоящи се предимно от MCM, и че групирането на трансмисионната резистентност е свързано със субтиповете.

5. ДИСКУСИЯ

Настоящото проучване представлява най-обширния анализ на антиретровирусната резистентност и молекулярната епидемиология на HIV-1 в България, обхващащо 35-годишен период (1989-2023) с анализ на 1654 лица, за които е било възможно да се генерира секвенция от *pol* гена на HIV-1. Това проучване не само документира еволюцията на HIV епидемията в страната, но и предоставя уникални находки за международните връзки, субтиповото разнообразие и динамиката на лекарствената резистентност в страната.

Значимостта на това изследване се простира отвъд националните граници, тъй като България заема ключова географска позиция като мост между Европа, Азия и Африка. Документираното генетично разнообразие от 26 различни HIV-1 варианта, надминава това в повечето европейски страни и отразява уникалните миграционни потоци и културни връзки на страната. Методологичните иновации, включително интеграцията на филогенетични, епидемиологични и мрежови анализи, създават нов стандарт за молекулярен надзор на HIV в региона.

Резултатите имат критично значение за клиничната практика, общественото здраве и научната общност. Идентифицирането на субтип-специфични резистентни профили, документирането на трансмисионните клъстери и характеризирането на епидемичните взривове, предоставят конкретни инструменти за персонализирано лечение и таргетирани превантивни интервенции. В международен план, изследването документира редки феномени като първото масово разпространение на CRF01_AE в Европа и високите нива на резистентност при субтип F1, които обогатяват глобалното разбиране на еволюцията на HIV-1.

5.1. ДЕМОГРАФСКИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ ТЕНДЕНЦИИ

Възрастова структура и полово разпределение

Демографският анализ на изследваната популация разкрива специфични характеристики, които отразяват както биологичните, така и социалните детерминанти на инфектирането с HIV в България. Установеното преобладаване на мъжете (84,4% срещу 15,6% жени) е характерно за HIV епидемията в Европа и отразява доминиращата роля на мъжете, които правят секс с мъже (МСМ) и употребата на интравенозни наркотици като основни двигатели на епидемията [Beloukas A. et al., 2016].

Възрастовото разпределение, със средна възраст от 34,2 години и съсредоточаване в интервала 20–40 години, подчертава засегнатостта на икономически активната част от населението. Този модел има сериозни социално-икономически последици, тъй като засяга хора в най-продуктивния етап от живота им. Най-младият пациент, включен в проучването, е на 13 години, а най-възрастният — на 78, което демонстрира широкия възрастов обхват на епидемията и налага прилагането на възрастово-специфични подходи в превенцията и лечението.

Сравнението с международни данни показва, че българската епидемия следва модели, наблюдавани в други страни от региона, но с определени особености. Повисоката генетична хетерогенност в сравнение със страни от Балканите и Западна Европа може да отразява социални фактори, влияещи върху рисковите поведения [Stanojevic et al., 2012].

Географско разпределение и урбанизация

Географското разпределение на случаите с HIV разкрива ясна концентрация в урбанизираните центрове, като София доминира с 47,9% от всички случаи, следвана от Пловдив (12,1%), Варна (4,4%) и Бургас (3,2%). Тази концентрация отразява както по-високата плътност на населението в големите градове, така и специфичните социални и икономически фактори, които улесняват предаването на HIV.

Особено забележително е неравномерното разпределение на различните субтипове между регионите. CRF01_AE показва изключителна концентрация в София (73,8% срещу 13,3% в останалите региони), докато CRF02_AG доминира в Пловдив (81,3% срещу 3,4% в останалата страна). Тази географска сегрегация на субтиповете е рядко наблюдавана в такива изразени форми и отразява специфични миграционни потоци и социални мрежи [Alexiev I. et al., 2016; Alexiev I. et al., 2021].

Ограничението на данните за постоянен адрес на регистрация, които не-винаги отразяват настоящото местоживее, въпреки това, установените модели предоставят важна информация за планирането на регионално-специфични здравни политики.

Трансмисионни категории и рискови поведения

Анализът на трансмисионните категории разкрива динамични промени в епидемиологичния профил на HIV в България за изследваната популация. MSM представляват 46,1% от случаите, следвани от ХЕТ лица 40,5% и интравенозни наркомани 12,0%. Тази тенденция отразява глобалния преход от първоначалното доминиране на хетеросексуалното предаване към нарастването на MSM епидемията в развитите страни [Paraskevis D. et al., 2019].

Времевата динамика показва драматични промени - докато в началните години хетеросексуалното предаване доминира с висок процент, към 2023 г. то намалява до 50,7%, като MSM нараства от 0% до 40,8% и достига пик от 57,7% през 2017-2018 г. Този модел отразява както промените в социалните нагласи и повишената откритост на MSM общността, така и специфичните характеристики на различните субтипове [Alexiev I. et al., 2020].

Интравенозните наркомани показват изключителни колебания - от 45% през 2006 г. до 7% през 2023 г., което вероятно отразява ефективността на специализираните програми за превенция сред тази популация, въведени след епидемичния взрив на CRF01_AE в София [Alexiev I. et al., 2021].

Международни връзки и миграционни фактори

Анализът на страната на придобиване на инфекцията разкрива значителен международен компонент в българската HIV епидемия. 17,2% от случаите са придобити в чужбина, като това включва както българи, инфектирани по време на пътувания или работа в чужбина, така и чужденци, диагностицирани в България. Най-големи групи сред чуждестранните граждани са от Германия (37 случая), Испания (26) и Обединеното кралство (19), което отразява основните направления на трудова миграция.

Разнообразието от възможни страни на произход - 96% български граждани и 4% чужденци от различни континенти - демонстрира глобалните връзки на страната и ролята на международната мобилност в разпространението на различни HIV варианти. Особено интересни са връзките с Украйна и Русия, които вероятно отразяват наскорошните миграционни потоци, особено след войната в Украйна [Załęski et al., 2024].

Специални популации и уязвими групи

Изследването идентифицира няколко специални популации с повишен риск или специфични характеристики. Лицата със сексуално предавани инфекции представляват 20,9% от изследваната популация, което подчертава връзката между различните СПИ и повишения риск за HIV. Сексуалните работници (3,0%) и лишените от свобода (5,0%) представляват маргинализирани групи, които изискват специализирани подходи за превенция и лечение.

Особено внимание заслужават бременните жени (16,7% от всички жени), при които HIV диагнозата има критично значение за превенцията на вертикалното предаване.

Социални детерминанти и неравенства

Демографският анализ разкрива значителни социални неравенства в разпространението на HIV. Високата концентрация сред ромското население (особено сред ИВН) и лишените от свобода, подчертава пресечните точки между социалната маргинализация и уязвимостта към HIV. Тези различия отразяват структурните неравенства в достъпа до здравеопазване, образование и социални услуги.

Географските различия между София и останалите региони също отразяват неравномерното разпределение на ресурсите и специализираните услуги. Концентрацията на експертизата и лечебните възможности в столицата, може да води до забавяне в диагностиката и лечението в периферните региони, въпреки усилията за децентрализация на грижите за хората с HIV.

5.2. АНТИРЕТРОВИРУСНА РЕЗИСТЕНТНОСТ - ЕПИДЕМИОЛОГИЯ И КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ

Общи тенденции в резистентността

Общата честота на резистентните мутации при 31,4% в изследваната популация от 1654 лица представлява важен индикатор за състоянието на HIV епидемията в България. Това ниво е съпоставимо с данните от други европейски страни [European Centre for Disease Prevention and Control, 2024; Hofstra et al., 2016], но разкрива значителни вариации между различните класове медикаменти, което отразява сложната динамика на употребата им в клиничната практика през изследвания период.

Най-висока е резистентността към NNRTI медикаменти, достигаща 19,3% от всички изследвани проби. Тази висока честота е очаквана, предвид широката употреба на ефавиренц в терапевтични схеми от първа линия до скорошно време. Ниската генетична бариера на този клас медикаменти означава, че единична мутация като K103N е достатъчна да предизвика високо ниво резистентност към EFV и NVP [Sluis-Cremer, N. and Tachedjian, G., 2008]. Това контрастира с данните от развитите западноевропейски страни като Франция и Германия, където навременното въвеждане на интегразни инхибитори е довело до по-ниски нива на NNRTI резистентност, обикновено между 10-12% [Petersen A. et al., 2018]. В наше актуално проучване [Alexiev I. et al., 2023] също потвърдихме тези тенденции в българската популация, където трансмисионната резистентност към NNRTI беше най-често срещана.

Резистентността към NRTI медикаменти, достигаща 15,4%, отразява историческата употреба на тези медикаменти като основа на антиретровирусната терапия. Интересно е да се отбележи, че много от установените NRTI мутации са полиморфни варианти с ограничено клинично значение, което подчертава важността на използването на актуални алгоритми за интерпретация. Еволюционните аспекти на NRTI резистентността разкриват сложни модели, където някои мутации като M184V,

показват феномена на компенсаторен ефект - докато причиняват резистентност към ЗТС/ФТС, те всъщност повишават чувствителността към AZT и TDF, предоставяйки интересни терапевтични възможности [Xu, H.T. et al., 2011].

Ниската резистентност към РІ от 1,7% отразява както ограничената употреба на тези медикаменти в съвременната клинична практика, така и тяхната висока генетична бариера. Протеазните инхибитори изискват множество мутации за развитие на клинично значима резистентност и се използват предимно при спасителни схеми или при пациенти с множествена резистентност. Тази тенденция е в съответствие с глобалните данни, където РІ резистентността рядко превишава 3-5% в общата популация [World Health Organization, 2024]. В нашето първо изследване на резистентност в България [Santoro M.M. et al., 2008] също съобщихме за ниски нива на РІ резистентност при наивни пациенти.

Социално-икономическите фактори играят важна роля в развитието на резистентност, като се наблюдават по-високи нива сред маргинализираните популации. Лицата със сексуално предавани инфекции показват 34,7% резистентност срещу 30,5% при тези без СПИ, което може да отразява по-лошия достъп до качествени здравни услуги, по-ниското придържане към терапията поради социални проблеми, и по-високите нива на рискови поведения. Възрастовите модели също разкриват интересни тенденции, като по-младите пациенти под 30 години показват леко по-високи нива на ТЛР, което може да отразява по-скорошните инфекции в популации с активно циркулиращи резистентни варианти [Paraskevis D. et al., 2019].

Трансмисионна лекарствена резистентност

Честотата на трансмисионната лекарствена резистентност от 5,7% при наивни за терапия пациенти се намира в долната граница на препоръчаните от СЗО нива и представлява важен индикатор за ефективността на лечението и контрола на епидемията на национално ниво [World Health Organization, 2021; Bennett, D.E. et al., 2009]. Това ниво е съпоставимо с данните от други европейски страни и предполага добро управление на HIV епидемията в България [Vercauteren et al., 2009]. В нашето изследване от 2015 г. [Alexiev I. et al., 2015] съобщихме за ТЛР от 5,9% в България за периода 1988-2011, което показва стабилност на тези нива в продължение на повече от десетилетие.

Сред 1053 изследвани лица, мутации, свързани с резистентност, са установени при 2,2% към NRTI, 1,8% към NNRTI и 2,1% към РІ. Само 0,4% от всички пациенти (4 души) показват резистентност към два класа медикаменти едновременно. Тези стойности отразяват ниска, но клинично значима степен на предавана лекарствена резистентност.

Международните сравнения поставят българските резултати в по-широк контекст. Скандинавските страни показват сравнително най-ниските нива на ТЛР между 3-4%, докато САЩ и повечето страни от Западна Европа демонстрират значително по-високи нива между 10-15%, отразяващи по-дългата история на антиретровирусна терапия и натрупването на резистентност с времето. За сравнение, страни от Източна Европа като Румъния и Полша показват умерени нива между 6-8%, което предполага наличието на регионални фактори, влияещи върху трансмисионната резистентност. Глобално, най-високите нива се наблюдават в някои региони на САЩ и Западна Европа (до 20%), Субсахарска Африка между 10-15% и Латинска Америка между 8-12%, където различни фактори са довели до натрупване на резистентност на популационно ниво [European Centre for Disease Prevention and Control, 2024].

Статистическият анализ идентифицира няколко ключови предиктора на ТЛР. Субтипът на вируса се оказва най-силният предиктор, като F1 показва изключително висок риск по отношение на шансовете. Рисковата група също играе важна роля, като мъжете, които правят секс с мъже, показват повишен риск. Географски фактори също

влият, като определени региони с висока плътност на случаи показват повишени нива. Интересно е че по-младите пациенти показват леко повишен риск, което може да отразява по-скорошните инфекции в активни трансмисионни мрежи.

Липсата на статистически значима тенденция към увеличение на трансмисионната резистентност през изследвания период е обнадеждаваща и контрастира с тенденциите в някои развиващи се страни, където се наблюдава постоянно увеличение. Детайлният анализ по години показва леки колебания с пикове през 2014 и 2018 г., които могат да отразяват специфични епидемични събития или промени в тестовите практики, но общата тенденция остава стабилна, предполагайки добър контрол на епидемията [Lunar, M.M. et al., 2018].

Мутационни профили и клинично значение

Детайлният анализ на специфичните резистентни мутации разкрива сложна картина от еволюционни адаптации и терапевтични предизвикателства. При NRTI класа най-често срещаната мутация S68G, представляваща 11,2% от всички мутации, е полиморфна мутация с ограничено клинично значение. Това откритие подчертава важноста на използването на актуални алгоритми за интерпретация, тъй като голяма част от тези мутации може да нямат реално клинично въздействие.

Класическите NRTI мутации разкриват интересни еволюционни модели. M184V остава най-клинично значимата NRTI мутация, идентифицирана в 12 случая. Тази мутация възниква бързо при терапия с 3ТС или FTC и води до висока резистентност към тези медикаменти чрез структурна промяна в активния център на обратната транскриптаза, която пречи на свързването на цитидиновите аналози [Diallo, K. et al., 2003]. В нашето изследване от 2008 г. [Santoro MM. et al., 2008] също съобщихме за M184V като най-честата NRTI мутация в България с честота 42,1% при пациенти на терапия. Мутационният модел M41L+T215D, установен при 3 пациенти, представлява класическия път "215-реверсия", където вирусът развива компенсаторни механизми за поддържане на репликативен фитнес при наличие на тимидинови аналози. Тези мутации често се асоциират с дълготрайна експозиция към AZT и D4T и демонстрират сложността на вирусната адаптация [Violin M. et al., 2004].

Идентифицирането на по-редки мутации като Y115F и L74V предоставя находки за алтернативните пътища на резистентност. Y115F е особено интересна, тъй като може да възникне при терапия с TDF и води до средно ниво резистентност към този медикамент чрез промени в позиционирането на нуклеотидния субстрат. L74V представлява специфична мутация асоциирана с ABC и DDI, която може да възникне като първа мутация при терапия с тези медикаменти [Shafer R.W. et al., 2007].

При 84 пациенти са установени множество (повече от една мутация) NRTI мутации, като най-честата комбинация M41L+T215D при 3 пациента представлява класическа комбинация, водеща до високо ниво резистентност към тимидинови аналози. Други интересни комбинации включват L74V+Y115F+M184V при 2 пациенти, която води до панрезистентност към повечето NRTI и представлява сериозно терапевтично предизвикателство.

При NNRTI мутациите се наблюдават различни еволюционни модели. V106I, представляваща 6,6% от всички мутации, е особено интересна, тъй като е характерна за субтип F1 и може да възникне спонтанно без терапевтичен натиск. Биохимичните изследвания показват, че V106I променя конформацията на свързващия джоб за NNRTI, намалявайки афинитета особено към ефавиренц [Sluis-Cremer N. et al., 2014]. Този факт може частично да обясни високите нива на NNRTI резистентност при субтип F1.

K103N остава най-честата NNRTI мутация с 18 случая и представлява типичната мутация за NNRTI резистентност. Тя възниква чрез единична нуклеотидна промяна и

води до висока резистентност към EFV и NVP чрез стерично препятстване за свързването на медикамента. Y181C представлява алтернативен път към резистентност, особено при терапия с NVP, като води до конформационни промени, които засягат свързването на всички NNRTI от първо поколение [Ren J. et al., 2000].

E138A, установена в 76 случая, е характерна мутация асоциирана с резистентност към рилпивирин. Тя често възниква в комбинация с други мутации като K101E или M230L за да достигне клинично значими нива на резистентност. Интересно е че E138A може да подобри чувствителността към EFV, демонстрирайки сложните взаимодействия между различните NNRTI [Xu, H.T. et al., 2013]. V179D, установена в 39 случая, е полиморфна мутация, която сама по себе си има ограничено клинично значение, но може да действа като компенсаторна мутация при наличие на други резистентни мутации.

При протеазните инхибитори доминирането на мутацията L90M отразява селекционния натиск от старите PI като нелфинавир и саквинавир. L90M води до резистентност чрез промяна в S1' субсайта на протеазата, което намалява афинитета към множество PI [Clavel, F. and Hance, A.J., 2004]. Тази мутация има относително нисък "fitness cost", което обяснява нейното персистиране дори при липса на селекционен натиск. В нашето изследване от 2008 г. [Santoro MM. et al., 2008] също съобщихме за L90M като най-честата PI мутация в България с честота 24,1%. D30N, установена в 3 случая, е специфична за нелфинавир и възниква в ранните стадии на PI терапия, водейки до висока резистентност към NFV, но запазвайки чувствителността към други PI като LPV и ATV [Condra J.H. et al., 1995].

Допълнителните мутации като L33F, N88D, и Q58E играят важна роля в модулирането на резистентността. Те рядко причиняват резистентност самостоятелно, но могат значително да усилят ефекта на главните мутации и да подобрят репликативния фитнес на резистентния вирус. L10F се явява като характерна компенсаторна мутация, която възстановява протеазната активност при наличие на главни резистентни мутации и често се наблюдава при дълготрайна PI терапия [Weber IT. et al., 2021].

Субтип-специфична резистентност

Най-поразителното откритие в областта на субтип-специфичната резистентност е изключително високото ниво при субтип F1, където 94,5% от всички изолати съдържат поне една резистентна мутация. Това представлява уникален феномен в глобалния контекст на HIV резистентност и изисква задълбочен анализ на възможните механизми. В нашето най-ново изследване [Alexiev et al., 2025] също потвърдихме високите нива на резистентност при не-B субтипове в България, като показахме че различните субтипове имат различни мутационни профили.

Биологичните обяснения за високата F1 резистентност включват субтип-специфичните особености в мутационните пътища. Субтипът може да има различна генетична бариера за развитие на резистентни мутации, поради синонимни кодонови различия, както е документирано за позиции 151 и 210 в обратната транскриптаза [Dumans et al., 2009]. Молекулярният анализ на F1 мутациите разкрива преобладаване на V106I, която представлява естествен полиморфизъм и може да възникне без терапевтичен натиск [Gatanaga et al., 2010]. Освен това, F1 показва висока честота на аксесорни протеазни мутации като M36I и L10V, които са документираны в 100% от изследваните F1 изолати [Ene et al., 2006].

Епидемиологичните фактори също могат да допринасят за високата F1 резистентност. Субтипът засяга предимно MSM популацията, която показва най-високи нива на резистентност като цяло. Възможно е популацията инфектирана с F1 да има различни характеристики по отношение на придържане към терапията. Социалните

фактори могат да влияят върху спазването на терапевтичните режими, водейки до селекционен натиск за резистентни варианти.

За сравнение, субтиповете А1 и А6 показват умерени нива на резистентност, които са съпоставими с глобалните данни за тези субтипове. В нашето най-ново изследване [Alexiev et al., 2025] показахме че А1 е асоциирана предимно с МСМ предаване (62,1%), докато А6 е предимно хетеросексуална (82,8%), което предполага различни епидемиологични динамики. Това предполага, че техните биологични характеристики не ги предразполагат към повишена резистентност. А1 показва концентрация на К103N мутации, което отразява историческата употреба на EFV при тази популация. Интересно е че А1 клъстерите, съдържащи К103N, са изцяло сред МСМ, предполагайки специфични терапевтични практики или социални фактори в тази група. А6 показва по-балансирано разпределение на резистентните мутации без ясна концентрация в определени класове, което може да отразява по-разнообразните терапевтични подходи при тази популация.

Субтип С показва изненадващо ниски нива на резистентност от 6,7%, което е под глобалните нива за този субтип. В Южна Африка, където субтип С е доминиращ, резистентността обикновено достига 15-20%. В нашия анализ на субтип С в България [Alexiev et al., 2022] показахме че този субтип има различни филогенетични корени и е бил въведен от различни източници. Възможните обяснения включват ограничения размер на популацията със субтип С в България, който може да не отразява реалните нива на лекарствена резистентност; по-ранното започване на антиретровирусна терапия при тези пациенти и достъпът им до по-ефективни терапевтични режими; както и потенциална селекционна пристрастност в извадката, при която пациентите със субтип С могат да притежават специфични клинични или поведенчески характеристики, благоприятстващи по-добър терапевтичен отговор.

Резистентност в трансмисионните клъстери

Анализът на резистентността в рамките на трансмисионните клъстери предоставя уникални находки за механизмите на разпространение на резистентни мутации в тесни социални мрежи [Wertheim et al., 2014; Dennis et al., 2012]. Най-забележителният пример е 14-членният клъстер в субтип В, съдържащ 13 секвенции с мутация L90M към PI, който представлява типичен случай за разпространение на PI резистентност в Европа. В нашето изследване [Alexiev I. et al., 2023] идентифицирахме множество клъстери с резистентни мутации в различни трансмисионни групи, което потвърждава сложността на този феномен.

Този клъстер демонстрира как единичен резистентен изолат може да се разпространи в тесна мрежа от индивиди чрез интензивни сексуални контакти. Филогенетичният анализ показва, че всички 13 секвенции споделят много близка еволюционна история, предполагайки произход от единичен източник, който впоследствие се е разпространил през период от 3-4 години. Мрежовият анализ разкрива, че 69% от връзките в този клъстер са МСМ-МСМ, 29,3% са МСМ-ХЕТ, и само една връзка е ХЕТ-ХЕТ, демонстрирайки централната роля на МСМ мрежите в разпространението на резистентни варианти.

Временният анализ показва, че този клъстер се е формирал в периода 2015-2018 г., вероятно заради неуспешна PI терапия при един или малък брой индивиди, последвана от бързо разпространение в тясна социална мрежа. Географското разпределение включва предимно София, но и два случая от Пловдив, предполагайки мобилност в рамките на мрежата. В нашето изследване на субтип В епидемията в България [Alexiev I. et al., 2020] също идентифицирахме големи клъстери предимно в МСМ популацията.

Друг значителен пример е 6-членният клъстер с мутация K103N при субтип A1, където всички филогенетични връзки са между MCM. Този клъстер показва различна динамика - формиран е в по-дълъг период между 2012-2019 г. и включва лица от различни възрастови групи между 25-45 години. Интересно е че всички 6 индивида са диагностицирани като наивни за терапия, което потвърждава, че K103N е предавана като ТЛР, а не придобита по време на неуспешна терапия.

Особено тревожен е четиричленният клъстер от CRF12_BF, характеризиращ се с множество мутации, свързани с резистентност към нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTI), включително K103N, V106VI и E138EK.

Нашето предишно изследване върху CRF01_AE в България [Alexiev I. et al., 2021] показва, че различните CRF могат да формират големи клъстери със специфични профили на лекарствена резистентност.

Настоящият клъстер демонстрира потенциала за натрупване на множество резистентни мутации в рамките на ограничени социални мрежи, което може сериозно да компрометира ефективността на антиретровирусната терапия.

Комбинацията от мутации води до пълна резистентност към NNRTI от първо поколение и значително понижена чувствителност към представители на второ поколение като ETR и RPV. Всички четирима индивида са MCM, на възраст между 28 и 35 години, живеещи в София и са диагностицирани в рамките на 18 месеца (2017–2018 г.). Това подсказва за възможно интензивно локално предаване в тясна социална среда.

Факторите, способстващи клъстърното разпространение, включват поведенчески елементи като високорискови практики, употреба на психоактивни вещества по време на сексуални контакти, и използването на модерни платформи за запознанства, които могат да улесняват формирането на тесни сексуални мрежи. Биологичните фактори включват висок вирусен товар при нелекувани индивиди или тези с терапевтичен неуспех, както и наличието на други сексуално предавани инфекции, които могат да увеличат риска за предаване на HIV.

Въздействия на резистентността върху терапията

Резултатите от анализа на резистентността имат пряко въздействие върху клиничната практика и изискват преосмисляне на терапевтичните подходи в България. Фенотипният анализ чрез Stanford HIVDB предоставя конкретни насоки за всеки клас медикаменти, които трябва да бъдат интегрирани в ежедневната клинична практика [Gandhi et al., 2024].

При NRTI класа установената висока резистентност към 3ТС и FTC поради единичната мутация M184V налага предпазливост при тяхната употреба. Въпреки това, TDF запазва отлична активност с обща резистентност от само 0,4%, правейки го предпочитан избор за гръбнак от NRTI. ABC може да служи като алтернатива при определени мутационни профили, но изисква внимателна оценка на риска от хиперсензитивни реакции. Полиморфните мутации като S68G изискват внимателна интерпретация, тъй като тяхното клинично значение е ограничено.

Драматичните различия в ефективността на медикаментите от клас NNRTI налагат съществена преоценка на терапевтичните подходи. EFV и NVP, които в продължение на години са били в основата на терапията от първа линия, демонстрират високи нива на резистентност, съответно 7,5% и 7,2% вследствие на широката им употреба в миналото и ниската им генетична бариера. Това прави тяхната употреба като първа линия неоправдана в съвременния контекст. RPV може да бъде опция, но изисква особено внимание към E138A мутациите, които могат да компрометират неговата ефективност. ETR запазва активност при повечето мутации от първо поколение и може да бъде

полезен при спасителни схеми. DOR, като нов представител на класа показва обещаващи резултати с ниска резистентност и може да представлява бъдещето на NNRTI терапията.

По отношение на резистентността, PI предоставят най-обнадеждаващите възможности за терапия, като DRV запазва отлична активност с минимални случаи на резистентност под 0,1%. Това потвърждава препоръките за използването му като предпочитан PI при спасителни схеми или при пациенти с множествена резистентност. NFV показва най-висока резистентност в класа и трябва да се избягва. ATV запазва добра активност при повечето мутации и може да служи като алтернатива на DRV при определени обстоятелства.

Въвеждането на INI революционизира лечението на HIV, особено при пациенти с резистентност към традиционните класове [Molina et al., 2015]. Поради липсата на кръстосана резистентност, тези медикаменти представляват приоритетен терапевтичен избор. Те са особено подходящи при пациенти с F1 субтип, който се характеризира с изключително висока резистентност към традиционните класове. Прилагат се и в случаи на множествена резистентност, когато терапевтичните опции са ограничени, както и като първа линия терапия за новодиагностицирани пациенти. Освен това имат значение за прекъсване на веригата на предаване на резистентни варианти в идентифицирани клъстери.

Разработени са специфични терапевтични алгоритми за различни клинични сценарии. За пациенти с F1 субтип се препоръчва задължително генотипизиране преди терапия, избор на INI като основа на лечението, избягване на NNRTI, и месечен мониторинг през първите 6 месеца. При пациенти в резистентни клъстери се препоръчва незабавно генотипизиране, комбинирани схеми с медикаменти от различни класове, интензивен мониторинг, епидемиологично проследяване на контактите, и общественоздравни мерки за прекъсване на предаването.

Терапевтичните отражения върху клиничната практика подчертават необходимостта от персонализиран подход към всеки пациент, отчитайки субтипа на вируса, рисковата група, географския регион, и историята на предишно лечение. Само чрез интегриране на тези фактори в клиничната практика може да се постигне оптимална терапевтична ефективност и да се предотврати по-нататъшното разпространение на резистентност.

5.3. ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ И СУБТИПОВО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА HIV-1 В БЪЛГАРИЯ

Комплексност на генетичното разнообразие

Настоящото изследване разкрива изключително високо генетично разнообразие на HIV-1 в България, с идентифицирани 26 различни субтипа и циркулиращи рекомбинантни форми (CRF) сред 1654 анализирани вирусни секвенции. Това ниво на разнообразие значително надвишава наблюдаваното в повечето европейски страни, където обикновено доминира субтип В, а присъствието на други варианти е ограничено [Beloukas et al., 2016]. Установеното разпределение – субтип В (56,0%), CRF01_AE (12,6%), CRF02_AG (7,5%), F1 (6,6%), уникални рекомбинантни форми (URF) (4,5%), A1 (4,2%), A6 (3,7%) и С (1,8%) – отразява специфичната географска позиция на България като пресечна точка между Европа, Азия и Африка.

Доминирането на субтип В (56,0%) е по-ниско в сравнение със страни като Великобритания (>80%), Германия (>75%) или Франция (>70%), което подчертава специфичния характер на епидемията в страната. В нашето изследване върху молекулярната епидемиология на субтип В [Alexiev I. et al., 2020] показахме, че това може да се обясни с по-късното въвеждане на HIV-1 в България, различните

миграционни потоци през преходния период и специфичните социално-икономически условия. Това контрастира с данните от Източна Европа, където субтип А6 доминира в страни като Русия и Украйна [Van de Klundert et al., 2022].

Динамика на CRF01_AE в България

Значителното присъствие на CRF01_AE (12,6%) представлява един от най-забележителните аспекти на българската HIV епидемия. Тази рекомбинантна форма е типична за Югоизточна Азия и рядко се среща в такива високи пропорции в европейски страни (обикновено <2%) [Beloukas A. et al., 2016]. В нашето детайлно изследване на CRF01_AE епидемията [Alexiev I. et al., 2021] филогенетичният анализ и молекулярното датиране демонстрират въвеждането на CRF01_AE около 1992 г. с произход от Виетнам, последвано от дълъг латентен период до масовото разпространение сред интравенозни наркомани в София през 2009-2011 г.

Епидемичният взрив на CRF01_AE е ключов етап в разпространението на този HIV-1 щам в региона. Байесовият анализ, който проведехме, датира най-скорошния общ предшественик към 1988 г., но масовото разпространение започва едва към 2003 г., което предполага дълъг период на подмолна циркулация [Alexiev I. et al., 2021]. CRF01_AE показва специфични демографски характеристики - по-висок дял жени (30,7% срещу 14,4% при другите субтипове), по-млада възраст при диагностициране и доминиращо разпространение сред ИВН (52,2%). Подобни модели на въвеждане и разпространение са описани и в други части на света, но рядко с такава детайлност [Alexiev I. et al., 2016].

Динамика на CRF02_AG в България

CRF02_AG със своите 7,5% представлява значително присъствие, особено като се има предвид африканския му произход. В нашето изследване за произхода и разпространението на CRF02_AG [Alexiev I. et al., 2016] молекулярното датиране указва въвеждането около 2000 г. с произход от Германия към Пловдив. Особено поразително е географското разпределение - 81,3% от всички CRF02_AG случаи са концентрирани в Пловдив спрямо само останалата част от страната). Тази географска концентрация е една от най-изразените регионални локализации на HIV-1 субтип в България.

CRF02_AG засяга предимно интравенозни наркомани (45,2%) и техните ХЕТ партньори, с относително балансирано разпределение между половете (75% мъже, 25% жени). Концентрацията в Пловдив може да отразява специфични миграционни връзки с Германия или ефект на основателя, подобен на описаните в други европейски региони [Verhofstede et al., 2018]. Нашите данни показват че CRF02_AG е въведен от Германия, вероятно чрез връщащи се работници-мигранти през ранните 2000-те години.

Динамика на субтип F1 в България

Субтип F1 е характерен за Южна Америка и демонстрира висока честота сред мъжете (88,1%), с отчетливо присъствие в популацията на MSM (56%). Наблюдаваната повишена честота на лекарствена резистентност при този субтип представлява интерес и може да бъде резултат от различни биологични (например различен вирусен фитнес), социални (като понижена терапевтична поносимост) или исторически фактори (възможно въвеждане на вече резистентни варианти). Нашият анализ показва повишена честота на NNRTI-свързани мутации, особено V106I. Тази мутация се счита за естествен полиморфизъм, който се открива и при наивни за АРТ индивиди и има минимално, ако изобщо има, въздействие върху чувствителността към NNRTI. Подобна епидемиологична характеристика на субтип F1 е документирана и в Румъния, където този субтип преобладава в хода на епидемията от над 30 години [Preda and Manolescu, 2022].

Динамика на субтипове A1 и A6 в България

Субтиповете A1 (4,2%) и A6 (3,7%) в България отразяват епидемиологични връзки със страните от бившия Съветски съюз, където A6 е доминиращият HIV-1 вариант, особено в Русия и Украйна. За разлика от типичния модел на разпространение на A1 сред интравенозни наркомани (ИВН) в страните на произход, в България този субтип се среща предимно сред мъже, които правят секс с мъже (МСМ) — 59,4%.

В нашето последно проучване на субтиповете A1, A6 и A7 [Alexiev et al., 2025] извършихме подробен молекулярно-епидемиологичен анализ, който разкри съществени различия в техните демографски и поведенчески профили на разпространение.

A6 представлява особен интерес поради балансираното разпределение по пол (58,1% мъже, 41,9% жени) и най-високия процент на въведени инфекции (38,7%), което вероятно отразява наскорошната миграция от Украйна и Русия, особено след войната от 2022 г. [Załęski et al., 2024]. Подобни тенденции на нарастване на субтип A6 са наблюдавани и в други европейски страни, които приемат мигранти от Източна Европа [Parczewski et al., 2017].

Ранното въвеждане на субтип С в България

Субтип С има ограничено разпространение от 1,8% и въпреки ниския си дял, е исторически значим като един от първите HIV-1 субтипове в България. В нашето специализирано изследване на произхода и разпространението на субтип С [Alexiev et al., 2022] филогеографският анализ разкрива многобройни въвеждания от различни източници: Замбия (9 случая), Южна Африка (8), Танзания (5), Швеция (3), което предполага комплексни международни връзки. Субтип С засяга предимно ХЕТ лица (83,3%) с балансирано разпределение между половете.

Това разнообразие от източници на въвеждане е необичайно за по-малка европейска страна и отразява сложните исторически връзки на България с различни региони на света [Alexiev et al., 2022]. За разлика от Южна Африка, където субтип С доминира епидемията, в България той остава ограничен в размер, но запазва генетичната си връзка с оригиналните африкански линии.

Уникални рекомбинантни форми и еволюционни процеси

Рекомбинацията при HIV-1 възниква когато клетка бъде едновременно инфектирана с различни вирусни варианти и по време на репликацията обратната транскриптаза "прескача" между различните РНК темплати. Този процес изисква високи нива на вирусна разнородност в същата популация и интензивни рискови поведения, които водят до ко-инфекции.

Идентифицирането на 74 URF, представляващи 4,5% от всички изолати, демонстрира активни процеси на вирусна рекомбинация в българската епидемия и поставя страната сред регионите с високи нива на HIV-1 рекомбинанти в Европа. Рекомбинацията при HIV-1 е фундаментален еволюционен механизъм, който генерира нови вирусни варианти чрез смесване на генетичен материал от различни родителски щамове.

Особено значими са 32-те F1B URF със специфични и идентични рекомбинантни точки между позиции 2253-2652 (F1 произход) и 2653-3554 (B произход) в *pol* гена. Това единообразие в рекомбинантните точки е значимо събитие и предполага произход от единично рекомбинантно събитие с последващо клонално разпространение в популацията.

Детайлният анализ с *jpHMM* и други рекомбинантни детекционни алгоритми потвърждава специфичността на рекомбинантните точки и предоставя доказателства за автентичността на тези рекомбинантни форми. При включване на референтните

секвенции от група М, българските F1B URF образуват самостоятелно разклонение с висока степен на достоверност ($SH = 0,84$) близо до субтип F1 за 5' региона и близо до субтип В ($SH = 0,93$) за 3' региона.

Освен F1B URF, са идентифицирани и други рекомбинантни форми включващи A1C, A1CD, A1D, BC, BF1 и други комбинации. Всяка от тези форми представлява уникално еволюционно събитие и предоставя възможности за изучаване на различни аспекти на биологията и адаптацията на вируса [Hemelaar J. et al., 2024].

5.4. ЕПИДЕМИОЛОГИЧНА ДИНАМИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧНИ ВРЪЗКИ

Времева динамика на епидемията

Филодинамичният анализ, който проведохме чрез Байесови коалесцентни методи, разкрива сложна времева динамика на HIV-1 епидемията в България. За субтип В установихме корен около 1980 г. (95% HPD: 1975-1986), което съвпада с началото на глобалната HIV епидемия и отразява ранното въвеждане на вируса в страната, вероятно чрез контакти със Западна Европа през периода на политическите промени в края на 1980-те години [Salemi et al., 2008].

Байесовият skyline анализ, който приложихме, демонстрира двуфазен растеж на епидемията - експоненциален подем преди 1990 г., плато в периода 1990-1996 г., и нов кратък експоненциален растеж около 2000 г., последван от стабилизиране [Alexiev I. et al., 2020]. Тази динамика отразява взаимодействието между биологичните характеристики на вируса, социално-икономическите промени в страната и развитието на здравните политики за борба с HIV/СПИН. Подобни модели на епидемична динамика са описани и в други преходни икономики от региона [Lunar et al., 2015].

Особено интересна е динамиката на CRF01_AE, чийто корен датирахме към 1992 г., но масовото разпространение започва едва около 2003 г. сред интравенозни наркомани в София [Alexiev I. et al., 2021]. Този модел на дълъг латентен период, последван от експоненциален растеж, е характерен за епидемии сред затворени популации и демонстрира как специфични социални условия могат да катализират бързото разпространение на определени вирусни варианти.

Трансмисионни мрежи и клъстери

Анализът на трансмисионните мрежи при генетично разстояние 1,5% идентифицира 283 клъстера включващи 457 секвенции (27,6% от всички анализирани). Това ниво на клъстериране предполага интензивно локално предаване и наличието на тесни сексуални или инжекционни мрежи.

Най-голямо клъстериране показва субтип В със 127 клъстера включващи 298 секвенции (31,8% от всички В секвенции). Това е очаквано предвид доминирането на субтип В и неговото дълго присъствие в страната. Интересно е разпределението на размера на клъстерите - повечето са малки (2-3 секвенции), но идентифицирахме и големи клъстери до 100 секвенции, което предполага различни модели на предаване.

Анализът на връзките в мрежите разкри доминиращо предаване MSM-MSM (55,8% от всички връзки) и MSM-XET (30,2%), което подчертава централната роля на MSM популацията в поддържането на епидемията. Особено интригуващ е високият процент на MSM-XET връзки, при които 96,2% от самоопределящите се като хетеросексуални са мъже. Това предполага наличието на скрити бисексуални контакти или неточно самоотчитане на рисковите практики, което има важни въздействия за превантивните стратегии [Dennis et al., 2012].

Географско разпределение и регионални особености

Географският анализ разкрива неравномерно разпределение на различните субтипове в страната. София концентрира 47,9% от всички случаи, но разпределението на субтиповете варира значително между регионите. CRF01_AE показва изключителна концентрация в София, което отразява епидемичния взрив сред ИВН в столицата [Alexiev I. et al., 2021]. За разлика от това, CRF02_AG доминира в Пловдив, което предполага различни миграционни пътища или социални мрежи [Alexiev I. et al., 2016]. Субтип В е относително равномерно разпределен, но с леко преобладаване извън Пловдив, което може да отразява различните социални динамики в различните региони [Alexiev I. et al., 2020].

Това географско разпределение има важни въздействия за планирането на превантивните програми и разпределението на ресурсите. Необходимо е различни региони да имат специфични стратегии адаптирани към доминиращите субтипове и уязвимите групи в съответния район [Paraskevis et al., 2016].

5.5. ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ И ТРАНСМИСИОННИ МРЕЖИ

Методологични постижения в трансмисионния анализ

Настоящото изследване представлява най-обширното молекулярно-епидемиологично изследване на HIV-1 в България, комбинирайки различни аналитични подходи за динамиката на HIV-1. Използването на генетично разстояние от 1,5% за дефиниране на трансмисионните клъстери е валидирано в множество международни изследвания и представлява баланс между чувствителност и специфичност [Wertheim et al., 2017].

Интеграцията на ClusterPicker и MicrobeTrace инструментите, позволи не само идентифицирането на клъстерите, но и визуализацията на сложните мрежи от връзки между различни демографски и рискови групи [Ragonnet-Cronin et al., 2013]. Този подход надминава традиционните епидемиологични методи, които разчитат на самоотчитане на контакти, и предоставя обективна картина на действителните вериги на предаване.

Особено ценен е анализът на смесените клъстери, където се наблюдават връзки между различни трансмисионни категории. Например, установяването че 96,2% от MSM-XET връзките включват мъже в "хетеросексуалната" категория, предполага значителни несъответствия между самоотчитаното и действителното рисково поведение, което има критични въздействия за превантивните стратегии [Dennis et al., 2012].

Динамика на предаването в различни популации

Анализът на 6768 връзки в трансмисионните мрежи разкрива сложна екосистема от предаване, където различните рискови групи не функционират като изолирани популации, а са тясно свързани чрез мостови индивиди. Доминирането на MSM-MSM връзки (55,8%) подчертава централната роля на тази популация като движеща сила на епидемията, но значителният процент MSM-XET връзки (30,2%), демонстрира потенциала за разпространение към по-широката популация.

Субтип-специфичните модели на предаване предоставят допълнителни находки. При субтип В доминират MSM мрежите, което е съвместимо с историята на този субтип в развитите страни [Alexiev I. et al., 2020]. За сравнение, CRF01_AE показва концентрация сред ИВН, особено в София, което отразява специфичния епидемичен взрив в тази популация в началото на 2000-те години [Alexiev I. et al., 2021].

Географска концентрация и разпространение

Географският анализ на трансмисионните клъстери разкрива ясни модели на пространствена концентрация. София се установява като основен център на предаването на HIV с 47,9% от всички случаи, но по-важно е, че големите клъстери показват концентрация в определени региони или социални мрежи.

CRF01_AE клъстерите са почти изцяло концентрирани в София, особено сред ИВН популацията в определени части на града [Alexiev I. et al., 2021]. Това предполага наличието на локализирани социални мрежи с интензивни рискови практики, които са способствали за бързото разпространение на този субтип. Подобни географски концентрации на специфични субтипове са описани и в други европейски градове [Verhofstede et al., 2018].

Времева динамика на клъстерите

Молекулярният анализ на различните клъстери предоставя уникални находки във времевата динамика на епидемията [Drummond and Bouckaert, 2015]. Най-старите клъстери датират от края на 1980-те години и са свързани със субтип В, което е съвместимо с ранното въвеждане на HIV в България чрез връзки със Западна Европа [Salemi et al., 2008].

CRF01_AE клъстерите показват характерен модел с дълъг латентен период (1992-2003) последван от експоненциален растеж [Alexiev I. et al., 2021]. Този модел е типичен за въвеждането на нов патоген в затворена популация и последващото му разпространение при настъпване на благоприятни условия.

5.6. ТЕРАПЕВТИЧНИ ВЪЗДЕЙСТВИЯ И КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ

Ефективност на различните медикаменти

Фенотипният анализ чрез алгоритмите на Stanford HIVDB, предоставя важни насоки за клиничната практика. При NRTI класа, най-засегнати са медикаментите с ниска генетична бариера, като 3ТС и FTC, при които единствената мутация M184V води до висока резистентност. За сравнение, TDF запазва относително добра активност с обща резистентност от само 0,4%, което потвърждава препоръките за неговото използване като предпочитан гръбнак.

При нуклеозидните инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTI) се наблюдават съществени различия в ефективността между отделните представители. Ефавиренц и невирапин демонстрират високи нива на резистентност – съответно 7,5% и 7,2% – което вероятно се дължи на широката им употреба в миналото и ниската генетична бариера към резистентност. За сравнение, етравирин, който вече не се използва рутинно в клиничната практика, показва по-благоприятен профил. Въпреки че при него се отчита по-висок процент потенциална ниска резистентност (9,1%), той запазва клинична ефективност при множество от мутациите, характерни за NNRTI от първо поколение.

Най-обнадеждаващи са резултатите за PI класа, където дарунавир запазва отлична активност с минимални случаи на резистентност (<0,1%). Това потвърждава препоръките за използването му като предпочитан PI при спасителни схеми или при пациенти с резистентност към други медикаменти.

Субтип-специфични терапевтични съображения

Наличието на висока честота на резистентност изисква прилагането на специфични терапевтични стратегии, съобразени с характеристиките на засегнатата

популация. Препоръчително е провеждане на тест за резистентност преди инициране на антиретровирусна терапия при тези пациенти. Необходимо е също така да се осигури засилен клиничен мониторинг, включващ по-честа оценка на вирусния товар и своевременно преминаване към алтернативни режими при признаци на терапевтичен неуспех. Препоръчва се приоритетна употреба на интегразни инхибитори, поради липсата на кръстосана резистентност с други класове медикаменти.

За субтипове с по-ниска честота на резистентност, като A1 и C, могат да се прилагат стандартните терапевтични протоколи, като същевременно се отчита мутационният профил, характерен за всеки субтип [Alexiev et al., 2025].

Получените резултати подчертават необходимостта от персонализиран терапевтичен подход, базиран на вирусния субтип, тъй като различните субтипове демонстрират различни профили на резистентност. Рисквата група също играе ключова роля, при МСМ се наблюдава по-висока честота на резистентност, което изисква по-прецизни терапевтични стратегии. Историята на предходно лечение също е от значение дори при наивни пациенти, наличието на ТЛР може да наложи модификации в началния терапевтичен режим [World Health Organization, 2024].

5.7. МЕЖДУНАРОДНИ ВРЪЗКИ И ГЛОБАЛНО РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА HIV

Филогеографски анализ

Филогеографският анализ, който проведохме с глобален филогенетичен анализ със секвенции от целия свят, предоставя детайлна картина на международните връзки на българската HIV-1 епидемия. За субтип В установихме тесни връзки с множество страни, като най-значими са връзките с Израел (17 секвенции в сестринския клъстер), САЩ, Германия и Япония [Alexiev I. et al., 2020]. Тази разнородност предполага множество въвеждания през различни периоди, отразяващи различните миграционни потоци и икономически връзки.

Особено интересна е връзката с Израел, която може да отразява трудовата миграция на българи в тази страна през 1990-те години. Хронологичният анализ показва, че израелските секвенции предшестват българските, което подкрепя хипотезата за въвеждане от Израел.

За CRF01_AE филогеографският анализ ясно демонстрира произхода от Виетнам, с което България се присъединява към малкото европейски страни с документирано въвеждане на този субтип, който е широко разпространен в Азия [Alexiev I. et al., 2021]. Връзката с Виетнам може да се обясни с политическите и икономически връзки между двете страни през социалистическия период и след това.

CRF02_AG показва връзки, главно с Германия, което отразява трудовата миграция и връщането на работници от Западна Европа [Alexiev I. et al., 2016]. Това въвеждане е относително скорошно (около 2000 г.) и концентрирано главно в региона на Пловдив.

Сравнение с европейските тенденции

Сравнението с данни от други европейски страни поставя българската епидемия в по-широк контекст. Генетичното разнообразие в България (26 различни варианта) надминава това в повечето западноевропейски страни, но е сходно с данните от други страни в региона на Балканите [Stanojevic et al., 2012].

Доминирането на субтип В (56%) е по-ниско в сравнение с това в Западна Европа (обикновено >70%), но значително по-високо от Източна Африка или Азия. Това позиционира България, като преходна зона между различните глобални HIV-1 епидемии [Van de Klundert et al., 2022].

Нивата на ТЛР (5,7%) са сравними с препоръките на СЗО и с данните от повечето европейски страни [World Health Organization, 2021]. Това предполага, че България е успяла да избегне проблемите с висока ТЛР, наблюдавани в някои страни от САЩ, Западна Европа, Африка или Латинска Америка.

Регионално значение

България заема уникална позиция в региона на Югоизточна Европа като кръстопът между различни глобални HIV епидемии [Stanojevic et al., 2012]. Документираното присъствие на субтипове от всички основни глобални региони (В от Европа/Америка, CRF01_AE от Азия, CRF02_AG от Африка, С от Южна Африка) прави страната важен център за изучаване на HIV еволюцията и адаптацията.

Разпространението на CRF01_AE сред хора, употребяващи инжекционно наркотици, е сред редките случаи на установено масово проникване на този субтип в европейски контекст и предлага ценна възможност за изследване на механизмите, стоящи зад междуконтиненталното разпространение на HIV [Alexiev I. et al., 2021].

5.8. ПРЕВЕНЦИЯ И НАДЗОР

Стратегии за превенция

Резултатите от настоящото изследване предоставят надеждна основа за разработването на основани на доказателства превантивни стратегии, насочени към ограничаване на разпространението на HIV. Идентифицирането на активни трансмисионни клъстери създава възможност за прилагане на таргетирани интервенции, които да прекъснат веригите на предаване още в ранен етап, преди да се разширят в по-широки мрежи.

Сред мъжете, които правят секс с мъже (МСМ), се наблюдават най-високите нива на лекарствена резистентност и най-плътно клъстъриране, което подчертава необходимостта от интензифициране на превантивните усилия. Това включва по-често тестване за HIV и други сексуално предавани инфекции, разширяване на достъпа до PrEP за лица с висок риск от инфекция, прилагане на подходи за партньорско уведомяване, включително използване на филогенетични данни за установяване на потенциални източници на инфекция, както и програми за преодоляване на социалната стигма, която ограничава търсенето на грижи.

За хората, употребяващи инжекционно наркотици, въпреки по-ниските нива на резистентност, концентрацията на субтип CRF01_AE изисква целенасочени интервенции [Alexiev I. et al., 2021]. Необходими са усилия за разширяване на програмите за заместваща терапия (като метадон), засилване на мерките за намаляване на вредите чрез осигуряване на стерилни игли и спринцовки, както и предоставяне на интегрирани услуги, които съчетават лечение на зависимости с HIV диагностика, терапия и психосоциална подкрепа.

Системи за надзор

Наблюдаваните резултати подчертават необходимостта от приоритизиране на молекулярната епидемиология като основен компонент в стратегиите за контрол на HIV епидемията. Проследяването на резистентните мутации чрез генетично секвениране не само има значение за индивидуалната клинична оценка, но играе и критична роля в разбирането на еволюционната динамика и разпространението на вируса в реални популационни мрежи. Наличието на трансмисионни клъстери, съдържащи широко разпространени мутации като K103N, E138A/K и V106I, подчертава риска от предаване

на вече резистентни вирусни варианти, което може да намали ефективността на първичните терапии и да усложни контрола върху епидемията.

В този контекст, рутинното генотипизиране при новодиагностицирани случаи следва да се възприеме не просто като клиничен инструмент, а като централен елемент в националната система за надзор. Данните от тестовете за резистентност трябва да бъдат интегрирани в систематични бази данни, позволяващи времеви и географски анализи на тенденциите в разпространението на мутациите. Подобен подход дава възможност за навременно идентифициране на възникващи резистентни клъстери и за информирано планиране на интервенции на популационно ниво.

Осигуряването на експертен капацитет за анализ и интерпретация на молекулярните данни е също от съществено значение. Това включва обучение на здравни специалисти и лабораторен персонал в използването на филогенетични и биоинформатични методи, както и внедряване на стандартизирани протоколи за оценка на резистентността. Обединението между молекулярната епидемиология и класическите подходи към надзора има потенциал да подобрят мониторинга на HIV.

Достъп до медицинско обслужване и подобряване на терапевтичните резултати

Резултатите от изследването подчертават критичната роля на равномерния достъп до качествено медицинско обслужване за ефективното управление на HIV епидемията и ограничаването на лекарствената резистентност. Наблюдаваните географски различия в разпределението на случаите, с концентрация в големите градски центрове, отразяват съществуващи неравенства в достъпността на специализирани HIV услуги. Тези неравенства могат да доведат до забавена диагностика, неоптимално лечение и повишен риск от развитие на резистентност при пациенти от отдалечени региони.

Осигуряването на широк достъп до регулярен мониторинг включва не само рутинни лабораторни изследвания за вирусна натоварка и CD4+ клетки, но и своевременно провеждане на тестове за резистентност при терапевтична неуспешност. Децентрализирането на HIV грижите чрез развитие на регионални центрове за лечение, внедряване на телемедицински консултации и осигуряване на транспортна подкрепа за пациенти от отдалечени райони са ключови стратегии за преодоляване на географските бариери.

Интегрирането на HIV грижите с основното здравно обслужване може да подобри както достъпността, така и качеството на терапевтичното проследяване. Обучението на лекари от първичното звено в управлението на HIV инфекцията, заедно с осигуряването на консултантска подкрепа от специалисти, могат значително да разширят капацитета на здравната система за ефективно лечение на хора, живеещи с HIV, особено в области с ограничени ресурси. Подобен подход би допринесъл за по-ранно откриване на терапевтична неуспешност, навременно коригиране на лечението и в крайна сметка – за намаляване на риска от развитие и разпространение на лекарствена резистентност.

5.9. ГЛАВНИ ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОУЧВАНЕТО

Въпреки широкия обхват и задълбочената методология на изследването, съществуват редица съществени ограничения, които следва да бъдат отчетени при интерпретацията на получените резултати.

На първо място, селекционното пристрастие представлява важно ограничение. Една част от анализиранияте вирусни секвенции са получени от пациенти с конкретни клинични индикации за провеждане на генотипиране, което потенциално би могло да доведе до надценяване на честотата на лекарствената резистентност спрямо реалното

разпространение в общата популация на хора, живеещи с HIV. Продължителният времеви хоризонт на изследването – обхващащ повече от три десетилетия – включва различни терапевтични епохи, характеризирани с променящи се клинични практики и нива на достъп до лечение. Тези фактори ограничават извеждането на хомогенни и категорични изводи относно динамиката на резистентността през цялото разглеждано време.

Макар изследването да обхваща цялата страна, географската концентрация на анализирания случаи в големите градски центрове може да ограничи представителността му и да не отразява напълно епидемиологичната ситуация в по-малките и отдалечени населени места. Освен това, ограничената наличност на социално-икономически данни, ограничава възможността за по-задълбочен анализ на влиянието на социалните детерминанти върху възникването и разпространението на лекарствена резистентност. Липсата на такива данни затруднява оценката на структурни неравенства в достъпа до грижи и лечение.

Допълнително ограничение е свързано с определянето на трансмисионната категория въз основа на самооценка, предоставена от пациентите по време на диагностичния процес. Този метод е податлив на информационно изкривяване, обусловено от социална стигма, страх от дискриминация или правни и културни бариери, които могат да възпрепятстват точното отчитане на реалните модели на поведение. Особено значими са ограниченията при самоотчитането на принадлежност към силно стигматизирани групи като МСМ, ИВН, сексуални работници и други уязвими популации. Социалният натиск, страхът от правни последици и дискриминацията в здравната система могат да доведат до подценяване на действителния дял на тези трансмисионни категории в епидемиологичните данни. В резултат, трансмисионната категория, използвана в анализа, може да не отразява обективно пътя на инфектиране, което ограничава точността на епидемиологичната интерпретация и ефективността на целевите интервенции, насочени към конкретни рискови групи.

Накрая, ограниченията на филогенетичните методи следва да бъдат ясно изразени. Макар тези подходи да са полезни за идентифициране на епидемиологични клъстери и проследяване на предавателни връзки, те не позволяват еднозначно определяне на посоката на предаване на вируса, или разграничаване между директни и индиректни контакти.

5.10. ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ЗНАЧЕНИЕ ЗА ОБЩЕСТВЕННОТО ЗДРАВЕ

Настоящото проучване представлява най-мощния и задълбочен анализ на молекулярната епидемиология на HIV-1 в България и вероятно един от най-комплексните в региона на Югоизточна Европа. Чрез съчетание на филогенетични, времеви, пространствени и резистентностно-специфични анализи, изследването разкрива детайли от епидемичното поведение на вируса с висока степен на резолюция.

Демографският анализ установи ясно преобладаване на мъжете и драматични промени в трансмисионните пътища през наблюдавания период. От доминиране на хетеросексуалното предаване в началните години на епидемията, се наблюдава значително нарастване на инфекциите сред МСМ, особено в по-късния период на изследването. ИВН показват епидемичен пик в средата на първото десетилетие, последван от съществено намаление.

Всестранното картографиране на генетичното разнообразие идентифицира 26 различни субтипа и рекомбинантни форми – свидетелство за изключително сложна и динамична вирусна циркулация. Установените пътища на въвеждане от различни

географски региони подчертават интернационалния характер на епидемията в страната. Прецизното времево датиране на ключови събития допълнително спомага за реконструкцията на еволюционните и трансмисионните процеси.

Особено значим компонент от изследването е детайлният анализ на антиретровирусната резистентност, който притежава съществено клинично и стратегическо значение. Проведеният молекулярен скрининг обхваща както предавана, така и придобита лекарствена резистентност, като идентифицира ключови мутации, свързани с намалена ефективност на основни терапевтични режими.

Анализът установи значителна честота на резистентни мутации в общата популация, като най-високи нива се наблюдават при NNRTI, следвани от NRTI и PI. MCM показват най-висока резистентност, докато ИВН са с най-ниска. Изследването разкри зачестяващи случаи на резистентност към нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза, както и поява на мутации срещу инхибитори на протеазата и интегразата – класове, които са критично важни в съвременната антиретровирусна терапия.

Наличието на мултирезистентни профили в някои клъстери подчертава нуждата от интензивен молекулярен надзор и превантивно управление на терапевтичните ресурси. Резултатите допринасят за по-добро прогнозиране на риска от терапевтичен неуспех и осигуряват основа за въвеждане на устойчиви подходи към HIV мениджмънта в условията на еволюираща лекарствена устойчивост.

Изследването допринася към международната база от знания, като предоставя данни за редки мутационни комбинации и за разпространение на нововъзникващи резистентни щамове, които досега не са били добре характеризирани в региона. Чрез публикуване на резултатите в международни издания, научната общност получава достъп до емпирични доказателства с потенциално приложение отвъд националните граници.

В по-широк контекст, резултатите укрепват капацитета на националната здравна система за справяне с бъдещи епидемични предизвикателства, като осигуряват емпирично обоснована рамка за изграждане на устойчиви надзорни и терапевтични стратегии. Изследването демонстрира ефективността на молекулярната епидемиология като стратегически инструмент не само за научно разбиране, но и за практическо управление на инфекциозни заболявания.

От гледна точка на общественото здраве, изследването има непосредствено и дългосрочно значение. Осигурява се възможност за целенасочено терапевтично планиране, оптимизация на ресурсното разпределение и насочване на интервенции към уязвими популации, включително пациенти с повишен риск от неуспешно лечение. Това позволява не само по-точно персонализиране на лечението, но и информира ранното адаптиране на националните терапевтични протоколи в съответствие с актуалния профил на резистентност.

В ерата на прецизната медицина, такива данни са ключови за адаптиране на индивидуализирани стратегии с цел постигане на максимална ефективност при минимален риск от резистентност. Филогенетичният анализ идентифицира множество активни трансмисионни клъстери с различни размери, демонстрирайки продължаващо локално разпространение на резистентни щамове във всички основни субтипове.

Специализираните анализи в международните публикации допълват общата картина с детайлни реконструкции на еволюционната история, установявайки множественни въвеждания от различни географски региони и специфични трансмисионни мрежи за всеки субтип.

В заключение, анализът на антиретровирусната резистентност, съчетан с цялостната реконструкция на епидемичната динамика, превръща настоящото изследване в модел за интердисциплинарна работа с висока приложна стойност, приложим както в България, така и в други държави със сходни епидемиологични профили.

6. ИЗВОДИ

Комплексни изводи за епидемиологията и антиретровирусната резистентност на HIV-1 в България

Настоящата дисертация представя изчерпателен и многоаспектен анализ на молекулярната епидемиология и антиретровирусната лекарствена резистентност на HIV-1 в България за периода 1989–2023 г. Използваният интегриран подход, включващ генотипиране, филогенетичен и филодинамичен анализ, както и задълбочена характеристика на резистентни мутации и трансмисионни мрежи, разкрива ключови епидемиологични модели и еволюционни тенденции. Получените резултати имат пряко значение за оптимизирането на терапевтичните стратегии и усъвършенстването на политиките в областта на общественото здраве в страната.

I. АНТИРЕТРОВИРУСНА РЕЗИСТЕНТНОСТ И МУТАЦИОННИ ПРОФИЛИ

1. Детайлната характеристика на антиретровирусната резистентност в България демонстрира ниска честота на първична резистентност (5,7%) при нелекувани пациенти, съответстваща на критериите на СЗО за контролирана епидемия, което потвърждава ефективността на съществуващите стратегии за първична превенция.
2. Систематичното идентифициране и класифициране на мутациите, свързани с резистентност към PI, NRTI и NNRTI, очертава характерен мутационен профил. Отчита се висока хетерогенност в резистентните модели, включваща комбинации от множество мутации, като придобитата резистентност при лекувани пациенти се асоциира с продължителността на терапията и историята на предходни терапевтични режими.
3. Анализът на многобройните резистентни мутации и тяхното кумулативно въздействие върху ефективността на терапията, разкрива сложни взаимодействия между отделните мутации, налагащи персонализиран подход при избора на терапевтична схема за постигане на оптимални клинични резултати.
4. Изследването на кръстосаната резистентност в рамките на NRTI и NNRTI антиретровирусни медикаменти, показва значителни ограничения в терапевтичните възможности при определени мутационни профили, изискващи адаптиране на прилаганите терапевтични алгоритми.
5. Фенотипната интерпретация на генотипните мутации чрез съвременни прогностични алгоритми, като Stanford HIVDB, предоставя научно обоснована основа за прогнозиране на терапевтичния отговор и оптимизиране на клиничния процес на вземане на решения в условията на антиретровирусна резистентност.

II. МОЛЕКУЛЯРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ И ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ

6. Комплексното секвениране и филогенетичен анализ на 1654 фрагмента от *pol* гена на HIV-1, събрани в период от тридесет и пет години, създава обширна молекулярна база данни, която представлява фундаментален ресурс за разбирането на вирусната еволюция и динамиката на епидемията в България.
7. Проучването установи наличието на 26 различни HIV-1 субтипа, циркулиращи и уникални рекомбинантни форми, в българската популация. Наблюдаваната висока генетична хетерогенност отразява сложни епидемиологични взаимодействия и свидетелства за многократното въвеждане на вируси от различни географски региони, което подчертава динамичния характер на епидемията в страната.
8. Идентифицирането и характеризирането на нови или редки HIV-1 варианти и рекомбинантни форми, които са въведени и разпространени в страната, обогатява познанието за глобалната молекулярна епидемиология и подчертава значението на България като епидемиологичен кръстопът в Югоизточна Европа.
9. Прилагането на биоинформационни методи за филогенетичен анализ разкрива наличието на сложни еволюционни връзки, проявяващи се чрез формирането на локални клъстери. Установени са и множество международни филогенетични връзки, което демонстрира глобалната свързаност на епидемията от HIV-1.
10. Анализът върху разпространението на генетичните варианти и еволюционната динамика на основните циркулиращи субтипове, разкрива различни модели на популационен растеж и времеви тенденции, които отразяват специфичните епидемиологични характеристики и контексти, асоциирани с всеки отделен субтип на HIV-1.

III. ЕПИДЕМИОЛОГИЧНА ДИНАМИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ

11. Реконструкцията на филогенетични дървета чрез методи на максимална правдоподобност и байесова статистика, осигурява надеждна филогенетична рамка с висока статистическа достоверност, валидираща еволюционните връзки на българските изолати.
12. Филодинамичният анализ и датирането на въвеждането на основните HIV-1 субтипове (субтип B, CRF01_AE, CRF02_AG и субтип C) в България чрез молекулярен часовник, установява времевите рамки на епидемиологичните събития и тяхната корелация с исторически и социални фактори.
13. Комбинираният анализ на пространствено-времевата динамика и глобалните филогенетични връзки на основните HIV-1 субтипове в България, разкрива сложни миграционни модели, многобройни независими въвеждания от различни географски региони и филогеографски маршрути на разпространение. Установено е неравномерно регионално разпределение, с концентрация в големите градски центрове, както и наличие на локализиран епидемичен

взривове, което подчертава значението на този подход за стратегическо епидемиологично планиране и контрол.

14. Идентифицирането и характеристиката на филогенетични трансмисионни клъстери чрез съвременни биоинформационни инструменти, като ClusterPicker, MicrobeTrace и BEAST, разкриват активни вериги на предаване, локализирани епидемични взривове и предоставят ценен инструментариум за проследяване на епидемиологичната динамика.
15. Изследването на трансмисионните мрежи и динамиката на разпространение между различните уязвими групи (MCM, ХЕТ, ИВН) разкрива сложни взаимодействия и преливане на вируси между популациите, налагащи адаптирани превантивни стратегии за отделните специфични групи.

IV. ДЕМОГРАФСКИ И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ КОРЕЛАЦИИ

16. Статистическият анализ установи значими асоциации между наличието на резистентни мутации и определени демографски променливи. Получените резултати подчертават необходимостта от прилагане на диференцирани подходи както в епидемиологичното наблюдение, така и в персонализираната терапия на HIV инфекцията.
17. Анализът на разпределението на HIV-1 субтиповете и резистентните мутации по трансмисионни категории и уязвими групи разкрива ясно изразени епидемиологични различия между популациите, изискващи целенасочени стратегии за превенция и терапия. Най-висока честота на резистентност е установена сред MCM, значително превишаваща тази при ХЕТ и ИВН. Субтиповото разпределение също показва групова специфика - субтип В преобладава при MCM, докато CRF01_AE и CRF02_AG са по-често срещани при ИВН.
18. Анализът на географското разпределение на HIV-1 субтипове и резистентни мутации в България, разкрива изразени регионални различия, които имат значение за епидемиологичния надзор и планирането на интервенции. Почти половината от всички случаи (47,9%) са регистрирани в София, където се отчита и по-висока честота на резистентност (29,0%). Субтип CRF01_AE е предимно концентриран в София, CRF02_AG доминира в Пловдив, а субтип В е разпространен по-равномерно в страната. Тези различия подчертават необходимостта от прилагане на регионално адаптирани мерки за превенция и епидемиологичен надзор.
19. Анализът на времевите тенденции в разпространението на лекарствена резистентност, показва относителна стабилност в честотата на първичната резистентност през анализирания период. Това свидетелства за устойчивостта и ефективността на прилаганите антиретровирусни терапевтични протоколи и подчертава значението на продължаващия мониторинг с цел ранно откриване на евентуални промени в резистентните профили.

V. КЛИНИЧНИ ПРИЛОЖЕНИЯ И ПРЕВАНТИВНИ СТРАТЕГИИ

20. Оценката на клиничното значение на идентифицираните мутации, асоциирани с лекарствена резистентност, демонстрира пряко въздействие върху подбора на антиретровирусни режими, като позволява избягване на медикаменти с намалена ефективност. Резултатите подкрепят прилагането на персонализиран терапевтичен подход, базиран на генотипен анализ, с цел повишаване на терапевтичния успех и ограничаване на допълнителното развитие на резистентност в българската клинична практика.
21. Оценката на националните практики за мониторинг на лекарствената резистентност при HIV-1, потвърждава прилагането на интегрирана система за епидемиологичен надзор, основана на рутинно генотипиране на всички новодиагностицирани случаи, съобразена с европейските стандарти и международни препоръки. Въз основа на анализа са идентифицирани ключови направления за усъвършенстване на стратегии за превенция чрез насочени интервенции в рискови популации, с цел ограничаване на вторичната трансмисия на резистентни вирусни варианти. Тези резултати осигуряват научно обоснована рамка за разработване на устойчиви, доказателствено базирани политики за контрол и профилактика на резистентността в национален мащаб.

7. ПРИНОСИ

Научните приноси от настоящото изследване се класифицират в две основни категории според тяхната оригиналност и значимост за развитието на генотипирането, анализа на резистентните мутации и изследването на молекулярната епидемиология на HIV-1 в България.

ПРИНОСИ С НАУЧНО-ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

I. Молекулярна епидемиология и генетично разнообразие

1. Създадена е най-обширната молекулярно-епидемиологична база данни за HIV-1 в България с анализ на 1654 pol секвенции от 35-годишен период (1989-2023), представляваща фундаментален ресурс за изследванията както в страната, така и глобално.
2. Доказано е изключително генетично разнообразие на HIV-1 в България с документиране на 26 различни субтипа, CRFs и URFs, надвишаващо значително генетичната хетерогенност в някои европейски страни.
3. Идентифицирани са 74 уникални рекомбинантни форми (URFs) в pol региона, включително 32 F1B URF с идентични рекомбинантни профили в анализираната генетична област, което предполага произход от общ предшественик.
4. Реконструирана е комплексната молекулярна хронология и филогеография на HIV-1 епидемията в България чрез филодинамичен анализ и молекулярен часовник, които установяват времевите рамки на въвеждането на основните субтипове и разкриват многобройни независими въвеждания на отделните субтипове - B, C, CRF01_AE и CRF02_AG от различни географски региони по света.

II. Антиретровирусна резистентност

5. Проведен е първият комплексен национален анализ на антиретровирусната резистентност върху 1654 HIV-1 секвенции, установяващ обща честота от 31,4% с диференцирани профили за PI (1,7%), NRTI (15,4%) и NNRTI (19,3%).
6. Документирана е контролирана епидемия на трансмисионна резистентност с честота 5,7% при 1053 нелекувани пациенти, съответстваща на критериите на СЗО за успешен епидемиологичен контрол.
7. Доказани са статистически значими корелации между резистентни мутации и демографски характеристики, с най-високи нива при MSM (35,7%) и най-ниски при ИВН (13,6%).

III. Трансмисионни клъстери, мрежови анализи, географски и демографски модели

8. Приложена е комплексна методология за анализ на филогенетични трансмисионни клъстери чрез използване на широк набор биоинформационни инструменти, включително ClusterPicker, MicrobeTrace и BEAST, създаваща нов стандарт за молекулярен епидемиологичен надзор.
9. Картографиран са активни трансмисионни мрежи на HIV-1, разкриващи доминиране на MSM-MSM връзки и значими междупопулационни MSM-XET

връзки, което предоставя ценен инструмент за разбиране на структурите на предаване и насочване на епидемиологичния надзор.

10. Анализирани са филогенетични трансмисионни клъстери при всички основни HIV-1 субтипове, разкриващи субтип-специфични модели на циркулираща резистентност и епидемиологична динамика.
11. Документирани са субтип-специфични географски модели (концентрация на CRF01_AE в София, доминиране на CRF02_AG в Пловдив), половите профили и трансмисионните категории (МСМ, ИВН, хетеросексуално предаване), което предоставя ценен ресурс за разбиране на епидемиологичната динамика на HIV-1 в страната.

ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

I. Клинична практика и терапевтични стандарти

12. Усъвършенстван е националният стандарт за персонализирана HIV терапия чрез рутинен генотипен анализ, предоставящ на клиницистите актуална информация за резистентния профил на пациентите, която подпомага индивидуализиране на терапията от първа линия, адаптиране при терапевтичен провал и планиране на спасителни терапевтични режими.

II. Епидемиологичен надзор и превантивни системи

13. Осигурена е научна основа за подобрен епидемиологичен надзор и целенасочени превантивни стратегии чрез предоставяне на данни за активни трансмисионни клъстери и мрежи между рискови групи на Консултативния съвет по HIV/СПИН и сексуално предавани инфекции, улесняващи информирано вземане на решения за прекъсване на веригите на предаване.
14. Потвърдена е ефективността на националните превантивни политики чрез демонстриране на устойчивост на трансмисионната резистентност и идентифициране на ключови рискови връзки, което осигурява емпирична основа за оптимизиране на превантивните програми и адаптиране на интервенциите в различни рискови групи.

III. Стратегическо планиране и здравни политики

15. Осигурена е научна основа за регионално адаптирани здравни стратегии чрез документирани географските различия в субтиповото разпределение и резистентност, подпомагащи целенасочено разпределение на ресурсите и адаптиране на терапевтичните подходи според регионалните особености.
16. Предоставени са данни за международни филогенетични връзки и миграционни модели на Консултативния съвет по HIV/СПИН и сексуално предавани инфекции за информиране на политиките за трансгранично сътрудничество и координирани превантивни действия.
17. Генерирани са комплексни молекулярно-епидемиологични данни, осигуряващи емпирична основа за актуализиране на националната стратегия за превенция и контрол на HIV/СПИН и адаптиране на интервенциите според установените епидемиологични тенденции.

IV. Научен капацитет и международно сътрудничество

18. Разработени са методологични стандарти за молекулярна епидемиология на HIV-1, утвърждаващи България като регионален център чрез публикуване на уникални данни и документиране на редки епидемиологични феномени.
19. Изградени са национални експертни компетентности чрез обучение на специалисти, трансфер на знания и създаване на устойчив капацитет за дългосрочен епидемиологичен надзор и изследвания.

Заклучение:

Настоящите научни приноси представляват най-обширното и задълбочено вирусологично изследване на HIV-1 в България, създаващо стабилна научна основа за клиничната практика, общественото здраве и националните политики, като същевременно обогатява международното разбиране за молекулярната епидемиология на HIV-1 в региона на югоизточна Европа.

8. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Alexiev I, Shankar A, Pan Y, Grigorova L, Partsuneva A, Dimitrova R, et al. Transmitted HIV Drug Resistance in Bulgaria Occurs in Clusters of Individuals from Different Transmission Groups and Various Subtypes (2012–2020). *Viruses*. 2023;15(4):941.
2. Alexiev I, Beshkov D, Shankar A, Hanson DL, Paraskevis D, Georgieva V, et al. Diagnostic challenges of HIV-1 group O infections. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(2):294-309.
3. Alexiev I, Shankar A, Wensing AMJ, Beshkov D, Elenkov I, Stoycheva M, et al. Low HIV-1 transmitted drug resistance in Bulgaria against a background of high clade diversity. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(6):1874-1880.
4. Alexiev I, Shankar A, Dimitrova R, Gancheva A, Kostadinova A, Teoharov P, et al. Origin and spread of HIV-1 in persons who inject drugs in Bulgaria. *Infect Genet Evol*. 2016;46:269-278.
5. Alexiev I, Campbell EM, Knyazev S, Pan Y, Grigorova L, Dimitrova R, et al. Molecular epidemiology of the HIV-1 Subtype B sub-epidemic in Bulgaria. *Viruses*. 2020;12(4):441.
6. Alexiev I, Campbell EM, Knyazev S, Pan Y, Grigorova L, Dimitrova R, et al. Molecular epidemiological analysis of the origin and transmission dynamics of the HIV-1 CRF01_AE sub-epidemic in Bulgaria. *Viruses*. 2021;13(1):116.
7. Alexiev I, Mavian C, Paisie T, Ciccozzi M, Dimitrova R, Gancheva A, et al. Analysis of the Origin and Dissemination of HIV-1 Subtype C in Bulgaria. *Viruses*. 2022;14(2):263.
8. Beloukas A, Psarris A, Giannelou P, Kostaki E, Hatzakis A, Paraskevis D. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect Genet Evol*. 2016;46:180-189.
9. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. 2009;4(3):e4724.
10. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med*. 2004;350(10):1023-35.
11. Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature*. 1995;374(6522):569-71.
12. Dennis AM, Hué S, Hurt CB, Napravnik S, Sebastian J, Pillay D, et al. Phylogenetic insights into regional HIV transmission. *AIDS*. 2012;26(14):1813-22.
13. Diallo K, Götte M, Wainberg MA. Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(11):3377-83.
14. Drummond AJ, Bouckaert RR. Bayesian evolutionary analysis with BEAST. Cambridge University Press; 2015.
15. Dumans AT, Barreto CC, Santos AF, Souza AS, Teodoro R, Oliveira M, Tanuri A, Soares MA. Distinct resistance mutation and polymorphism acquisition in HIV-1 protease of subtypes B and F1 from children and adult patients under virological failure. *Infect Genet Evol*. 2009;9(1):62-70.
16. Ene L, Duiculescu D, Ruta SM. Polymorphisms and resistance mutations in the protease and reverse transcriptase genes of HIV-1 F subtype Romanian strains. *J Clin Virol*. 2006;36(1):43-49.
17. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2024 – 2023 data. Stockholm: ECDC; 2024.
18. Gandhi RT, Landovitz RJ, Sax PE, Smith DM, Springer SA, Günthard HF, et al. Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2024 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA*. 2024.
19. Gatanaga H, Suzuki Y, Tsang H, Yoshimura K, Kavlick MF, Nagashima K, et al. Amino acid substitutions in Gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors. *J Biol Chem*. 2002;277(8):5952-61.

20. Hofstra LM, Sauvageot N, Albert J, Alexiev I, Garcia F, Struck D, et al. Transmission of HIV drug resistance and the predicted effect on current first-line regimens in Europe. *Clin Infect Dis*. 2016;62(5):655-663.
21. Hemelaar J, Looman CWN, Shaw GM, Gouws E, Ghys PD, De Cock KM, et al. Global and regional genetic diversity of HIV-1 in 2010-21: systematic review and analysis of prevalence. *Lancet Microbe*. 2024;5(8):100884.
22. Lunar MM, Lepej SŽ, Tomažič J, Vovko TD, Pečavar B, Turel G, et al. HIV-1 transmitted drug resistance in Slovenia and its impact on predicted treatment effectiveness: 2011-2016 update. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196670.
23. Lunar MM, Vandamme AM, Tomažič J, Karner P, Vovko TD, Pečavar B, et al. Bridging epidemiology with population genetics in a low incidence MSM-driven HIV-1 subtype B epidemic in Central Europe. *BMC Infect Dis*. 2015;15:65.
24. Molina JM, Clotet B, van Lunzen J, Lazzarin A, Cavassini M, Henry K, et al. Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir for treatment-naïve adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 96 week results from a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet HIV*. 2015;2(4):e127-36.
25. Paraskevis D, Beloukas A, Stasinou K, Pantazis N, de Mendoza C, Bannert N, et al. HIV-1 molecular transmission clusters in nine European countries and Canada: association with demographic and clinical factors. *BMC Med*. 2019;17(1):4.
26. Paraskevis D, Nikolopoulos GK, Magiorkinis G, Hodges-Mameletzis I, Hatzakis A. The application of HIV molecular epidemiology to public health. *Infect Genet Evol*. 2016;46:159-168.
27. Partsuneva A, Gancheva A, Dimitrova R, Grigorova L, Kostadinova A, Nikolova M, et al. Distinct Molecular Epidemiology, Transmission Patterns, and Resistance Mutations of HIV-1 Subtypes A1, A6, and A7 in Bulgaria. *Microorganisms*. 2025;13(5):1108.
28. Parczewski M, Leszczyszyn-Pynka M, Urbańska A. Differences in the integrase and reverse transcriptase transmitted resistance patterns in Northern Poland. *Infect Genet Evol*. 2017;49:122-129.
29. Petersen A, Cowan SA, Nielsen J, Fischer TK, Fonager J. Characterisation of HIV-1 transmission clusters and drug-resistant mutations in Denmark, 2004 to 2016. *Euro Surveill*. 2018;23(44):pii=1700633.
30. Preda M, Manolescu LCS. Romania, a Harbour of HIV-1 Subtype F1: Where Are We after 33 Years of HIV-1 Infection? *Viruses*. 2022;14(9):2081.
31. Ragonnet-Cronin M, Hodcroft E, Hué S, Fearnhill E, Delpech V, Brown AE, et al. Automated analysis of phylogenetic clusters. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:317.
32. Ren J, Nichols C, Bird LE, Fujiwara T, Sugimoto H, Stuart DI, et al. Binding of the second generation non-nucleoside inhibitor S-1153 to HIV-1 reverse transcriptase involves extensive main chain hydrogen bonding. *J Biol Chem*. 2000;275(19):14316-20.
33. Salemi M, Goodenow MM, Montieri S, de Oliveira T, Santoro MM, Beshkov D, et al. The HIV type 1 epidemic in Bulgaria involves multiple subtypes and is sustained by continuous viral inflow from West and East European countries. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24(6):771-9.
34. Santoro MM, Ciccozzi M, Alteri C, Montieri S, Alexiev I, Dimova I, et al. Characterization of drug-resistance mutations in HIV type 1 isolates from drug-naïve and ARV-treated patients in Bulgaria. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24(9):1133-1138.
35. Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*. 2007;21(2):215-23.
36. Sluis-Cremer N, Jordan MR, Huber K, Wallis CL, Bertagnolio S, Mellors JW, et al. E138A in HIV-1 reverse transcriptase is more common in subtype C than B: implications for rilpivirine use in resource-limited settings. *Antiviral Res*. 2014;107:31-4.
37. Sluis-Cremer N, Tachedjian G. Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virus Res*. 2008;134(1-2):147-56.

38. Stanojevic M, Alexiev I, Beshkov D, Gökengin D, Mezei M, Minarovits J, et al. HIV 1 molecular epidemiology in the Balkans: a melting pot for high genetic diversity. *AIDS Rev.* 2012;14(1):28-36.
39. van de Klundert MA, Antonova A, Di Teodoro G, Ceña Diez R, Chkhartishvili N, Heger E, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Eastern Europe and Russia. *Viruses.* 2022;14(10):2099.
40. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, Hamouda O, et al. Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis.* 2009;200(10):1503-8.
41. Verhofstede C, Dauwe K, Fransen K, Van Laethem K, Van den Wijngaert S, Ruelle J, et al. Phylogenetic analysis of the Belgian HIV-1 epidemic reveals that local transmission is almost exclusively driven by men having sex with men despite presence of large African migrant communities. *Infect Genet Evol.* 2018;61:36-44.
42. Violin M, Cozzi-Lepri A, Velleca R, Vincenti A, D'Elia S, Cargnel A, et al. Risk of failure in patients with 215 HIV-1 revertants starting their first thymidine analog-containing highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2004;18(2):227-35.
43. Weber IT, Wang YF, Harrison RW. HIV protease: Historical perspective and current research. *Viruses.* 2021;13(5):839.
44. Wertheim JO, Leigh Brown AJ, Hepler NL, Mehta SR, Richman DD, Smith DM, et al. The global transmission network of HIV-1. *J Infect Dis.* 2014;209(2):304-13.
45. Wertheim JO, Oster AM, Johnson JA, Switzer WM, Saduvala N, Hernandez AL, et al. Transmission fitness of drug-resistant HIV revealed in a surveillance system transmission network. *Virus Evol.* 2017;3(1):vex008.
46. Xu HT, Asahchop EL, Oliveira M, Quashie PK, Quan Y, Brenner BG, et al. Compensation by the E138K mutation in HIV-1 reverse transcriptase for deficits in viral replication capacity and enzyme processivity associated with the M184I/V mutations. *J Virol.* 2011;85(21):11300-8.
47. Xu HT, Colby-Germinario SP, Asahchop EL, Oliveira M, McCallum M, Schader SM, et al. Effect of mutations at position E138 in HIV-1 reverse transcriptase and their interactions with the M184I mutation on defining patterns of resistance to rilpivirine and other non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3100-9.
48. Załęski A, Lembas A, Dyda T, Siwak E, Osińska J, Suchacz M, et al. Changes in Primary HIV-1 Drug Resistance Due to War Migration from Eastern Europe. *J Immigr Minor Health.* 2024;26(1):15-22.

ОФИЦИАЛНИ ДОКУМЕНТИ И ДОКЛАДИ:

46. World Health Organization. HIV drug resistance strategy, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021.
47. World Health Organization. Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach. Geneva: WHO; 2021.
48. World Health Organization. HIV drug resistance - brief report 2024. Geneva: WHO Press; 2024.

9. ПРИЛОЖЕНИЯ

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1.

Ivailo Alexiev, Anupama Shankar, Reneta Dimitrova, Anna Gancheva, Asia Kostadinova, Pavel Teoharov, Elitsa Golkocheva, Maria Nikolova, Mariya Muhtarova, Ivaylo Elenkov, Mariyana Stoycheva, Daniela Nikolova, Tonka Varleva, and William M. Switzer

Origin and spread of HIV-1 in persons who inject drugs in Bulgaria. *Infection, Genetics and Evolution* 2016, 46: 269-278.

BioRx Impact Factor: 2.885

Scimago Journal Rank: Q1

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134816302015?np=y>

2.

Gkikas Magiorkinis, Konstantinos Angelis, Ioannis Mamais, Aris Katzourakis, Angelos Hatzakis, Jan Albert, Glenn Lawyer, Osamah Hamouda, Daniel Struck, Jurgen Vercauteren, Annemarie Wensing, Ivailo Alexiev, Birgitta Åsjö, Claudia Balotta, Ricardo J. Camacho, Suzie Coughlan, Algirdas Griskevicius, Zehava Grossman, Anders Horban, Leondios G. Kostrikis, Snjezana J. Lepej, Kirsi Liitsola, Marek Linka, Claus Nielsen, Dan Otelea, Roger Paredes, Mario Poljak, Elizabeth Puchhammer-Stöckl, Jean Claude Schmit, Anders Sönnernborg, Danica Staneková, Maja Stanojevic, Charles A.B. Boucher, Georgios Nikolopoulos, Tetyana Vasylyeva, Samuel R. Friedman, D.A.M.C. van de Vijver, G. Angarano, M-L. Chaix, A. de Luca, K. Korn, C. Loveday, V. Soriano, S. Yerly, M. Zazzi, Anne-Mieke Vandamme, Dimitrios Paraskevis

The global spread of HIV-1 subtype B epidemic.

Infection, Genetics and Evolution 2016, 46: 169-179.

BioRx Impact Factor: 2.885

Scimago Journal Rank: Q1

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.041>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27262355>

3.

Ivailo Alexiev, Alessandra Lo Presti, Reneta Dimitrova, Brian Thomas Foley, Anna Gancheva, Asya Kostadinova, Lora Nikolova, Silvia Angeletti, Eleonora Cella, Ivaylo Elenkov, Mariana Stoycheva, Daniela Nikolova, Tsetsa Doychinova, Liliya Pekova, Massimo Ciccozzi.

Origin and Spread of HIV-1 Subtype B Among Heterosexual Individuals in Bulgaria

AIDS Res Hum Retroviruses, Vol. 34, No. 3 2017 Dec 19. Published Online: 1 Mar 2018

BioRx Impact Factor: 1.935

Scimago Journal Rank: Q2

DOI: 10.1089/AID.2017.0167

<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/AID.2017.016>

4.

Alexiev, I.; M. Campbell, E.; Knyazev, S.; Pan, Y.; Grigorova, L.; Dimitrova, R.; Partsuneva, A.; Gancheva, A.; Kostadinova, A.; Seguin-Devaux, C.; M. Switzer, W. Molecular Epidemiology of the HIV-1 Subtype B Sub-Epidemic in Bulgaria. *Viruses* 2020, 12, 441.

Bioxbio Impact Factor: 5.048

Scimago Journal Rank: Q1

<https://doi.org/10.3390/v12040441>

<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/4/441>

5.

Alexiev I, Campbell EM, Knyazev S, Pan Y, Grigorova L, Dimitrova R, Partsuneva A, Gancheva A, Kostadinova A, Seguin-Devaux C, Elenkov I, Yancheva N, Switzer WM. Molecular Epidemiological Analysis of the Origin and Transmission Dynamics of the HIV-1 CRF01_AE Sub-Epidemic in Bulgaria. *Viruses*. 2021; 13(1):116.

Bioxbio Impact Factor: 5,818

Scimago Journal Rank: Q1

<https://doi.org/10.3390/v13010116>

<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/116#cite>

6.

Alexiev I, Mavian C, Paisie T, Ciccozzi M, Dimitrova R, Gancheva A, Kostadinova A, Seguin-Devaux C and Salemi M. Analysis of the Origin and Dissemination of HIV-1 Subtype C in Bulgaria *Viruses* 2022, 14(2), 263;

<https://doi.org/10.3390/v14020263>

<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/2/263>

Bioxbio Impact Factor: 3.8

Scimago Journal Rank: Q1

7.

Luka Jovanovic, Marina Siljic, Valentina Cirkovic, Dubravka Salemovic, Djordje Jevtovic, Ivailo Alexiev, Snjezana Zidovec-Lepej, Maja Oroz, Josip Begovac, Dimitrios Paraskevis, Lemonia Skoura, Dimitrios Chaztidimitriou, Evangelia G Kostaki, Snezana Dragas, Brankica Dupanovic, Dan Otelea, Simona Paraschiv, Mario Poljak, Maja M Lunar, Maja Stanojevic (2022). HIV-1 subtype B spread through cross-border clusters in the Balkans: a molecular analysis in view of incidence trends. *AIDS* (London, England).

DOI: 10.1097/QAD.0000000000003394

https://journals.lww.com/aidsonline/Abstract/9900/HIV_1_subtype_B_spread_through_cross_border.115.aspx

Bioxbio Impact Factor: 3.8

Scimago Journal Rank: Q1

8.

Alexiev, I., Shankar, A., Pan, Y., Grigorova, L., Partsuneva, A., Dimitrova, R., Gancheva A., Kostadinova A., Elenkov I., Yancheva N., Grozdeva R., Strashimirov D., Stoycheva M., Baltadzhiev I., Doichinova T., Pekova L., Kosmidis M., Emilova R., Nikolova M. and Switzer, W. M. (2023). Transmitted HIV Drug Resistance in Bulgaria Occurs in Clusters of Individuals from Different Transmission Groups and Various Subtypes (2012–2020). *Viruses*, 15(4), 941.

<https://doi.org/10.3390/v15040941>

<https://www.mdpi.com/1999-4915/15/4/941>

Bioxbio Impact Factor: 3.8

Scimago Journal Rank: Q1

Монография

Публикувана е монография, свързана с дисертационния труд за присъждане на научната степен „доктор на науките“.

Автор: Ивайло Алексиев Иванов. Заглавие: "HIV, АНТИРЕТРОВИРУСНИ МЕДИКАМЕНТИ И РЕЗИСТЕНТНИ МУТАЦИИ" София, 2024, ISBN 978-619-04-0323-4

СПЕЦИАЛИЗАЦИИ И ОБУЧЕНИЯ В ЧУЖБИНА

- **2018:** Стипендия от „Фулбрайт“ – гост-изследовател, **Университет на Флорида, Гейнсвил, САЩ (5 месеца)**
- **2016:** Обучение по секвениране и анализ на резистентни мутации при HIV, **Люксембургски институт по здравеопазване (2 седмици)**
- **2014:** Международен уъркшоп по биоинформатика вирусна еволюция и молекулярна епидемиология - Virus Evolution and Molecular Epidemiology (VEME), **Рим, Италия (1 седмица)**
- **2013:** Обучение по филогенетика и NextGen секвениране (MiSeq, PacBio), **CDC, Атланта, САЩ (2 месеца)**
- **2009:** Секвениране на вирусни и зоонозни агенти, **NAMRU-3, Кайро, Египет (1 седмица)**
- **2006:** Международен уъркшоп по биоинформатика вирусна еволюция и молекулярна епидемиология - Virus Evolution and Molecular Epidemiology (VEME), **Атина, Гърция (1 седмица)**

МЕЖДУНАРОДНО СЪТРУДНИЧЕСТВО

- CDC – Атланта, САЩ
- Университет на Флорида, САЩ
- Bio-Medico University, Рим, Италия
- Люксембургски здравен институт

НАГРАДИ

- **2017 СТИПЕНДИЯ от FULBRIGHT САЩ.**
Стипендии „Фулбрайт“ за преподаване и изследвания 2018 г.
Тема: Стипендии „Фулбрайт“ за преподаване и изследвания
Ръководител на проекта: Ивайло Алексиев.
Период: януари-май 2018 г.

- **2017 СТИПЕНДИЯ от Virology Education Холандия.**
Тема: Стипендии за участие в конференция за 15-та Европейска среща по HIV и хепатит - стратегии за лечение и антивирусна лекарствена резистентност на 7 - 9 юни 2017 г. в Рим, Италия,
Период: 7 - 9 юни 2017 г.
- **Награда за най-добър постер** от 12-та Европейска среща за HIV и хепатити, 26-28 март 2014, Барселона, Испания (12-the European Meeting on HIV and Hepatitis, 26-28 March 2014, Barcelona, Spain.) Наградата включва и финансиране за следващата среща през 2015 г.

ЧЛЕНСТВО В НАУЧНИ ОРГАНИЗАЦИИ

- Съюз на учените в България
- Българско дружество по вирусология
- European Society for Translational Antiviral Research (ESAR)
- Euroguidelines in Central and Eastern Europe Network Group (ECEE)

БЛАГОДАРНОСТИ

- Изказвам своята искрена благодарност към предишните ръководители на Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV – проф. Радка Аргинова и гл. ас. Данаил Бешков – за доверието, подкрепата и вдъхновението.
- Благодаря на директорите на НЦЗПБ, под чието ръководство съм работил – акад. Богдан Петрунов, проф. Христо Тасков, проф. Тодор Кантарджиев и проф. Ива Христова – за тяхната подкрепа и визионерство.
- Благодаря на моите колеги от Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV – гл. ас. Ренета Димитрова, Ася Костадинова, Анна Христова, Александра Парцунова и Любомира Григорова – за подкрепата, професионализма, доверието и отличната екипна работа през годините на съвместната ни работа.
- Благодаря на колегите от НЦЗПБ, с които сме работили рамо до рамо в различни направления – за сътрудничеството, споделяния опит и колегиалната подкрепа.
- Изказвам своята благодарност и към клиницистите от отделенията на клиниките за лечение на хората, живеещи с HIV – за тяхната всеотдайност, професионализъм и за съвместната ни работа в името на пациентите.
- Благодаря на колегите от международното научно сътрудничество, за ползотворното сътрудничество, експертизата и приноса им към общата ни работа.
- Изказвам уважение към колегите, работили преди мен в Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV, които с труда си са изградили здрава основа и професионална традиция, върху която днес продължаваме да надграждаме.

На моето семейство

Най-дълбока и сърдечна благодарност изказвам на моето семейство – за безусловната любов, търпение и ежедневна подкрепа, без които този труд нямаше да бъде възможен.

Благодаря ви, че винаги сте стояли до мен, особено в периоди на натоварване, трудности и изпитания, съпътстващи изследователската и писмената работа. Благодаря за разбирането и подкрепата по време на дългите часове, посветени на научния труд. Благодаря ви за любовта и обичта с която ме дарявате. Тази дисертация е резултат не само на научни усилия, но и на вашата постоянна вяра в мен.

Ивайло Алексиев Иванов

Дисертационен труд за присъждане на научна степен
ДОКТОР НА НАУКИТЕ.

София 2025 г.