

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Отдел „Вирусология“

Чийдем Баариева Исмаилова

**Проучвания върху серологичните и молекулярно
генетичните характеристики на вируса на хепатит Е**

АВТОРЕФЕРАТ НА ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

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

Професионално направление: 4.3. Биологически науки;

Научна специалност: Вирусология

Научен ръководител: доц. д-р Любомира Николаева-Гломб, дм

Научен консултант: гл. ас. Елица Голкочева-Маркова, дм

София 2026 г.

Дисертационният труд е изработен в Отдел „Вирусология“, в НРЛ „Хепатитни вируси“ към Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), гр. София.

Проучванията са финансирани от Националния център по заразни и паразитни болести, София, България, Проект „Проучвания върху генотипното разнообразие и участието на полипролиновия регион в ин витро адаптацията на хепатит Е вируса“, финансиран от ФНИ” КП-06-Н33/2 и Проект BG05M2OP001-1.002-0001 „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“, финансиран от ОП „Наука и образование за интелигентен растеж 2014 – 2020“.

Вътрешната защита се състоя пред разширен колегиум на Отдел „Вирусология“ на 02.06.2026 г. от 10:00 ч.

Дисертационният труд се състои от списък с използвани съкращения, увод, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане, заключение и изводи, приноси, литература и приложения.

Дисертационният труд съдържа 116 страници, 30 фигури и 24 таблици, 3 приложения. Библиографията включва 195 литературни източника.

Материалите във връзка със защитата са публикувани на интернет страницата на НЦЗПБ и се намират на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, гр. София.

Дисертационният труд е насрочен за публична защита на 14. 09. 2026 г. в аулата на НЦЗПБ, бул. Янко Сакъзов № 26, гр. София, на открито заседание на научното жури, назначено със заповед № 182/30.06.2026 г. на Директора на НЦЗПБ, съгласно ППЗРАСРБ на НЦЗПБ и ЗРАСРБ.

Съдържание

Използвани съкращения:.....	3
Увод.....	4
I. Цел и задачи	5
II. Материали и методи.....	6
1. Материали:	6
2. Методи.....	8
2.1. Имуноензимни методи	8
2.2. Молекулярно-биологични методи	8
2.3. Секвениране	11
2.4. Статистическа обработка на резултатите.....	15
III. Резултати.....	16
1. Откриване на серологични маркери на инфекция с <i>HEV</i> в серумни проби от различни популации.....	16
1.1. Проспективна група	16
1.2. Ретроспективна група.....	19
2. Значението на пола, възрастта за разпространение на <i>HEV</i> инфекция.....	22
2.1. Разпространение на инфекцията с <i>HEV</i> в различни възрастови групи	22
2.2. Разпределение на серопозитивните лица по пол.	26
2.3. Разпределение на anti <i>HEV</i> Ig M (+) проби според нозологията и професията.....	28
3. Доказване на вирусна РНК и определяне на вирусен товар	29
4. Корелация между серологични и молекулярни маркери	30
5. Молекулярно-генетична характеристика на изолати на <i>HEV</i>	30
5.1. <i>Nested</i> PCR за получаване на ген-специфични ампликони	30
5.2. Генотипно определяне на изолатите на <i>HEV</i>	31
5.3. Кладистичен анализ на получените секвенции на <i>HEV</i>	33
IV. Обсъждане	39
V. Заключение	49
VI. Изводи.....	50
VII. Декларация за оригиналност. Приноси	51
VIII. Литература	53
IX. Публикации, свързани с темата на дисертационния труд	60
X. Участия в международни и национални научни форуми във връзка с дисертационния труд	61
XI. Научни проекти свързани с дисертационния труд	63
XII. Приложения	64

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

кДНК – комплементарна ДНК

Клейд – монофилетична група, включваща общ предшественик и потомци

ОВХ – остър вирусен хепатит

РНК – рибонуклеинова киселина

СЗО – Световна здравна организация

ЧЗ – чернодробно заболяване

ЧЦ – чернодробна цироза

ACLF – *acute-on-chronic liver failure*, остра хронична чернодробна недостатъчност

ALT – *alanine aminotransferase*, аланин аминотрансфераза

AST – *aspartate aminotransferase*, аспартат аминотрансфераза

CRE – *cis reactive elements*, цис-реактивни елементи

ddNTPs – *Dideoxynucleotides* - дидезоксирибонуклеотиди

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ензимно-свързан имуносорбентен тест

ET-NANB – *enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis*, ентерално преносим не-А, не-В вирусен хепатит

HAV – *hepatitis A virus*, хепатитен вирус А

HBV – *hepatitis B virus*, хепатитен вирус В

HBsAg – *hepatitis B surface antigen*, повърхностен антиген на вирус на хепатит В

HEV – *hepatitis E virus*, хепатитен вирус Е

HCV – *hepatitis C virus*, хепатитен вирус С

HDV – *hepatitis D virus*, хепатитен вирус Д

Hel – *helicase-like domain*, хеликазоподобен домейн

HVR - *hypervariable region*, хипервариабилен регион

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses* Международен комитет по таксономия на вирусите

NTR – *Non-Translating Region*, нетранслиращ се участък

ORF – *Open Reading Frame*, отворена рамка за четене

PCR – *Polymerase Chain Reaction*, полимеразна верижна реакция

PT-NANB – *parenterally transmitted non-A, non-B hepatitis*, парентерално предаван хепатит не А, не В

PCP – *Papain-like cysteine protease*, папаин подобна цистеин протеаза

MT – *Methyltransferase*, метилтрансфераза

RdRp – *RNA-dependent RNA polymerase*, РНК зависима –РНК полимераза

УВОД

Хепатит Е е описан през 1979 г. при изучаване на възникнала епидемия в Индия. Хепатитът се разпространявал по фекално-орален път, след консумация на контаминирана вода. Вирусът на хепатит Е (Hepatitis E virus, *HEV*) е открит чрез електронна микроскопия през 1981 г., а през 1990 г. част от вирусния геном е клониран и секвениран. Той е признат за петия хепатотропен вирус, заедно с вирусите А, В, С и D.

HEV има важно значение за човешката патология. Инфекцията с *HEV* може да протече като остра и/или хронична, фулминантна и безсимптомна форма, а се описват и извънчернодробни прояви, които може да са единствена манифестация. Генетичните характеристики на вируса имат отношение към разпространението, клиничното протичане и тежестта на инфекцията. Различните генотипове на *HEV* циркулират в различни географски региони, имат различни таргетни групи и в това отношение *HEV* няма аналог.

В България инфекцията с *HEV* се изучава от края на XX век, но системни данни за разпространението ѝ към онзи период липсват. В последните две десетилетия интересът към заболяването расте, увеличава се броят на публикациите от български автори. През 2019 г. „ХЕПАТИТ Е - остър“ е включен в *Наредба 21 за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести* и оттогава ежегодно се трупат нови данни за клиничните прояви, засегнатите групи лица и честотата на разпространение.

Настоящият дисертационен труд има за цел да разшири проучванията за инфекцията с *HEV* в България чрез изследване на серопревалирането в различни популации и чрез изследване на генетичните характеристики на вируса. Получените резултати ще допринесат за обогатяване на досега натрупаните данни за инфекцията в страната, както и за разработването на програми за превенция.

I. Цел и задачи

Цел

- Да се проучат серопревалирането на хепатит Е и молекулярно-генетичните характеристики на вирусните изолати на *HEV* за периода 2015-2023 год. в хетерогенна популация.

За осъществяване на целта са поставени следните задачи:

Задачи

1. Да се установи циркулацията на *HEV* чрез откриване на маркерите на инфекцията в серумни проби от различни популации.
2. Да се оцени значението на пола, възрастта, професията и рисковите фактори за развитието на инфекцията с *HEV*.
3. Да се търси РНК на *HEV* в серумните проби с установени *anti HEV* антитела.
4. Да се оцени корелацията между серологични и молекулярни маркери на инфекцията с *HEV*.
5. Да се генотипират изолатите на *HEV*.

II. Материали и методи

1. Материали:

Обработени са общо 2467 проби (цялостна кръв и серум от болни и здрави лица от различни популации и различни лечебни заведения в страната), получени в НРЛ „Хепатитни вируси“ на НЦЗПБ - (Приложение 2).

Изследвани популации (Табл. 1)

* 1823 проспективни серумни проби на хоспитализирани лица с различни диагнози:

с водещи чернодробни заболявания: неуточнен остър вирусен хепатит; остър вирусен хепатит Е; друго чернодробно заболяване – мастна дегенерация, токсичен хепатит; лица със случайно открити повишени стойности на чернодробните трансаминази.

с други заболявания - бъбречно заболяване; онкологично заболяване; неврологично заболяване, лица с други клинични прояви : диария, колит, вирусни инфекции и др.

лица без отбелязана диагноза на придружителния фиш

Таблица 1. Разпределение на проспективните серумни проби по обединяващи критерии

Група/популация	Брой (n)
	Проспективни
Неуточнен ОВХ (НОВХ)	1006
Лица с работна диагноза (ОВХЕ)	177
Неуточнено чернодробно заболяване (НЧЗ)	68
Случайно открити повишени нива на чернодробните трансаминази (ПЧТ)	43
Извънчернодробни заболявания*	193+2+4=199
Без диагноза (БД)	330
ОБЩО	1823

* лица с други заболявания: бъбречни, онкологични, вирусни инфекции и др.

* 644 ретроспективни серумни проби на лица от хетерогенна популация, събрани в периода 2015 г. - 2023 г., в изпълнение на заложените задачи по научно изследователски проект „Проучвания върху генотипното разнообразие и участие на полипролиновия регион в ин витро адаптацията на хепатит Е вируса“, финансиран от Фонд научни изследвания с договор №КП-06-Н-33/2 от 13.12.2019 г. Някои от характеристиките на тази популация са представени на Табл. 2

Таблица 2. Разпределение на ретроспективните проби по обединяващи критерии-заболявания, професия, донори на кръв

Група/популация	Брой (n)
	Ретроспективни
Ветеринарни лекари (ВЛ)	75
Кръвни донори (КД)	94
Пациенти с чернодробна цироза (ПЦ)	22
Деца с хематологични заболявания (ДсХЗ)	16
Пациенти с бъбречна недостатъчност на хронична диализа (ПХ)	218
ХИВ-позитивни (ХИВ)	219
ОБЩО	644

* серумните проби са предоставени от биологичната банка на НРЛ „Морбили, паротит, рубеола“.

Интерпретацията на получените резултати е съобразена с препоръките на Европейската асоциация за проучвания на черния дроб (*European Association Study of the Liver, EASL*, 2018) – Приложение 3

2. Методи

2.1. Имуноензимни методи

Ензимно свързан имуносорбентен метод (*ELISA*) за доказване на специфични антитела - *anti-HEV IgM/ anti-HEV IgG*

Установяването на *anti-HEV IgM/IgG* е извършено с качествени имуноензимни китове - *anti-HEV IgM/ anti-HEV IgG ELISA* на търговската марка *Dia.Pro*, Италия.

Тестът се изпълнява съгласно указанията на фирмата производител.

2.2. Молекулярно-биологични методи

2.2.1. Екстракция на вирусна РНК

Вирусната РНК се екстрахира от серумните проби с автоматична система за екстракция на нуклеинови киселини *ExiPrep™ 16 Dx*, на фирмата *Bioneer* с помощта на комбиниран *ExiPrep™ Dx Viral DNA/RNA* екстракционен набор и избор на програма за екстракция на вирусна РНК. Апаратурата е налична в НРЛ „Хепатитни вируси“. Екстрактът с елуираната РНК е с обем 50 µl при изходен обем на серумната проба от 400 µl.

2.2.2. Полимеразно верижна реакция в реално време с обратна транскрипция за определяне на вирусен товар (real time RT-PCR)

Откриването и количественото определяне на концентрацията на вирусна РНК се извършва с *RealStar HEV RT-PCR kit2.0* (Altona Diagnostics, Германия) съгласно инструкциите на производителя.

Реакцията е извършена в обем 50 µl при следния температурен режим (Таблица 3):

Таблица 3. Протокол и температурни параметри за *Real-time RT-PCR* за количествен анализ на РНК на *HEV*.

Етап от амплификацията	Брой цикли	Температура [°C]	Време [мин:сек]
Обратна транскрипция	1	55	20:00
Денатурация	1	95	02:00
Амплификация	45	95	00:15
		55 (отчитане на сигнал)	00:45
		72	00:15

2.2.3. Обратна транскрипция и амплификация на комплементарна ДНК (кДНК) от специфичен участък от вирусния геном на *HEV*

За генотипиране на изолатите на *HEV* екстрахираната РНК на *HEV* е подложена предварително на обратна транскрипция, амплификация и *nested-PCR*. Обратната транскрипция се извършва с използване на *HEV* специфичен обратен праймер (Табл. 5) с помощта на smART First Strand cDNA Synthesis кит за RT-PCR при спазване на следния температурен режим (Табл. 4).

Реакцията се извършва в обем 20 µl с използване на следната реакционна смес: екстрахирана вирусна РНК (10 ng-5 µg), 5 µM *HEV* специфичен обратен праймер, 1 mM dNTPs, 1×cDNA буфер, 0,01M DTT, 1,25 U/µl RNase инхибитор, 20 U/µl обратна транскриптаза (smART), чиста от RNase вода.

Към 10 µl от така получената кДНК се добавя 40 µl реакционна смес, състояща се от: 1,25 U/µl Perpetual *Taq DNA* полимераза, 1 x реакционен буфер (съдържащ 1.5 mM MgCl₂), 0,2mM dNTPs, 1µM прав *HEV* специфичен праймер (Табл. 5), стерилна двойнодестилирана вода. Амплификацията протича при следния температурен режим:

Таблица 4. Температурни цикли на амплификация на кДНК

Брой цикли	Температура [°C]	Време [мин:сек]
35	95	00:30
	42*	00:30
	60	00:45

* нарастване на температурата с 0,4 °C на секунда

Таблица 5. *HEV* специфични праймери, използвани за синтез и размножаване на *cDNA*

Име	Секвенция (5' - 3')	Посока	Съответстваща позиция от генома на <i>HEV</i> ^a
<i>HEV</i> -orf2-fo-ch	AAYCARGGiTGGCGYTCiGTiGARAC	F	5885–5910
<i>HEV</i> -orf2-ro-ch	GARAAiGGRCGiGAiGGRGCiGG	R	6510–6488

a – референтен *HEV* щам (NC_001434) [International Journal of Food Microbiology 257 (2017) 225–231]; F (Forward) – прав праймер; R (Reverse) – обратен праймер
I=inosine; Y=C и T; R=A и G; W=A и T; S=C и G; M=A и C; K=G и T; N=A и C и G и T

2.2.4. Nested PCR

За постигане на висока специфичност се извършва втори *PCR* (*nested-PCR*) с използване на *Perpetual Taq DNA polimerase hot start* (EURx, Полша). Реакцията се осъществява в краен обем от 50 µl и съдържа: 1 µl продукт от първия *PCR*, 1× реакционен буфер, 0,2 mM dNTPs, 0,8µM прав специфичен праймер на *HEV*, 0,8µM обратен *HEV* специфичен праймер (Табл. 6), 1,25 U/µl *Perpetual Taq DNA* полимеразата, стерилна двойнодестилирана вода.

Таблица 6. *HEV* специфични праймери за *nested PCR*

Име	Секвенция (5' - 3')	Посока	Съответстваща позиция от генома на <i>HEV</i> ^a
<i>HEV</i> -orf2-fi-ch	GAGGAGGAAGCTACCTCYGGYYTiGTiAT GCTYTGYAT	F	5924–5961
<i>HEV</i> -orf2-ri-ch	GGAGAAGGAGTTGGTCGRTCYTGYTCRT GYTGRTT	R	6489–6455

I=inosine; Y=C и T; R=A и G; W=A и T; S=C и G; M=A и C; K=G и T; N=A и C и G и T

Таблица 7. Температурни режими за протичането на *nested-PCR*

Етап от амплификацията	Брой цикли	Температура [°C]	Време [мин:сек]
Денатурация	1	95	06:00
Амплификация	40	95	00:30
		60	00:20
		72	00:15

2.2.5. Детекция на амплифицираните продукти

Визуализацията на продукта от *nested-PCR* се осъществява посредством 2 % агарозна гел електрофореза. Приготвя се гел в състав: 2% агароза (Cleaver scientific,), 1×TBE буфер (Tris Borate EDTA, SERVA GmbH, Хайделберг) и 0,1% етидиев бромид (Carl Roth GmbH, Karsruhe). Пробите се накапват в обем от 12µl (10µl *nested-PCR* продукт или 3µl молекулен маркер, 1×буфер за натоварване на проба, стерилна двойнодестилирана вода). Електрофорезата протича в 1×TBE буфер (**Tris-Borate-EDTA**) при константно напрежение 100V за 60 минути. Отчитането на сигнала се извършва на UV фотодокументиращо устройство NuGenius XE (Syngene, Обединено Кралство). За подравняване се използва молекулен маркер GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo scientific, Литва) за приблизително количествено определяне на двойноверижни *DNA* в диапазон от 50 bp до 1000 bp (base pairs). *Nested-PCR* води до генериране на *HEV* специфичен продукт с приблизителна големина от 493 нуклеотидни бази.

2.3. Секвениране

2.3.1. Подготовка на пробите за секвениране

За секвениране на положителните проби по метода на Sanger се преминава през етапи на пречистване, размножаване и капилярна електрофореза.

пречистване на *HEV* специфичния фрагмент, получен след *nested-PCR*

Пречистването е базирано на парамагнитни частици и се извършва чрез използване Agencourt AMPure XP реактив (Beckman Coulter, САЩ). Протоколът на пречистване преминава през следните етапи:

1) 10µl от реакционната смес, получена след приключване на *nested-PCR*, се смесва със съответното количество AMPure XP реактив, което се определя по следното уравнение: (обем от Agencourt AMPure за реакция) = 1.8 x (реакционната смес получена след приключване на *nested-PCR*)

През този етап става свързване на *PCR* продукта с парамагнитните частици и с помощта на магнитно поле частиците избирателно се отделят от останалите компоненти на *PCR* реакционната смес (*PCR* контаминанти).

- 2) отстраняване на *PCR* контаминанти (остатъчни праймери, dNTP и неспецифични продукти) чрез трикратно промиване със 70% прясно приготвен етанол.
- 3) чрез добавяне на дейонизирана вода *nested-PCR* продукта се елуира от парамагнитните частици като крайният обем на получения елуат е 50 µl.

намножаване - секвениращ *PCR* на ДНК матрицата (*DNA Template Cycle Sequencing*)

Пречистеният *nested-PCR* ампликон се подлага на секвенираща реакция с помощта на Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start набор (*Beckman Coulter*, САЩ). Реакцията се осъществява в краен обем от 20µl и включва следните компоненти: DTCS реакционен микс, *HEV* специфичен праймер за секвениране (*Табл. 9*), пречистен *nested-PCR* ампликон, стерилна двойнодестилирана вода, и протича при следния температурен режим – *Табл. 8*.

Таблица 8. Температурни цикли на секвениращ *PCR* на ДНК матрица

Брой цикли	Температура [°C]	Време [мин:сек]
30	96	00:20
	50	00:20
	60	04:00
1	4	∞

∞ съхранение неопределено време до момента на вземане на пробата от апарата

Таблица 9. специфични праймери на *HEV* за секвениране

Име	Секвенция (5' - 3')	Посока	съответстваща позиция от генома на <i>HEV</i>
<i>HEV</i> -orf2-fs	GAGGAGGAAGCTACCTC	F	5924 - 5940
<i>HEV</i> -orf2-rs	GGAGAAGGAGTTGGTCG	R	6489-6473

пречистване на секвенирания продукт

Получените след секвенирането продукти са пречистени с помощта на *Agencourt CleanSEQ* (*Beckman Coulter*, САЩ) базирано на използване на магнитни частици. Протоколът на пречистване включва три основни етапа:

- 1) свързване на удължените секвенирани продукти към магнитните частици;
- 2) отмиване на несвързаните реакционни контаминанти (багрила, остатъчни праймери, dNTP, соли) с помощта на прясно приготвен 85% етанол;
- 3) елуиране на пречистените продукти с 40µl буфер за накапване на проби (SLS).

- секвенираща капилярна електрофореза

Пречистеният от секвениращата реакция едноверижен продукт се подлага на капилярна електрофореза чрез използване на 8-капилярен GeXP (*Beckman Coulter*) анализатор. Прилага се метода *LFR-b* за секвенционен анализ, който е подходящ за фрагменти с големина 600bp.

2.3.2. Подтипиране и филогенетичен анализ

Данните, получени при секвенирането по Sanger, са обработени и анализирани от два вида софтуер - BioEdit и MEGA софтуер версия 11 (MEGA11). Суровите данни, получени от секвенатора, представляват нуклеотидни последователности от сдвоен край във FASTA формат. Посредством BioEdit са филтрирани и премахнати нискокачествените нуклеотиди, като е извършена корекция на последователностите, използвайки комплементарната верига като шаблон за изграждане на окончателна консенсусна последователност. Накрая се генерира консенсусна нуклеотидна последователност. Консенсусната нуклеотидна последователност се сравнява с набора от референтни последователности на *HEV* получени от *GenBank* /база данни за генетични последователности на Националния център за биотехнологична информация (NCBI). Общо 34 последователности са изтеглени от *GenBank*: 24 референтни последователности на *HEV*; 8 последователности от български пациенти с остър вирусен хепатит Е и 2 - на свине от български кланици. Характеристики на секвенциите са отразени на таблица 10.

Таблица 10. Секвенции (референтни и български *HEV*), за построяване на филогенетично дърво

№ за достъп в NCBI	Принадлежност на секвенцията	Големина на фрагмент (bp)	Генотип	Подтип	Литература
AB248521	референтна	7241	3	e	<i>Inoue</i> , 2006
AB369687	референтна	7217	3	f	<i>Li</i> , 2005
AF455784	референтна	7239	3	g	<i>Lu</i> , 2006
FJ906895	референтна	7318	3	ra	<i>Zhao</i> , 2009
L08816	референтна	7176	1	b	<i>Tam</i> , 1991
FJ457024	референтна	7217	1		<i>Varma</i> , 2011
MH809516	референтна	7214	2	b	<i>Wang</i> , 2017
KX387865	референтна	7223	8	a	<i>Woo</i> , 2016
KJ496143	референтна	7224	7	a	<i>Woo</i> , 2014
AB197673	референтна	7257	4	a	<i>Takahashi</i> , 2014
AB856243	референтна	7263	6		<i>Takahashi</i> , 2014
AB573435	референтна	7267	5	a	<i>Takahashi</i> , 2010
AP003430	референтна	7230	3	b	<i>Takahashi</i> , 2001
AF082843	референтна	7207	3	a	<i>Meng</i> , 1997
AY115488	референтна	7255	3	j	<i>Pei</i> , 2002
AB369689	референтна	7215	3	k	<i>Yano</i> , 2007
MF959765	референтна	7229	3	-	<i>De Sabato</i> , 2018
LC260517	референтна	7242	3	-	<i>Primadharsini</i> , 2017
KP294371	референтна	7267	3	-	<i>Jenckel</i> , 2021
FJ998008	референтна	7206	3	i	<i>Adlhoch</i> , 2009
FJ705359	референтна	7237	3	c	<i>Schielke</i> , 2009
JQ013794	референтна	7182	3	h	<i>Izopet</i> , 2012
JQ953664	референтна	7238	3	l	<i>Bouquet</i> , 2012
KU513561	референтна	7083	3	m	<i>Muñoz -Chimeno</i> , 2016
*MH203185	ПОВХ	355	3	e	<i>Bruni</i> , 2018
*MH203169	ПОВХ	355	3	e	<i>Bruni</i> , 2018

*MH203164	ПОВХ	355	3	e	<i>Bruni, 2018</i>
*MH203227	ПОВХ	345	3	e	<i>Bruni, 2018</i>
*MH203186	ПОВХ	297	3	e	<i>Bruni, 2018</i>
*MH203187	ПОВХ	355	3	e	<i>Bruni, 2018</i>
*MH203191	ПОВХ	355	3	e	<i>Bruni, 2018</i>
*MH203166	ПОВХ	334	3	f	<i>Bruni, 2018</i>
MZ555942	свине от български кланици.	636	3	c	<i>Palombieri, 2021</i>
MZ555941	свине от български кланици.	621	3	c	<i>Palombieri, 2021</i>

**последователности от български пациенти с остър хепатит Е.*

Консенсусните и референтните последователности са подравнени с ClustalW в програмата MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) версия 11. На тази база е генерирано филогенетично дърво (1000 повторения), представящо еволюционните връзки между таксоните.

За потвърждаване на генотипната/подтипна принадлежност на определените в настоящата работа *HEV* изолати се използва *Hepatitis E Virus Genotyping Tool Version 1.0* онлайн генотипиращ инструмент (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/hev/>). Таксономичното определяне се извършва чрез сравнителен анализ с последно публикувания консенсус относно референтни щамове на *HEV* (*J Gen Virol.* 2020).

2.4. Статистическа обработка на резултатите

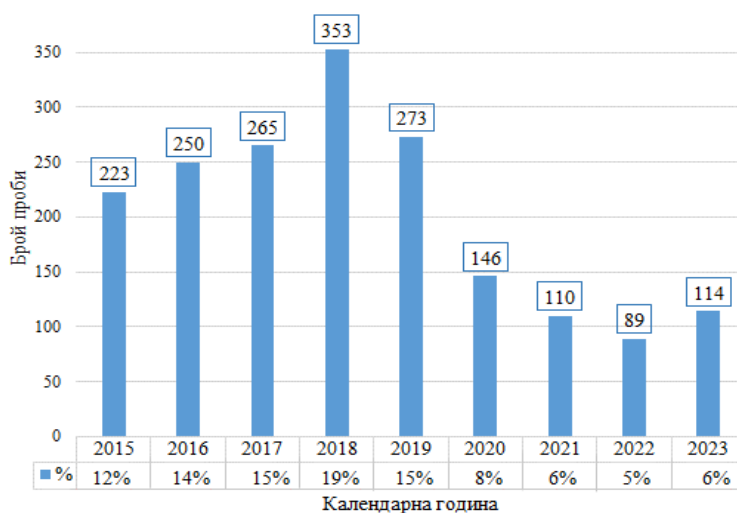
Данните са обработени със софтуер Microsoft Office Excel 2010. Извършен е дескриптивен статистически анализ за определяне на средна възраст и функцията за дескриптивна статистика (25-ти и 75-ти персентил). Честотните разпределения (пол, серопревалентност) са изчислени чрез процентни съотношения. За определяне на статистическата значимост (*p-value*) е използван онлайн калкулаторът Epitools Epidemiological Calculators (*Ausvet*). *Epitools Epidemiological Calculators. Ausvet. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>*

III. РЕЗУЛТАТИ

1. Откриване на серологични маркери на инфекция с *HEV* в серумни проби от различни популации.

1.1. Проспективна група

Проспективната група включва 1823 серумни проби. Най-голям брой проспективни проби са постъпили през 2018 г. (353), а най-малък – през 2022 г. (89). В периода 2015 - 2017 г. се наблюдава относително стабилен процент на заявени проби, а през 2018 г. следва пик на броя постъпили проби (353) (Фиг. 1).



Фигура 1. Разпределение на изследваните проспективни проби по години.

Половината (50%) от пациентите са на възраст 38 - 63 години, а средната възраст на лицата в проспективната група е 53 години.

Сред изследваните преобладават лицата от мъжки пол, като съотношението мъже:жени е 1,6:1 [1127 (62%) мъже/696 (38%) жени].

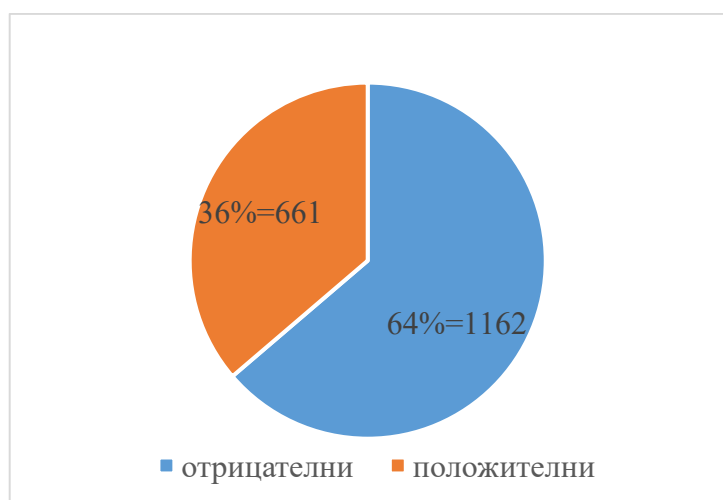
Разликата между двата пола е най-изразена при лицата с остър хепатит Е – 2:1 [118 (67%) мъже / 59 (33%) жени], като разликата е статистически значима ($p < 0,001$). Разпределението на пациентите по пол, възраст и нозология е представено на таблица 11.

Таблица 11. Разпределение на пациенти по пол, възраст и нозологична единица.

Диагноза/показатели	Пол	N (%)	Медиана (IQR) в години
ОВХ Е (n= 177)	м	119 (67%)	53 (41-65)
	ж	58 (33%)	
НОВХ (n= 1006)	м	620 (62%)	48 (36-63)
	ж	386 (38%)	
Друго ЧЗ (n=68)	м	44 (65%)	50 (37-63)
	ж	24 (35%)	
↑AST, ↑ALT (n= 43)	м	26 (60%)	49 (36-62)
	ж	17 (40%)	
извънчернодробни заболявания (n=199*)	м	118 (59%)	44 (31-58)
	ж	81 (41%)	
без диагноза (n= 330)	м	200 (61%)	53 (44-64)
	ж	130 (39%)	
Общо (n=1823)	м	1127 (62%)	53 (38-64)
	ж	696 (38%)	

* бъбречно заболяване; онкологично заболяване; неврологично заболяване, лица с диария, колит, вирусни инфекции, и др.

В 36% (661 от 1823) от серумите са установени anti *HEV* антитела – фиг. 2

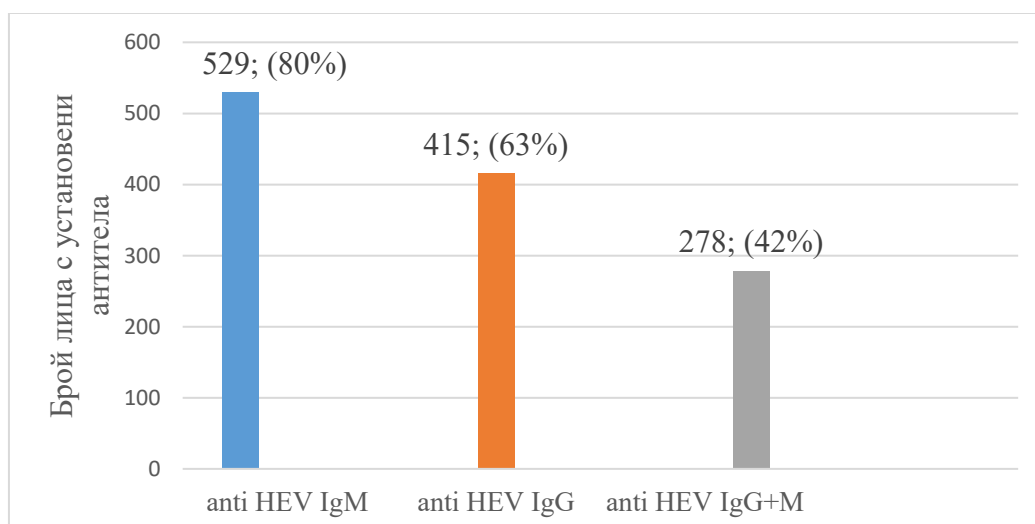


Фигура 2. Относителен дял на лицата с установен *anti-HEV*

РНК на *HEV* е доказана при 1,7% (32 от 1823) от изследваните серуми (Фиг. 3)



Фигура 3. Относителен дял на лицата с установена РНК на *HEV*.



Фигура 4. Разпределение на серопозитивните лица според вида на установените антитела

В изследваната група са установяват специфични антитела и от двата класа (*anti HEV IgM, G*) – едновременно или самостоятелно – *anti HEV IgM* (+) са 80% от серопозитивните, *anti HEV IgG* – 63%, а антитела и от двата класа се откриват при 42% от изследваните лица.

Таблица 12. Разпределение на серопозитивните лица според нозология.

Диагноза/показатели	<i>Anti HEV</i>		РНК (+)
	Резултат	N (%)	
Остър хепатит Е (n= 177)	(+) пол. (-) отр.	118 (67%) 59 (33%)	28 (15%)
Неуточнен хепатит (n= 1006)	(+) пол. (-) отр.	343 (34%) 663 (65%)	
Друго ЧЗ (n=68)	(+) пол. (-) отр.	17 (25%) 51 (75%)	1 (1,4%)
↑AST, ↑ALT (n= 43)	(+) пол. (-) отр.	12 (27%) 31 (72%)	
извънчернодробни заболявания (n=199*)	(+) пол. (-) отр.	52 (26%) 147 (71%)	2 (1%)
без диагноза (n= 330)	(+) пол. (-) отр.	119 (36%) 211 (63%)	1 (0,3%)
Общо (n=1823)	(+) пол. (-) отр.	661 (36%) 1162 (64%)	32 (1,7%)

1.2. Ретроспективна група

Ретроспективната група включва 644 серумни проби.

- Ретроспективните проби постъпват регулярно през годините в изпълнение на задачите на посочения по-горе проект, финансиран от ФНИ.

Половината от изследваните лица (50%) са във възрастта 33-59 години, а средната възраст е 45 г.

Таблица 13. Разпределение на пациентите по пол, възраст и нозологична единица.

Диагноза/Резултат	Пол	N (%)	Медиана (IQR) в години
HIV(+) (n=219)	м ж	184 (84%) 35 (16%)	35 (29-41)
Лица на хронииодиализа (n=218)	м ж	124 (57%) 94 (43%)	61 (52-71)
Лица с чернодробна цироза (n=22)	м ж	17 (77%) 5 (23%)	56 (50-66)
Лица с хематологични заболявания (n=16) - деца	м ж	6 (37%) 10 (63%)	7 (1-13)
Кръвни донори (n=94)	м ж	77 (82%) 17 (18%)	37 (30-44)
Ветеринарни лекари (n=75)	м ж	63 (84%) 12 (16%)	49 (43-57)
Общо (n=644)	м ж	471 (73%) 173 (27%)	45 (33-59)

И сред лицата в ретроспективната група преобладават мъжете, съотношение мъже:жени - 2,7:1 като тази разлика е най-изразена при някои групи/ветеринарни лекари, кръвни донори и лица с цироза.

Седемнадесет процента (17%) (110/664) от изследваните проби са *anti HEV* (+) положителни.

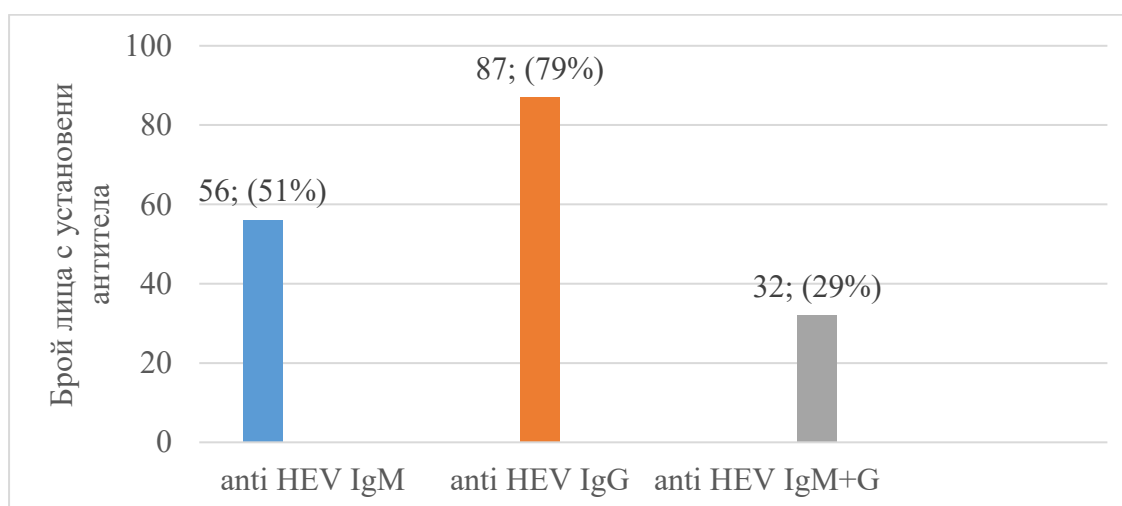


Фигура 5. Относителен дял на лицата с установен *anti-HEV*

Таблица 14. Разпределение на серопозитивните лица според нозология.

Диагноза/ показатели	<i>Anti HEV</i>		PHK (+)
	<i>Резултат</i>	<i>N (%)</i>	
HIV (+) положителни (n=219)	(+) <i>пол.</i> (-) отр.	30 (14%) 189 (86%)	
Лица на хронидиализа (n=218)	(+) <i>пол.</i> (-) отр.	23 (11%) 195(89%)	
Лица с чернодробна цироза (n=22)	(+) <i>пол.</i> (-) отр.	7 (32%) 15 (68%)	1 (4,5%)
Лица с хематологични заболявания (n=16) - деца	(+) <i>пол.</i> (-) отр.	11 (69%) 5 (31%)	
Кръвни донори (n=94)	(+) <i>пол.</i> (-) отр.	29 (31%) 65 (69%)	
Ветеринарни лекари (n=75)	(+) <i>пол.</i> (-) отр.	10 (13%) 65 (87%)	
Общо (n=644)	(+) <i>пол.</i> (-) отр.	110 (17%) 534 (83%)	1 (0,2%)

На фигура 6 е представено разпределението на серопозитивните лица от ретроспективната група според вида на установените антитела



Фигура 6. Разпределение на серопозитивните лица според вида на установените антитела

И в тази група сред изследваните лица се установяват специфични антитела и от двата класа (*anti HEV IgM, G*) – едновременно или самостоятелно - лицата с *anti HEV IgM* са 51% от серопозитивните, тези с установени *anti HEV IgG* са 79%, а едновременно антитела от двата класа са установени при 29%.

2. Значението на пола, възрастта за разпространение на HEV инфекция.

2.1. Разпространение на инфекцията с HEV в различни възрастови групи

Изследваните лица са разпределени в 7 възрастови групи – по десетилетия - <20 г., 20-29 г., 30-39 г., 40-49 г., 50-59 г., 60-69 г., >70 г.

2.1.1. Проспективна група

От проспективната група общо 36% (661/1823) са положителни за *anti HEV* (+). Възрастта на пациентите е посочена в 82% (1501/1823) от съпроводителните писма.

Anti HEV IgM (29%): От 529 лица, с установени *anti HEV IgM*, възрастта е посочена в съпроводителния фиш на 445 от тях.

Най-нисък е относителният дял на *anti HEV IgM* във възрастовата група < 20 г. и нараства в следващите декади като достига 35% във възрастта 50-59 и 60-69 години. години табл. 15.

Таблица 15. Разпределение на *anti HEV IgM* (+) лица по възраст

Възрастова група	<i>anti HEV IgM</i> (+)	
	N	%
<20 г. (n=122)	13	11%
20-29 г. (n=93)	20	22%
30-39 г. (n=208)	62	30%
40-49 г. (n=242)	61	25%
50-59 г. (n=323)	115	35%
60-69 г. (n=309)	107	35%
>70 г. (n=204)	67	32%

Относителният дял на anti *HEV* (+) Ig M положителни лица за всяко десетилетие нараства приблизително 0,035%, коефициент на детерминация $R^2=0,7341$ – фиг. 7. Установената разлика в различните възрастови групи е статистически значима $p<0,0001$.

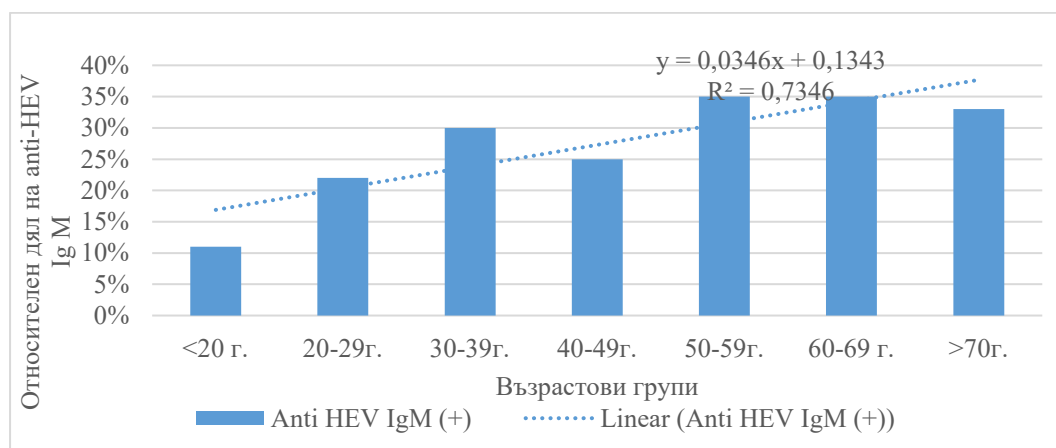
Anti *HEV* IgG (22 %): От 415 лица с установени anti *HEV* IgG възрастта е посочена в съпроводителния фиш на 340 от тях.

Най-нисък е относителният дял на anti-*HEV* IgG във възрастовата група <20г.(5%), като в следващите възрастови групи се отчита повишаване, достигащо най-висок дял при лицата над 70 години– таблица 16. Относителният дял на anti *HEV* (+) Ig G положителни лица за всяко десетилетие нараства приблизително 0,041%, коефициент на детерминация $R^2=0,882$ – фиг. 7.

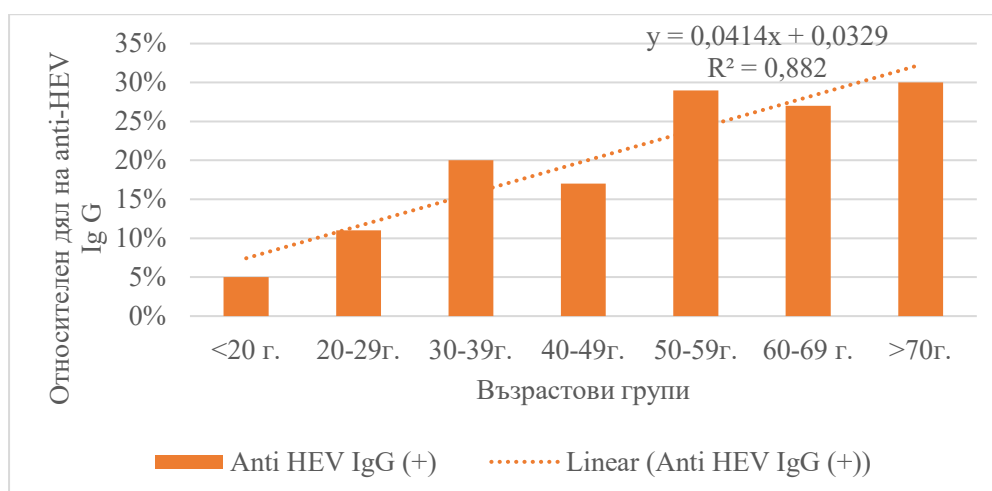
Таблица 16. Разпределение на anti *HEV* IgG (+) лица по възраст

Възрастова група	anti <i>HEV</i> IgG (+)	
	N	%
<20 г. (n=122)	6	5%
20-29 г. (n=93)	10	11%
30-39 г. (n=208)	42	20%
40-49 г. (n=242)	42	17%
50-59 г. (n=323)	95	29%
60-69 г. (n=309)	84	27%
>70 г. (n=204)	61	30%

А



Б



Фигура 7. Разпределение на *anti HEV Ig M (A)* и *IgG (Б)* положителните лица в различните възрастови групи

2.1.2. Ретроспективна група

От проспективната група общо 17% (110/644) са положителни за anti HEV (+).

Anti-HEV IgM:

Най-висок относителен дял на *anti HEV IgM* се установява във възрастовата група <20 години (38%). С напредване на възрастта процентът значително намалява, като за възрастовата група 20 – 29 години той е 12%, а в другите възрасти не надвишава 7%, съответно линията на тенденцията отчита намаляване на процента положителни за *anti-HEV IgM* (+) проби с нарастване на възрастта, като всяко увеличение на възрастта с едно десетилетие води до намаляване на положителните случаи. 0,04% при коефициент на детерминация $R^2=0,514$ (Фигура 8).

Таблица 17. Разпределение на anti HEV IgM (+) положителни лица в ретроспективната група по възраст

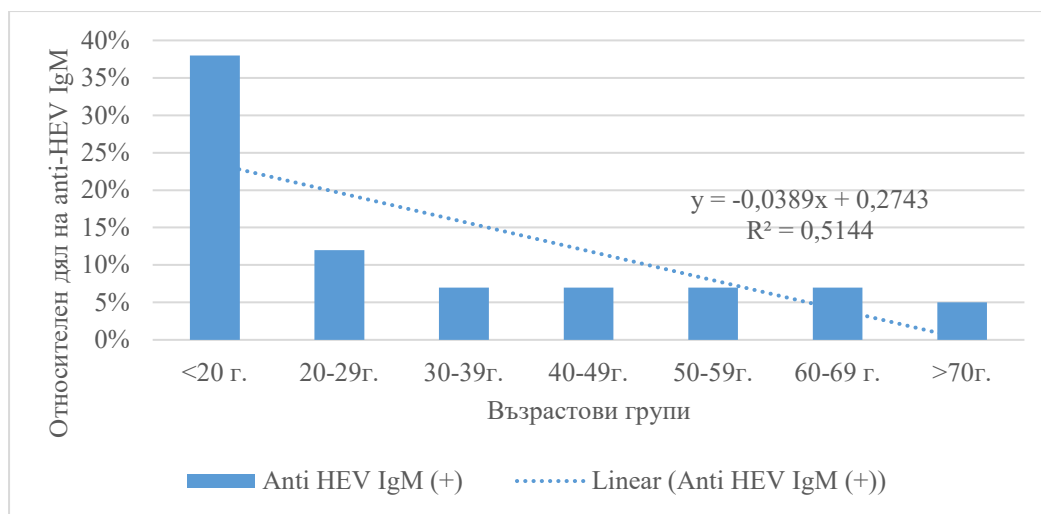
Десетилетие	anti <i>HEV</i> IgM (+)	
	N	%
<20 г. (n=26)	10	38%
20-29 г. (n=78)	9	12%
30-39 г. (n=162)	11	7%
40-49 г. (n=119)	8	7%
50-59 г. (n=99)	7	7%
60-69 г. (n=85)	6	7%
>70 г. (n=75)	4	5%

Anti-HEV IgG: Най-висок процент *anti-HEV IgG* (+) положителни проби са установени във възрастовата група <20 години (Фигура 8). Отчита се намаляване на положителните проби за следващите две десетилетия като липсва ясно изразена линейна зависимост спрямо възрастта.

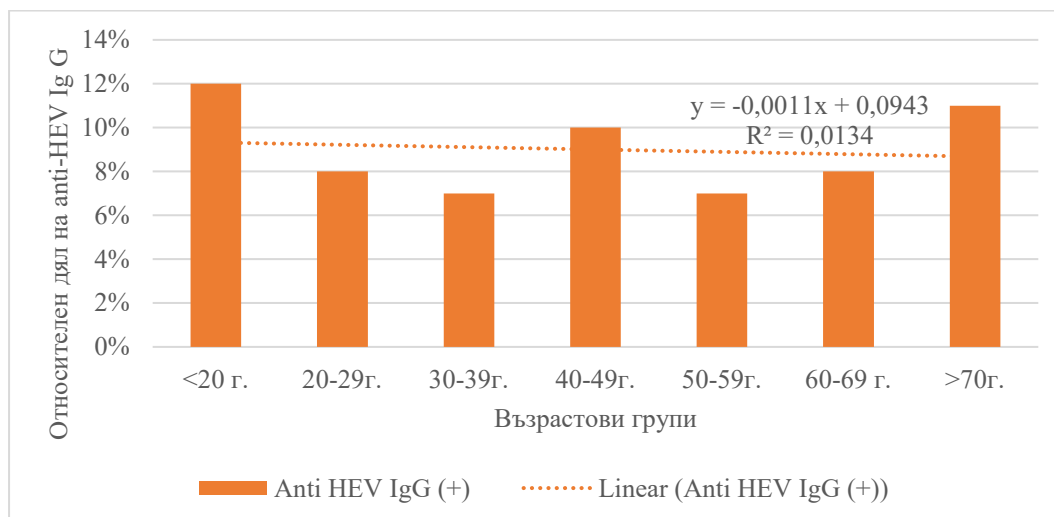
Таблица 18. Разпределение на *anti HEV IgG*(+) положителни лица в ретроспективната група по възраст

Десетилетие	anti <i>HEV</i> IgG (+)	
	N	%
<20 г. (n=26)	3	12%
20-29 г. (n=78)	6	8%
30-39 г. (n=162)	12	7%
40-49 г. (n=119)	12	10%
50-59 г. (n=99)	7	7%
60-69 г. (n=85)	7	8%
>70 г. (n=75)	8	11%

A



Б

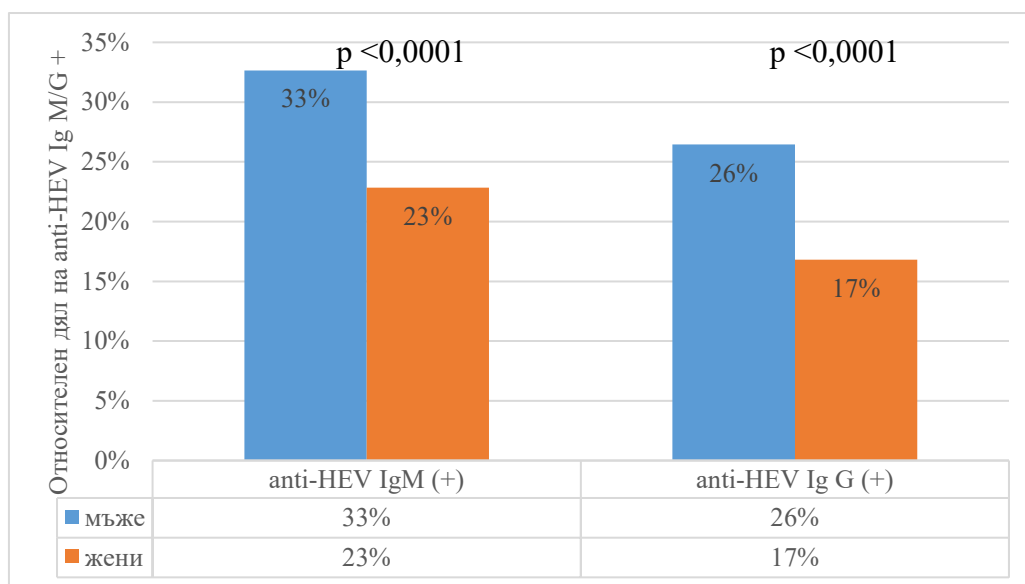


Фигура 8. Разпределение на *anti HEV Ig M* (А) и *IgG* (Б) положителните лица в различните възрастови групи

2.2. Разпределение на серопозитивните лица по пол.

2.2.1. Проспективна група

В проспективната група преобладават мъжете, съотношението мъже : жени е 1,6:1. Anti-HEV IgM се установяват по-често при мъжете (33%), отколкото при жените (23%). Сред anti HEV IgG (+) лица също преобладават мъже (26% мъже към 17% жени) – фиг. 9. Разликата между двата пола е статистически значима ($p < 0,0001$; $z = 4,6$)

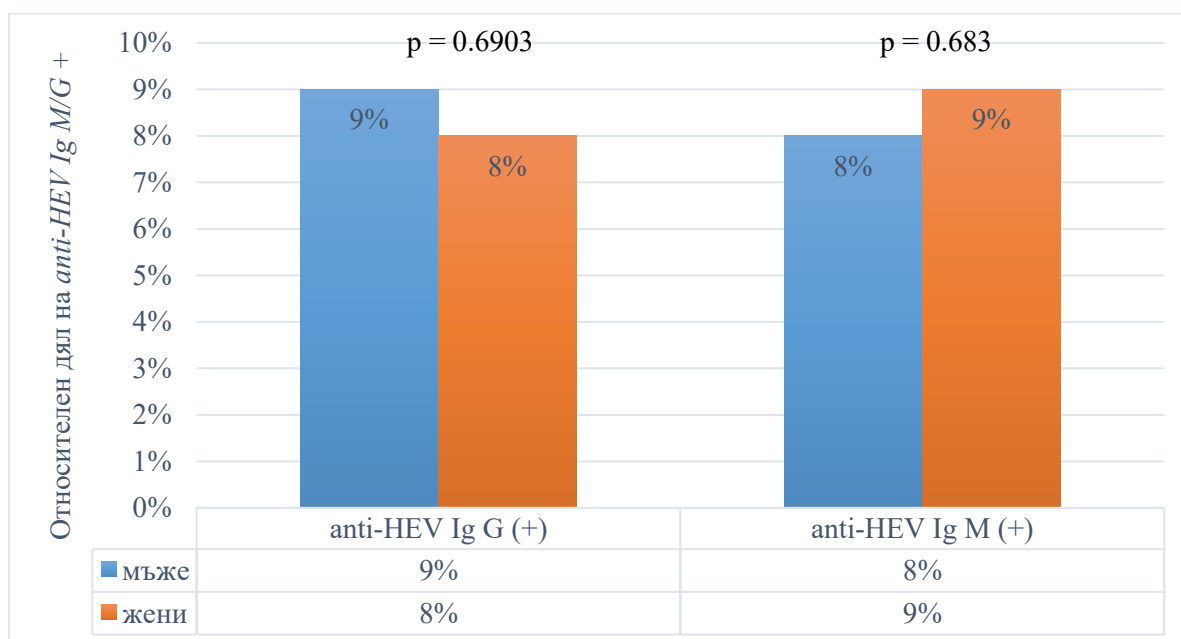


Фигура 9. Разпределение на anti HEV (+) лица от проспективната група по пол

2.2.2 Ретроспективна група

И в тази изследвана група преобладава мъжкият пол като съотношението мъже:жени е 2,7:1

При anti *HEV* IgG (+) лица преобладават мъжете (9% мъже към 8% жени), а при *HEV* IgM (+) - преобладават жените (9% срещу 8%) (Фигура 10) като разликата не е статистически значима, съответно $p=0,6903$ и $p=0,683$.

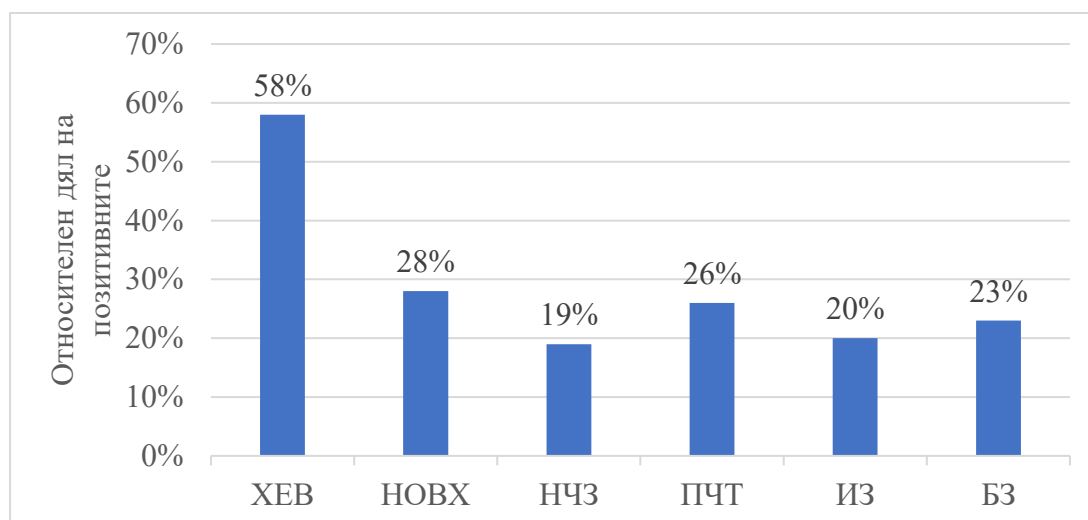


Фигура 10. Разпределение на anti-HEV (+) лица от ретроспективната група по пол.

2.3. .Разпределение на anti HEV Ig M (+) проби според нозологията и професията

2.3.1. Проспективна група

Най-голям относителен дял на anti HEV IgM положителните проби се установява при лицата с остър хепатит Е-58%, като разликата с останалите групи е значима $p \leq 0.0001$. При пациенти с НОВХ в 28% се установяват anti HEV IgM - фиг. 22 . Най-нисък процент положителни проби (19%) са установени при пациентите с друго чернодробно заболяване.

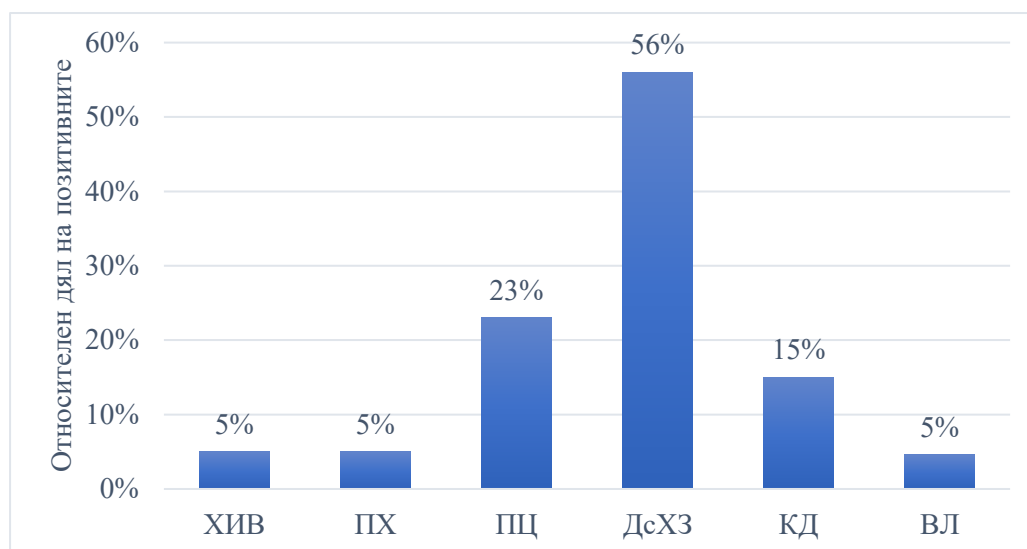


Фигура 11. Разпределение на anti-HEV IgM (+) лица според работна диагноза

Легенда: остър хепатит Е (ХЕВ); неуточнен хепатит (НОВХ); друго чернодробно заболяване (НЧЗ); Повишени стойности на чернодробните трансаминази (ПЧТ); Извънчернодробни заболявания (ИЗ); Без диагноза (БД).

2.3.2. Ретроспективна група

Най-голям е относителният дял на anti-HEV IgM (+) проби при деца с хематологични заболявания (56%), следвани от лицата с цирози и донорите на кръв. При останалите ретроспективни подгрупи – ХИВ, ПХ и ВЛ, е установен еднакъв процент положителни проби (5%).



Фигура 12. Разпределение на anti HEV IgM (+) лица според работната диагноза

Легенда: ХИВ-положителни лица (ХИВ); Пациенти на хемодиализа (ПХ); Пациенти с цироза (ПЦ); Деца с хематологични заболявания (ДсХЗ); Кръвни донори (КД); Ветеринарни лекари (ВЛ).

3. Доказване на вирусна РНК и определяне на вирусен товар

РНК на *HEV* е доказана в 32 (1,7%) от проспективните серумни проби.

Двадесет и осем 28, (88%; 28/32) от тях, са на пациенти с остра инфекция с *HEV*.

Концентрацията на РНК на *HEV* варира в граници от <1000 IU/ml до >100000 IU/ml. На табл. 19 е показано разпределението на положителните за РНК проби според стойността на вирусната концентрация

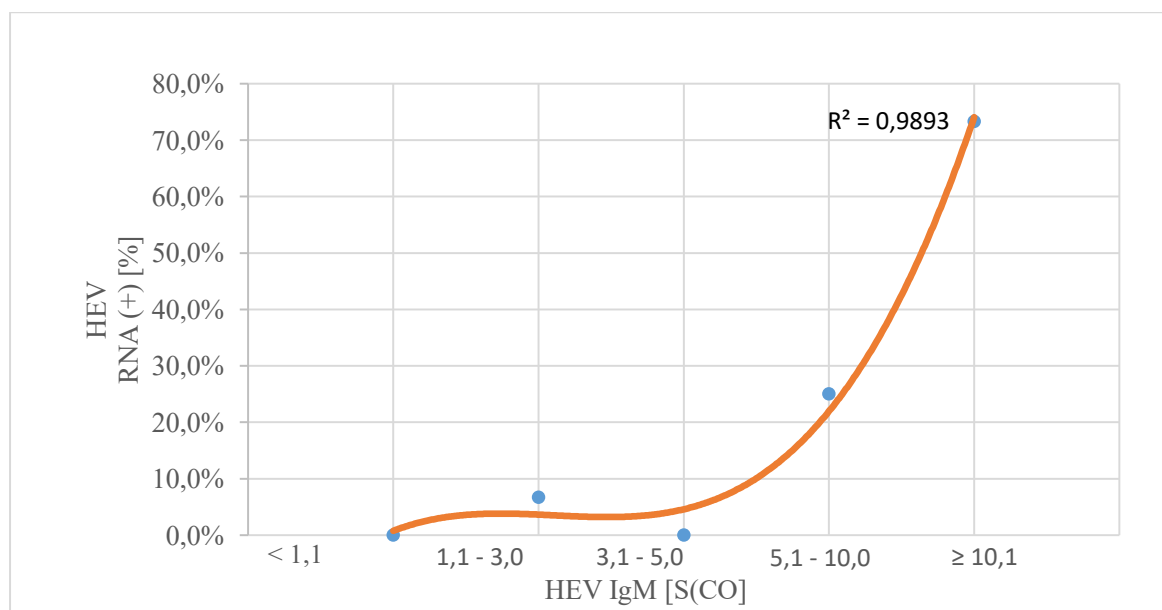
От положителните проби 50% (16/32) са с установен вирусен товар по-голям от 100 000 IU/ml. Най-малък процент от изследваните проби (13%; 4/32) са с определена концентрация по-малка от 1000 IU/ml.

Таблица 19. Разпределение на РНК (+) проби според стойността на вирусната концентрация [IU/ml]

<i>HEV</i> РНК [IU/ml]	N	[%]
< 1000	4	13%
1000- 10000	6	19%
10000 - 100000	6	19%
> 100000	16	50%

4. Корелация между серологични и молекулярни маркери

Установява се връзка между стойността на серологичния индекс за *HEV IgM* [S/CO] и честотата на доказване на РНК на *HEV* (Фигура 13). При стойност $\leq 5,0$ само в около 5% от изследваните проби се открива вирусна нуклеинова киселина, при стойности $>5,0$ броят на положителните проби нараства като при стойност ≥ 10 РНК се доказва в 70% от пробите.



Фигура 13. Графично представяне на корелацията между стойността на *anti-HEV IgM* и наличие на РНК на *HEV* в серума

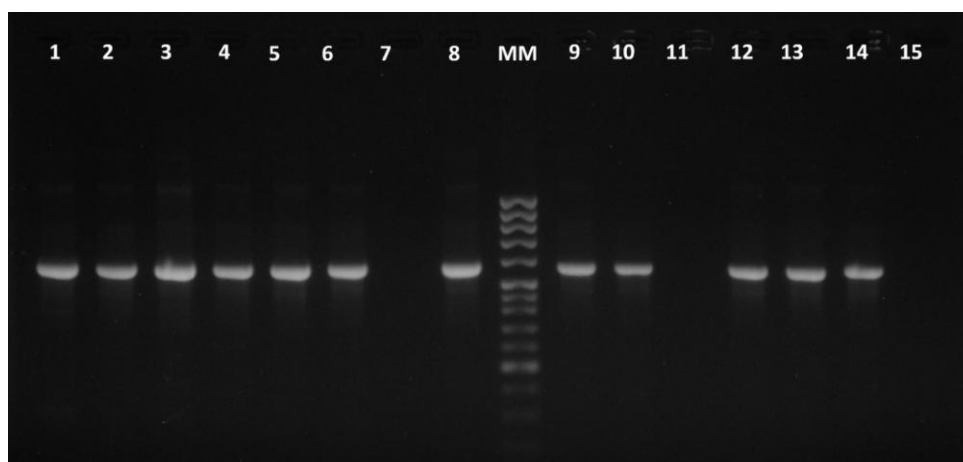
5. Молекулярно-генетична характеристика на изолати на *HEV*.

За молекулярно-генетично охарактеризиране РНК от *HEV* (+) проби е подложена на *nested PCR*, последван от секвенционна капилярна електрофореза и биоинформационен анализ на получени ген-специфични секвенции за определяне на генотипната и подтипната принадлежност на съответния изолат на *HEV*.

5.1. *Nested PCR* за получаване на ген-специфични ампликони

Подборът на изолати за генотипиране на *HEV* е извършен с помощта на *nested PCR* чрез използване на ген-специфичен праймер по регион от втората рамка на четене, кодиращ вирусния структурен белтък.

При 25/32 *HEV* РНК (+) положителни проби е получен положителен сигнал за наличие на ген-специфичен ампликон (Фигура 14).



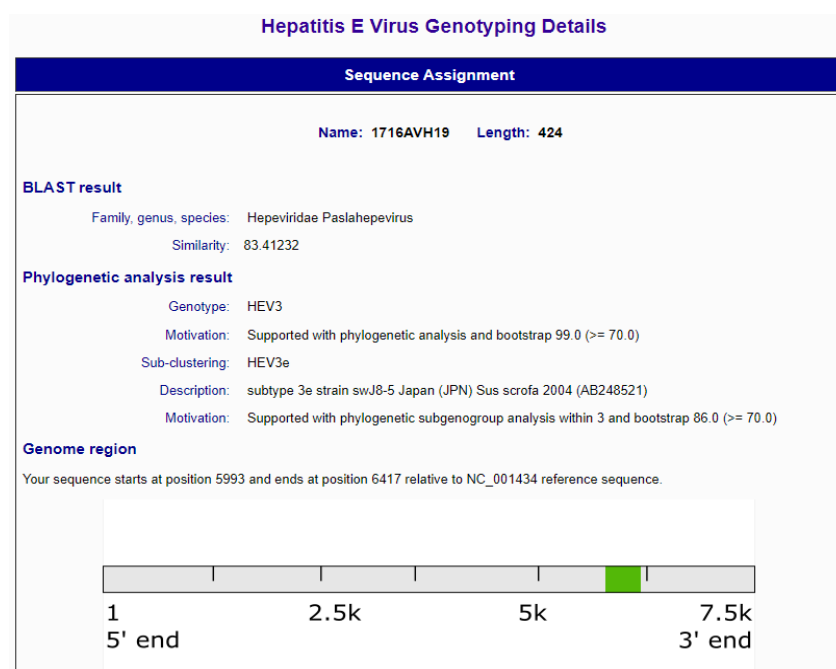
Фигура 14. Аналитична 2% агарозна гел-електрофореза след *nested-PCR* за доказване на специфичен ампликон с големина 565 нб.

Легенда: ММ=молекулярен маркер с наличие на две водещи удебелени ивици за фрагменти с големина 250 нб и 500 нб; от № 1 до № 15 = изследвани *HEV* изолати.

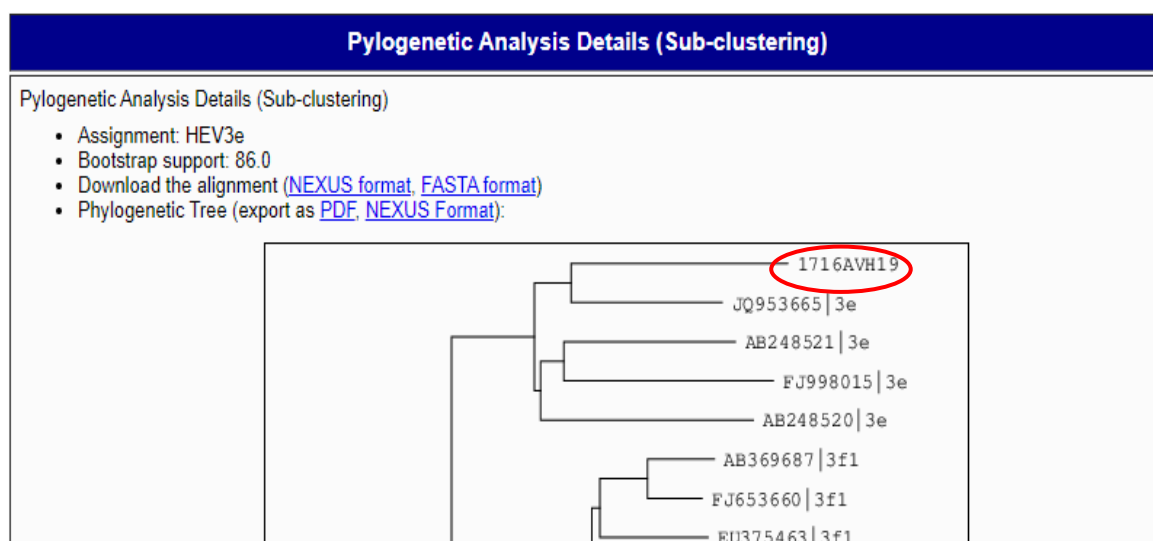
5.2. Генотипно определяне на изолатите на *HEV*

За определяне на генотипната, а в последствие и на подтипната принадлежност, получените секвенции са подложени на филогенетичен анализ посредством използване на онлайн генотипиращ инструмент (фигура 15). При първоначалното групиране се доказва, че всички изследвани секвенции се отнасят към генотип 3 на *HEV*. След провеждане на субгрупиране секвенциите са групирани в 5 подтипа - 48% (12/25) от изолатите са отнесени към подтип *HEV-3e*, 6 към *HEV-3f* (24%), 3 - са към *HEV-3c* (12%), 2 - към *HEV-3 m* (8%) и 1 – към *HEV-3a* (4%). Една от секвенциите не може да се подравни към никой подтип (Фигура 16).

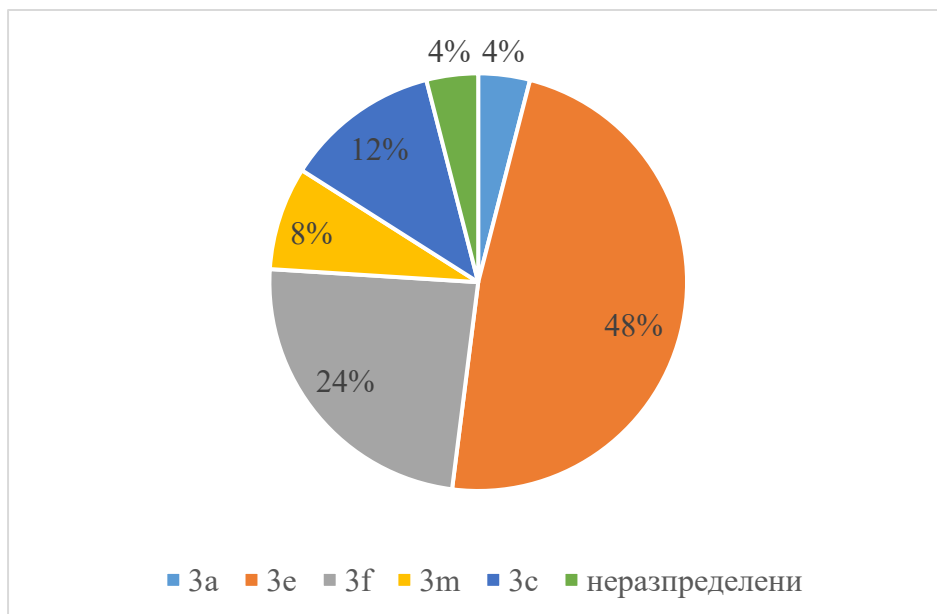
A



B



Фигура 15. Онлайн генотипиращи инструмент (*Hepatitis E Virus Genotyping Tool Version 1.0. Developed by: Harry Vennema, Annelies Kroneman*) използван при таксономично определяне на HEV изолати. **A)** детайли от подравняването на секвинцията; **B)** детайли от филогенетичния анализ за подтипирание (суб-кльстериране). В червено е ограден анализирания изолат на *HEV*.



Фигура 16. Генотипно разпределение на проучените изолати на HEV

5.3. Кладистичен анализ на получените секвенции на *HEV*

От генотипираните секвенции 12 са подложени на подробен кладистичен анализ. В Таблица 20 са показани основните характеристики на серумните проби, от които са получени вирусни секвенции. Десет серумни проби са от пациенти с лабораторно потвърден остър ВХЕ, а 2 - от пациенти с чернодробна цирроза. Резултатите от количествения *real-time PCR* показват променливи нива на виремията в пробите. Най-ниският открит вирусен товар (360 IU/ml) е в проба от пациент с остър ВХЕ. Най-висок вирусен товар е установен в проба на пациент с цирроза - 4 927 500 IU/ml. Регионът от вирусния геном на *HEV*, по който е проведен кладичния анализ е с големина 567 нб и обхваща нуклеотиди от 5924 до 6491 позиция.

Таблица 20. Разпределение на РНК положителните проби според генетични характеристики и потвърдена диагноза

<i>проба</i>	<i>Диагноза</i>	<i>РНК на HEV IU/ml</i>	<i>Генотип/подтип</i>	<i>Геномен участък</i>
224AVH21	BXE	367 375	HEV-3f	5923-6488
229AVH18	BXE	1 560	HEV-3f	5923-6486
327AVH18	BXE	2 783 750	HEV-3e	5960-6444
354AVH18	BXE	13 643	HEV-3e	5923 -6491
374AVH19	BXE	2 931 250	HEV-3e	5920 -6489
376AVH20	BXE	360	HEV-3	5923-6489
1716AVH19	BXE	8 826	HEV-3e	5958-6490
324CII9	цироза	4 927 500	HEV-3	5923-6487
100CII9	цироза	321 875	HEV-3e	5956-6487
2957AVH19	BXE	432 375	HEV-3e	5930-6492
780AVH20	BXE	2 872	HEV-3	5924-6491
696AVH20	BXE	6 756	HEV-3m	5921-6442

За построяване на филогенетично дърво първоначално е направен подбор на максимално правдоподобен модел за напасване на нуклеотидни замени чрез използване на MEGA11 софтуер (софтуер за молекулярно еволюционно генетичен анализ). Направен е еволюционен анализ по 68 параметра (включително дължините на разклоненията) като под внимание са взети: Байесов информационен критерий (BIC), коригиран информационен критерий на Akaike (AICc) и стойността на максималното правдоподобие (Фигура 17). Топологията на дърво е изчислена автоматично като са включени 1-ва+2-ра+3-та+ не кодиращи позиции на кодоните. Подбра се TN93+G+I модела, който се характеризира с най-нисък резултати по BIC и описва най-добре

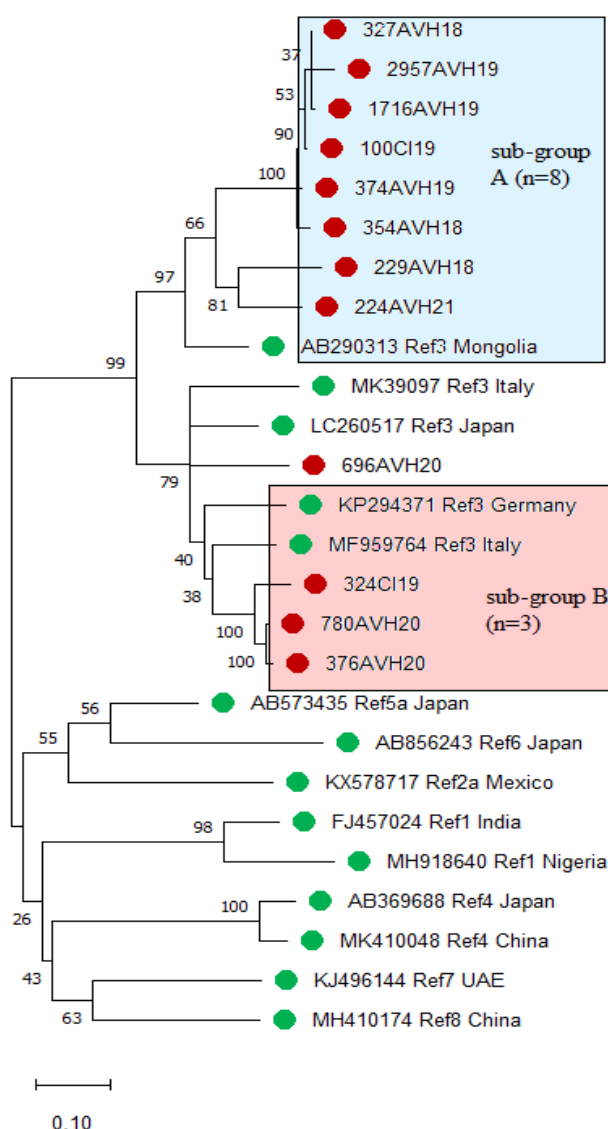
модела на заместване. При конструиране на филогенетичното дърво 12-те *HEV* секвенции са подравнени спрямо 14 референтни пълногеномни последователности за генотипове 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 на *HEV*, публикувани в генната банка на Националния център за биотехнологична информация на САЩ (NCBI Gen bank). Според получените резултати в България циркулира генотип 3 на *HEV*, имащ еволюционно родство както с европейски, така и с азиатски изолати (Фигура 18). Чрез използвания филогенетичен анализ, секвенираните последователности са подразделени в добре обособени подгрупи: А (n=8) и В (n=3). Последователностите от подгрупа А показват най-голямо генетично сходство и наличие на общ предшественик с референтна последователност за *HEV*-3 от Монголия (AB290313). Секвенциите от подгрупа В се групират с *HEV*-3 референтни последователности от Италия (MF959764) и Германия (KP294371), като най-близкият общ предшественик е италианският изолат. Последователността 696OBX20 образува отделен клон, позициониран най-близо до европейската (МК39097) и японската (LC260517) референтни последователности за генотип 3.

Results

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)
TN93+G+I	68	9259.545	8736.546	-4299.984	0.57	1.76	5.91	0.215	0.250	0.280	0.255
K2+G+I	64	9264.449	8772.183	-4321.836	0.58	1.78	6.12	0.250	0.250	0.250	0.250
GTR+G+I	71	9271.778	8725.732	-4291.551	0.56	1.73	6.06	0.215	0.250	0.280	0.255
K2+G	63	9279.484	8794.902	-4334.203	n/a	0.19	5.93	0.250	0.250	0.250	0.250
T92+G+I	65	9279.741	8779.792	-4324.632	0.58	1.84	6.03	0.233	0.233	0.267	0.267
TN93+G	67	9282.509	8767.193	-4316.316	n/a	0.21	5.70	0.215	0.250	0.280	0.255
HKY+G+I	67	9288.320	8773.004	-4319.222	0.58	1.65	8.08	0.215	0.250	0.280	0.255
HKY+G	66	9293.546	8785.913	-4326.684	n/a	0.19	5.68	0.215	0.250	0.280	0.255
GTR+G	70	9294.847	8756.483	-4307.936	n/a	0.21	5.86	0.215	0.250	0.280	0.255
T92+G	64	9295.312	8803.046	-4337.267	n/a	0.19	5.84	0.233	0.233	0.267	0.267
TN93+I	67	9319.740	8804.424	-4334.932	0.60	n/a	5.10	0.215	0.250	0.280	0.255
K2+I	63	9328.894	8844.312	-4358.908	0.60	n/a	5.40	0.250	0.250	0.250	0.250
GTR+I	70	9333.416	8795.052	-4327.220	0.60	n/a	5.26	0.215	0.250	0.280	0.255
HKY+I	66	9335.630	8827.997	-4347.726	0.60	n/a	5.25	0.215	0.250	0.280	0.255
T92+I	64	9341.179	8848.913	-4360.200	0.60	n/a	5.36	0.233	0.233	0.267	0.267
JC+G	62	10198.798	9721.900	-4798.710	n/a	0.19	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250
JC+G+I	63	10208.498	9723.916	-4798.710	0.00	0.19	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250
JC+I	62	10223.984	9747.086	-4811.303	0.61	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250
TN93	66	10292.684	9785.051	-4826.253	n/a	n/a	4.58	0.215	0.250	0.280	0.255
GTR	69	10304.669	9773.987	-4817.696	n/a	n/a	4.12	0.215	0.250	0.280	0.255
HKY	65	10387.112	9887.162	-4878.317	n/a	n/a	4.53	0.215	0.250	0.280	0.255
K2	62	10398.451	9921.553	-4898.536	n/a	n/a	4.53	0.250	0.250	0.250	0.250
T92	63	10402.802	9918.220	-4895.862	n/a	n/a	4.53	0.233	0.233	0.267	0.267
JC	61	11229.578	10760.364	-5318.949	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250

Фигура 17. Подбор на максимално правдоподобен модел за напасване на нуклеотидни замени в MEGA11



Фигура 18. Филогенетичен анализ и генотипно разпределение на изолати на *HEV*

Легенда: Референтните секвенции, получени от *GenBank*, са маркирани със зелени кръгове, а проучените Български секвенции - в червени. *AVH=OBX*

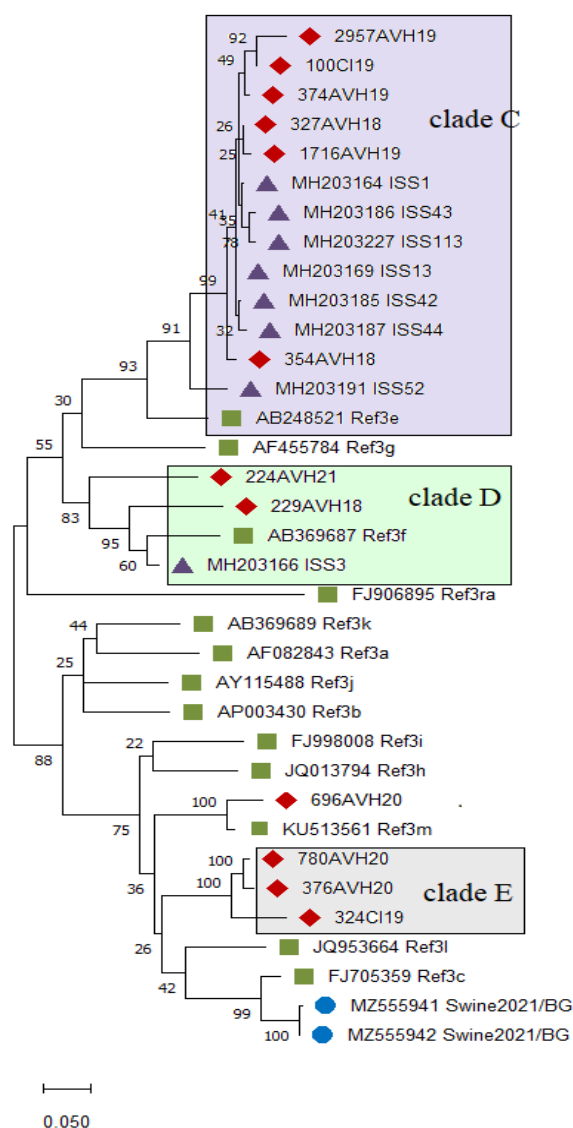
С цел детайлно субтипирание на идентифицираните изолати на *HEV* бе извършен допълнителен филогенетичен анализ чрез конструиране на второ филогенетично дърво. В анализа за сравнение, освен 12-те секвенции от настоящото проучване, са включени допълнително ретроспективни последователностите от български пациенти с ВХЕ и два изолата от кланични свине от България (MZ555941; MZ555942). При анализ се установяват три добре дефинирани групи (клъстера) – С, D и E, в които се групират

българските последователности. Повечето изолати (n=12) са отнесени към група С и произлизат от общ прародител с референтна секвенция на HEV подтип 3e (AB248521).

Вторият малък, но добре дефиниран клъстер (D, n=3), е съставен от три отделни клона на изолатите от България, образуващи отделна монофилетична подгрупа с референтна секвенция на HEV от подтип 3f (AB369687).

Третият клъстер (E, n=3) е статистически добре подкрепен и представлява група български последователности, които не могат да бъдат групирани с нито един HEV-3 подтип. Секвенираната последователност 696AVH20, която оформя отделен клон по време на генотипирането, след подтипирането споделя общ прародител с референтна последователност на подтип HEV-3m (KU513561). Тази връзка е статистически надеждна, с максимална бутстрап стойност от 100%. Двете секвенции на HEV, изолирани от български кланични свине, показват генетично сходство с референтна секвенция на подтип HEV-3c (FJ705359), но не се групират с нито една секвенция на човешки изолати на HEV. По този начин, използването на детайлен филогенетичен анализ позволява прецизното класифициране на изолати, които първоначално не са били причислени към конкретен подтип.

*Бутстрап (*Bootstrap*) стойност – Стандартен математически показател за сигурност при филогенетичните дървета. Стойността от 100% означава, че генетичната връзка между изследвания български щам и референтния подтип HEV-3m е абсолютно доказана.



Фигура 19. Филогенетичен анализ и подтипно разпределение на Български изолати на *HEV*.

Легенда: Референтните последователности са маркирани със зелени квадрати, изследваните от нас последователностите с червени ромбове, ретроспективните последователностите от български пациенти с *VXE* - с лилави триъгълници, а последователностите от български клинични свине със сини кръгове.

IV. ОБСЪЖДАНЕ

Вирусът на *HEV* и заболяванията, които причинява, се изучават едва от четири десетилетия. В това време се трупат данни за пътищата на предаване, за рисковите групи за заразяване и тежко протичане на инфекцията, разработват се програми за превенция и контрол, създадена е ваксина, усъвършенстват се и диагностичните тестове.

Преди три десетилетия се е считало, че хепатит Е е ендемичен за слабо развитите региони и по тази причина е пренебрегвано заболяване в Европа и развитите страни на други континенти. След изолирането на вируса и от свине интересът към инфекцията се повишава. В последните 20 години и в България има публикации, посветени на хепатит Е, има издадени и две монографии по темата (*Пишмишева-Пелева, 2022; Баймакова, 2024*). За периода 2021 - 2025 г. в България действа и Национална програма за превенция и контрол на вирусните хепатити като една от основните цели е намаляване на разпространението на вирусни хепатити (А, В, С, D, и Е).

1. Циркулация на *HEV*

В настоящия дисертационен труд са представени резултатите от проучванията за откриване на серологични и молекулярно-генетични маркери на инфекцията с *HEV* в 2467 проби – (1823 – проспективни и 644 – ретроспективни). През годините на посочения период на изследване (2015-2023 г.) в НРЛ „Хепатитни вируси“ са постъпвали различен брой проби като той е най-нисък по време на КОВИД-пандемията. Това се обяснява от една страна с наложените мерки за изолация, а от друга със страха от коронавирусна инфекция както сред населението, така и сред медицинските специалисти – прегледите са извършвани дистанционно. Често, независимо от симптомите на пациента, е поставяна диагноза *КОВИД 19*, а аниктерни и леки форми на вирусен хепатит са оставали най-вероятно недиагностицирани. По данни на Секция “Епидемиология, надзор и ранно оповестяване на инфекции „ (ЕНРОИ) към НЦЗПБ в България през 2019 г. са регистрирани 217 случая на инфекция с *HEV*, заболяемост - 3,10 на 100 000 (*Владимова, 2019*). През 2020 г. са докладвани 88 случая, заболяемост 1,27 на 100 000, а през 2021 едва –44, заболяемост 0,67 на 100 000 (*Владимова, 2020; Владимова, 2021*).

В литературата намаленият брой регистрирани случаи се обяснява не толкова с директно биологично потискане между вирусите, колкото с други фактори: въведените строги противоепидемични мерки и подобрената лична хигиена, които ограничават и фекално-оралния механизъм на предаване на инфекциозни причинители (*Qin Y., 2024*), особено в ендемичните страни. Наред с това, пандемията доведе до феномена на „скрита заболяемост“ поради дефицит на диагностичната активност за други инфекции извън COVID-19 (*Wingrove et al., 2021; ECDC*).

През 2019 г. се правят промени в Наредба 21 за реда, регистрацията и съобщаването на заразните болести, въз основа на които инфекцията с *HEV* става предмет на задължително докладване и регистрация. Нараства броят на лабораториите в страната, в които се извършват серологични изследвания за диагностика на *HEV* инфекция. Увеличеният брой сертифицирани лаборатории съответно води до намаляване на броя на изпратените в НРЛ „Хепатитни вируси“ проби за лабораторна диагностика на инфекции с *HEV*.

2. Значение на пол, възраст, професия и рискови фактори за разпространение на инфекция с *HEV*.

В настоящия дисертационен труд е анализирано влиянието на различни фактори - възраст, пол, придружаващи заболявания и др., върху разпространението на инфекцията с *HEV* в проспективна и ретроспективна група пациенти.

В проспективната група са включени пациенти с различни заболявания – чернодробни и извънчернодробни.

В групата с чернодробна дисфункция са включени лица с широка гама от заболявания като най-много са тези с неуточнен хепатит. Това са пациенти, при които е отхвърлено заболяване, причинено от някой от останалите познати хепатотропни вируси. В последното десетилетие има налични тестове за диагностика на хепатит Е, достатъчно на брой лаборатории, самите изследвания не изискват голям финансов ресурс и е препоръчително да бъдат извършвани при всеки пациент с хепатит и отрицателни маркери за останалите хепатити. Счита се, че пациенти от рисковите групи трябва да бъдат изследвани и за маркери за инфекция с *HEV* дори при потвърден хепатит, причинен от друг вирус. (*Kotsev S, 2023; Коцев См, 2022*) – поради немалка вероятност за коинфекция.

Пациентите с неуточнено чернодробно заболяване (НЧЗ) са тези, при които по повод оплаквания или профилактично са установени повишени стойности на цитолитичните и/или на холестазните ензими или при преглед са установени иктер и/или хепато или хепатоспленомегалия. Това е разнородна по отношение на нозологията група и изследване за хепатит Е може да не се извърши поради леки и неопределени оплаквания, липса на жълтеница, лекостепенно повишаване на стойностите на ензимите. При проучване в Обединеното кралство 15% от лицата, диагностицирани като медикаментозен хепатит, фактически са били с остър хепатит Е (*Dalton et al.* 2007). В подгрупата НЧЗ има серопозитивни (19%) като се откриват антитела от един или и от двата класа имуноглобулини.

Най-голям е относителният дял на серопозитивните лица в подгрупата с остър хепатит Е - 58%. Същевременно делът на лицата с доказана виремия (установена РНК на *HEV*) в същата група е едва 1,7%, което е свързано както с краткотрайната виремия, така и с периода на вземане на проба за изследване. Сравнението с обобщените данни на РЗИ и НЦЗПБ за изследвания период показва, че официално регистрираната заболяемост е по-ниска от реалното разпространение, установено в нашето проучване. Това потвърждава хипотезата, че значителна част от случаите на *HEV* в различните региони на България остават недиагностицирани или се регистрират като „хепатит с неуточнена етиология“ или друго чернодробно заболяване, което не подлежи на регистрация.

В последните години е установена връзка между *HEV* и някои извънчернодробни заболявания и броят на публикациите в тази насока нараства (*Wu J*, 2021; *Kanda T*, 2025; *Fousekis FS*, 2020; *Баймакова*, 2024). Екстрахепаталните прояви може да бъдат единствена проява на инфекцията и е препоръчително изследване, особено на лица от рисковите групи (*EASL*, 2018). Към момента връзката с вируса на *HEV* е потвърдена при тромбоцитопения, остър панкреатит, синдром на Гилен-Баре (*GBS*) и за такава съобщават редица автори (*Pishmisheva*, 2024; *Lhomme*, 2020). При един от изследваните пациенти с *GBS* заболяването е потвърдено както серологично, така и с установяване на РНК на *HEV*.

Според резултатите от нашите изследвания при 20% от пациентите с други болести са установени серологични данни за инфекция с *HEV*. Това е разнородна група, в която са включени лица с диария, повишена температура, инфекциозна мононуклеоза,

панкреатит, неврологични заболявания, тромбоцитопения и др. Получените наши резултати трябва внимателно да се интерпретират – при тези пациенти заболяванията не са свързани с инфекция с *HEV*, но високият относителен дял на серопозитивните потвърждава широкото разпространение на тази инфекция.

Изследвани са и пациенти без посочена диагноза в съпроводителното писмо. При тях е извършено изследване макар и да не са посочени съображенията за искането на такова – в тази група серопозитивните са 36%, но те не могат да бъдат обсъждани без информация за пациентите. Въпреки това този висок относителен дял на серопозитивност показва широко разпространение на инфекцията с *HEV*.

Един от пътищата на трансмисия на вируса е свързан с преливането на биопродукти и в ретроспективната група лица са включени и кръвни донори. Целта е да се установи разпространението на инфекцията с *HEV* в тази подгрупа и да се прецени рискът от заразяване на реципиентите. В България до момента има извършени две такива проучвания в различни региони на страната. (*Baymakova, 2021, Коцев, 2023*). Авторите установяват съответно 25,9% и 40% положителни лица сред кръводарителите. Според резултатите от настоящото изследване те са 31%. Към момента в България донорската кръв не се изследва за маркери на *HEV* инфекция и в периода на вiremия реципиентът може да бъде заразен. Обикновено реципиентите на кръв са лица с едно или повече заболявания (онкологични, пациенти на хроничен диализа, с цироза, такива след остро настъпила кръвозагуба, травми) и заразяването с *HEV* би утежило състоянието им, а изходът е несигурен. Считаме за необходимо донорската кръв с установени в нея антитела, да бъде изследвана и за РНК на *HEV*. В проучването на *Коцев, 2023 anti HEV (+)* положителни проби са изследвани и в никоя от тях не е установена вирусна нуклеинова киселина.

В ретроспективната група са включени и ветеринарни лекари като рискови за заразяване с *HEV*. 13% от тях са серопозитивни за *anti HEV IgM*. Изследванията в тази насока трябва да продължат и да се разширят като се включат и лица, работещи в кланици, лица, заети в грижи за животните, както и лица, които работят в стопанства, в които се отглеждат различни видове животни – смесени стопанства. Препоръчително е броят на изследваните лица да е по-голям и изследването да обхваща и *anti HEV-IgG*, както и търсене на РНК на *HEV* при серопозитивните лица. При нашето изследване РНК на *HEV* не е открита в нито една от положителните проби на ветеринарните лекари. При извършено изследване на ветеринарни лекари в Корея е установено, че 28,2% от тях са

серопозитивни (Lyoo, 2019). Според резултатите от същото проучване 5% от домашните кучета също са серопозитивни. Въпреки че ролята на кучетата като директен източник на инфекция за хората не е доказан и все още се обсъжда, някои автори докладват случаи на пълна генетична идентичност между вирусни изолати от домашни кучета и техните стопани. Това превръща теоретичната възможност за пренос в доказан епидемиологичен риск, макар и с ниска честота, и проучванията в тази насока трябва да продължат. (Okamoto, 2004; Zeng, 2017).

В България са извършени няколко изследвания на домашни и кланични животни и е установено високо разпространение на *HEV* сред тях: сред домашните свине- 60,05%, а сред кланични свине - 40,0 % (Baymakova, 2021; Takova, 2020; Pishmisheva, 2018).

В литературата има различни данни за разпространението на инфекцията с *HEV* сред лица на диализно лечение - според резултатите от някои проучвания относителният дял на серопозитивните лица не се отличава от този в общата популация (Tavakoli A, 2021), а според други – *anti HEV* се установяват по-често при тези пациенти. В България има три проучвания за разпространението на *anti HEV IgG* в тази популация и резултатите са съответно 6,2% (Kevorkyan, 2023), 11% (в настоящия труд), и 14,7% серопозитивни (Pishmisheva, 2020). В Хърватия е регистриран висок относителен дял на *anti HEV IgG (+)* положителни - 27,9% сред тези лица (Mrzljak, 2020). Тези значителни разлики в разпространението биха могли да се обяснят с локалната ендемичност на популационно ниво (Kevorkyan, 2023).

В ретроспективната група са включени и деца с онкохематологични заболявания. Независимо, че те не са таргет за заразяване с циркулиращите генотипове в България, изследванията са извършени, за да се оцени ролята на медикаментозната имуносупресия за заразяване. Относителният дял на *anti HEV IgM* сред тях е висок - 69%. Уместно е изследванията да продължат като се включи и изследване на *anti HEV IgG*, както и на РНК на *HEV* при положителните проби, а и изследване на маркери за *EBV*, *CMV* предвид кръстосаната реактивност съответно до 33% с тези вируси в тази възраст (Huams C., 2014). Съвместно с клиницисти е уместно да се проучи протичането на симптомна хепатит Е инфекция и хронична инфекция в тази група както и разпространението на инфекцията в педиатричната популация.

По отношение на пола специфични антитела се установяват значимо по-често при мъже/*anti-HEV IgM* - (мъже - 33%/жени - 23% в проспективната група), *anti-HEV IgG* (мъже - 26%/жени - 17%). Нашите изследвания потвърждават данните от литературата, че мъжкият пол е по-засегнат от тази инфекция (Faber et al., 2018; Gay,

2021; Jacobsen, M., 2021, Golkocheva-Markova E, 2023, Теохаров П, 2014). Към момента причините за това не са напълно изяснени, но се допуска влиянието на поведенчески и биологични фактори: специфични хранителни навици (консумация на по-големи количества месо и предпочитание към сурово-сушени деликатеси), по-висока честота на придружаващи чернодробни увреждания и употреба на алкохол (Lhomme et al., 2016; EFSA, 2017).

По отношение разпространението на *anti HEV* в ретроспективната група не се установява статистически значима разлика между двата пола. Подобни са и резултатите от проучване сред амбулаторни лица в област Пловдив за периода 2012-2013 г (Теохаров, 2014). Проучванията и в тази група трябва да продължат като се категоризират изследваните по възраст, придружаващи заболяване във всяка възрастова група и вредни навици, занимания.

Възрастово-специфично разпространение на хепатит Е е докладвано в много проучвания, при които е установено статистически значимо по-високо серопревалиране на *HEV-3* при лица над 50 години в сравнение с по-млада възраст (Теохаров, 2014; van Gageldonk-Lafeber, 2017; Mansuy, 2016; Faber., 2012). Това се потвърждава и от нашите изследвания – най-висок е относителният дял на *anti HEV IgM (+)* положителни лица в проспективната група при лица >50 годишна възраст.

За разлика от проспективната група, в ретроспективната се наблюдава нетипично висок относителен дял на *anti-HEV IgM* (38%) и *anti-HEV IgG* (12%) при лицата под 20-годишна възраст. В тази група преобладават деца с онкохематологични заболявания. Поради малкия брой проби (n=26), състоянието на имunosупресия и риска от кръстосана реактивност (EBV, CMV), тези резултати не позволяват формулирането на изводи за ретроспективната група.

Въпреки това считаме, че деца с имunosупресия е уместно да бъдат изследвани и за инфекция с *HEV*, наред с други възможни патогени като изследването да включва доказване и нуклеиновата киселина на вируса на хепатит Е.

Разпространението на *anti-HEV* антитела варира значително в различните проучвания. Според Hartl et al. (2016), основните фактори за тази вариабилност (хетерогенност) са видът на изследваната популация, географският регион и специфичният серологичен тест, използван в лабораторията.

При проведените изследвания установяваме висок процент серопозитивни лица сред пациентите с криптогенна цироза (32%; $p = 0,1243$). Подобни данни има и от други автори (Akyüz F, 2019). Лица с чернодробна цироза са рискови за тежко протичане на

заболяването, при тях цитолитичните ензими са умерено повишени и съучастието на *HEV* може да остане неразпознато. Считаме за уместно лица от рисковите групи дори и с минимални чернодробни отклонения да бъдат изследвани и за хепатит Е вирусна инфекция.

Разпространението на *HEV* сред *HIV* (+) положителни лица е различно според резултатите от различни проучвания. По данни от нашите проучвания при 14% от изследваната подгрупа са установени *anti HEV*. В друго проучване на НРЛ „Хепатитни вируси“ сред инфектираните с *HIV* е установено 10% *anti HEV* положителни лица (*Golkocheva-Markova, 2022*). В Гърция относителният дял на *HEV* положителни в *HIV* популацията е 7,3%, както в общата популация и се приема, че *HIV* инфекцията не е рисков фактор за *HEV* (*Politou, 2015*). Различни са данните от Португалия, където серопозитивните в изследваната подгрупа са 25%, докато в общата популация е 18%. (*Filipe, 2022*). Други страни от Европа, като Испания и Дания докладват съответно 26% и 23% положителни сред инфектираните с *HIV* (*Harritshøj, 2019; Pineda, 2014*). При *HIV* инфектирани лица може и да не се образуват специфични антитела и при тях, и при други лица с имunosупресия е препоръчително да се търси наличие на РНК на *HEV* в серум или антиген на *HEV* във фекална проба (*Keane F, 2012*).

3. РНК на *HEV* в серумни проби с доказани антитела срещу *HEV*.

От 2019 г. се определя концентрацията на РНК на *HEV* с RT-PCR в реално време в НРЛ „Хепатитни вируси“.

Откриването на РНК на *HEV* в кръвта или изпражненията е показателно за налична инфекция с *HEV*. Всички проби с положителни антитела и от двете изследвани групи са изследвани за РНК на *HEV* и такава е установена в 1,4% (33/2467). Сред тях се открояват два клинични случая: пациент със синдром на Гилеи-Баре и пациент с имunosупресия на базата на лимфом и чернодробна цироза. Ниският относителен дял на положителни РНК проби дори и при лица с клинични, параклинични и серологични данни за остър хепатит Е се обяснява с краткотрайната виремия (*Balaban, 2022*). Времето на вземане на биологичната проба (кръв, серум) има значение за получения резултат. По тази причина отрицателен резултат за нуклеиновата киселина не отхвърля остър хепатит Е. Рутинната диагностика на инфекцията се основава на серологичното изследване – установяване на специфични антитела. При имунокомпетентни лица това най-често е достатъчно. Но за имунокомпрометирани и при лица, които не образуват *anti HEV IgM*

(10%) е препоръчително използването на молекулярно-биологични методи за диагностика.

4. Корелация между серологични и молекулярни маркери

Освен качествени тестове за диагностика на *HEV* са използвани и количествени – определяне стойността на установените антитела и концентрацията на РНК на *HEV*. Според получените резултати има правопрпорционална зависимост между стойността на *anti HEV IgM* и честотата на изолиране на РНК на *HEV* - при стойност на *anti HEV IgM* серологичен индекс (съотношение екстинкция на проба към Cut off (S/CO)) по-голям от 5, броят на *HEV* РНК (+) положителни проби се увеличава, а при стойност на индекса по-голям от 10 относителният дял достига 70%. При проучване на спорадични случаи на остра инфекция с *HEV* в Китай, РНК на *HEV* е доказана при 43% от случаите като е установено, че кумулативната вероятност за откриване на *HEV* вiremия бързо намалява до приблизително 10 % в рамките на 32 ден след началото на клиничните симптоми, а след това намалява по-бавно до 5 % на 41-ия ден и до нула на 131-ия ден. (Lu, 2014). При въведен рутинен скрининг на кръводарители чрез NAT (Nucleic Acid Testing) за доказване на вирусна РНК е проследена динамиката на ранната инфекция. Установено е, че *anti-HEV IgM* антителата се появяват средно на 33-ия ден след откриване на РНК- (с вариации от 7 до 108 дни), като достигат максимални нива средно на 36-ия ден. Пикът на вирусния товар в кръвта настъпва средно на 22-ия ден от началото на доловимата вiremия, което предхожда максималните стойности на *anti-HEV IgM* антителата (Plümers et al., 2024) Според данните и от други публикации (Tavakoli A, 2010), РНК на *HEV* се открива рано в хода на инфекцията, а именно първите дни от клиничните прояви. Поради тази причина, е уместно времето на вземане на пробата, отнесено към началото на клиничните прояви, да бъде отразено на съпроводителното писмо на кръвната проба, изпратена за лабораторно потвърждаване на инфекцията. За правилно интерпретиране на получените резултати от съществено значение е и познаване на жизнения цикъл на вируса и периодите на заболяването.

5. Молекулярно-генетична характеристика на изолати на *HEV*

В настоящата дисертация е извършено таксономично групиране на български изолати на *HEV*. Според получените резултати в България е разпространен генотип 3 на *HEV*, което съвпада с данни от по-ранно проучване за страната, при което е извършено генотипиране на *HEV* на базата на друг специфичен участък от първата

рамка на четене на вирусния геном (Теохаров, 2014). По-голямата част от установените понастоящем изолати на *HEV* принадлежат към подтиповете 3e (48%), 3f (24%) и 3c (12%), които се доказват и при ретроспективно проучване на проби от пациенти с остър хепатит Е, изследвани в НРЛ „Хепатитни вируси“ за периода 2013 – 2015 г. (Bruni, 2018). Доказаните, генотип 3 и подтипове 3e, 3f и 3c са зоонозни, те са най-разпространени в Европа и България не прави изключение. Въпреки че хепатит Е вирусът проявява значително генетично разнообразие, подтипове 3f, 3c и 3e са най-често изолирани сред инфектираните лица в Европа, включително България (Zahmanova, 2023).

През 2020 г. при проучване във Франция се установява връзка между субгенотипа на причинителя и клиничното протичане (Lhomme S, 2020). Според получените резултати подтип *HEV-3f* се свързва с по-тежка клинична картина, по-високи нива на серумния билирубин и по-честа хоспитализация на пациентите в сравнение с подтип *HEV-3c*, който протича по-благоприятно. В Унгария при пациенти с остър хепатит Е са доказани подтиповете 3e и 3f (Balázs, 2023; Ulber, 22). Подтип 3c е доказан при инфектирани кръводарители от Хърватия (Gorski, 2023). При филогенетичните изследвания на генотипното разнообразие на *HEV* в Германия са идентифицирани 3c (преобладаващ подтип) (67,3%), последван от 3f, 3e и 3i, съответно с 14,3%, 9,7% и 4,0% (Schemmerer, 2022).

Получените в настоящото изследване секвенции на *HEV* са групирани в два основни клейда, хомоложни със секвенции, изолирани от Европа (с произход от Италия и Германия) и такива, изолирани от Азия (с произход Монголия). Тези данни са в съответствие с пространствено-времевата реконструкция, проведена от Zehender *et.al.* за циркулиращите в момента генотипове на *HEV* в Европа. Според авторите *HEV-3* се подразделя в два основни клейда като единият от тях обединява по-рядко срещаните европейски подтипове и общият прародител на азиатските подтипове (Zehender, 2014). В същото време Palombieri и съавтори (Palombieri A, 2021) съобщават за висока нуклеотидна идентичност (92,0-93,9%) между подтипирани като *HEV-3c* последователности, изолирани от свине и от хора от България (Bruni, 2018) което се потвърждава и от направеното в настоящата работа подтипиране. Доказването на *HEV-3c* и във фекални проби от свине от Германия, Италия, Нидерландия и Полша позволява на авторите да изкажат хипотезата за разпространението на този подтип в България чрез търговия със заразени животни от други Европейски страни. Зоонозният характер на *HEV-3* се приема като основен фактор за високата хетерогенност на циркулиращите сред

хората вирусни щамове. Това е причината за установената в Белгия, Франция и Обединеното кралство смяна на циркулиращите подтипове като *HEV-3f* и *3e* са заменени от *HEV-3c*. В хода на нашите проучвания са установени и някои вируси, които към момента не могат да се приобщят към познатите типове и подтипове. Поради установената високата хетерогенност на циркулиращите в България щамове на *HEV* са нужни повече изследвания в тази насока. Необходимо е, съвместно с лекари, да се проучат клиничните прояви на заболяването, причинено от тези неопределени видове и техните резервоари (изследвания сред животни от различни видове).

Ограничение на настоящия дисертационен труд е малкият брой генотипирани/подтипирани проби, което се дължи на бързо преходната виремия и на липсата на информация за периода на заболяването, в който е взета пробата. Подобни съобщения има и от други автори - при изследване на реципиенти на органи в Турция е установена виремия 0,6% (*Balaban, 2022*), в Нидерландия сред установените *anti HEV* (+) пациенти с хематологични заболявания 2,4% са РНК положителни за *HEV*. При мащабно проучване сред 225 000 кръводарители в Обединеното кралство е установена *HEV* виремия при 0,035% (*Hewitt, 2014*).

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хепатит Е е част от вирусните хепатити и в България. Това изисква познаване на клиничните прояви на заболяването, пътищата на разпространение, рисковите групи, както и надеждни диагностични тестове. Оплакванията на пациентите с хепатит Е са като тези при останалите вирусни хепатити, отклоненията в лабораторните показатели - също и лабораторната диагностика – серологична и молекулярно-биологична – рядко има решаващо значение за поставяне на етиологична диагноза.

Хепатит Е идва в съображение при лица от рисковите групи, за които се препоръчва изследване дори и при минимални отклонения в чернодробната функция, както и при лица с извънчернодробни прояви, доказано свързани с тази инфекция. Макар и рядко, инфекцията може да се предаде и при преливане на кръвни продукти (31% серопозитивни), което изисква изследване на донорската кръв с цел предпазване от заразяване на реципиентите.

Изолираните генотипове и подтипове са част от европейските варианти, а установените нетипизирани изолати са основа за по-разширени изследвания.

Хепатитен вирус Е с неговите различни прояви и неизяснен потенциал към момента е предизвикателство както за лекари, така и за биолози и по-нататъшната съвместна работа трябва да продължи.

Настоящото проучване може да допринесе за подобряване на целевите стратегии за превенция и управление на инфекцията с *HEV* в нашата страна.

VI. ИЗВОДИ

1. Вирусът на хепатит Е е важен етиологичен агент на остър хепатит в България – серопревалирането сред изследваните 2467 лица е 31% като в проспективната група е 36%, а в ретроспективната група е 17%.
2. И според нашите проучвания възрастта над 50 г. и мъжкият пол определят повишен риск от развитие на симптоматична инфекция с *HEV*.
3. Поради краткотрайната виремия откриването на РНК на *HEV* в серума на пациента е възможно само в ранните етапи на инфекцията.
4. Отрицателен молекулярен резултат не отхвърля наличието на остра инфекция.
5. Висока стойност на *anti-HEV IgM* (серологичен индекс (≥ 10)) е показател за възможно наличие на РНК на *HEV* в изследваната проба.
6. В България циркулира характерния за Европа генотип 3 на *HEV*. Най-често срещаните подтипове са 3e (48%), 3f (24%), 3c (12%).
7. Установен е един неклассифициран до момента подтип.
8. Налице е хетерогенност на циркулиращите в България варианти.

VII. Декларация за оригиналност. Приноси

Декларация за оригиналност

От Чийдем Баариева Исмаилова.....

Във връзка с провеждането на процедура за
ЗАЩИТА НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И
НАУЧНА СТЕПЕН ДОКТОР
в Националния център по заразни и паразитни болести, декларирам:

1. Резултатите и приносите в представените от мен научни трудове са оригинални и не са заимствани от изследвания и публикации, в които нямам участие.
2. Информацията, съдържаща се в необходимите за провеждането на процедурата документи, справки и публикации е точна и отговаря на обективната истина.

Приноси

1. Установена е корелация между серологичния индекс (стойност на *anti HEV IgM*) и молекулярния маркер (РНК на *HEV*), което е основа за утвърждаване на диагностичен алгоритъм за доказване на остра инфекция с *HEV*.
2. Установена е генетична хетерогенност на проучените изолати на *HEV* в България и това е основа за по-нататъшни филогенетични проучвания върху циркулиращите в страната вирусни варианти.
3. Установени са неидентифицирани варианти на вируса, което е предпоставка за по-нататъшни генетични изследвания.
4. И в нашето проучване потвърждаваме, че за разпространението на *HEV* значение имат полът, възрастта, заниманията, рисковите фактори. Идентифицирането на рисковите групи е от ключово значение за подобряване на превенцията и здравния надзор в страната.

VIII. Литература

1. Баймакова М. Хепатит Е вирусна (HEV) инфекция: зооноза в постоянно развитие. София, Издателство на МУ-София, 2024. 142. ISBN 978-619-183-102-0
2. Владимирова П, Каменов Г, Стоицова С, Минкова А, Пармакова К. Остри заразни болести в България през 2019 г. (Основни епидемиологични показатели) Анализ на заразните заболявания в България 2019 Секция Епидемиология, надзор и ранно оповестяване на инфекции (ЕНРОИ), НЦЗПБ
3. Владимирова П, Каменов Г, Богданов Н, Минкова А, Стоицова С, Пармакова К. Остри заразни болести в България през 2020 г. (Основни епидемиологични показатели) Анализ на заразните заболявания в България 2020 Секция Епидемиология, надзор и ранно оповестяване на инфекции (ЕНРОИ), НЦЗПБ
4. Владимирова П, Каменов Г, Богданов Н, Минкова А, Стоицова С, Пармакова К. Остри заразни болести в България през 2021 г. (Основни епидемиологични показатели) Анализ на заразните заболявания в България 2021 Секция Епидемиология, надзор и ранно оповестяване на инфекции (ЕНРОИ), НЦЗПБ
5. Коцев, Ст., М. Пишмишева-Пелева, Е. Голкочева-Маркова, Ч. Исмаилова, Н. Ватев. Коинфекция на вирусен хепатит А и Е при пациент на 52 години. Клиничен случай. В: Сборник материали от IX Национална конференция „HIV/AIDS в условията на пандемията COVID-19. Екзотични инфекциозни и паразитни болести“, Цигов чарк, 26–29 май 2022. София, 2022, с. 115-120. ISBN 978-619-237-101-2.
6. Пишмишева-Пелева, М. Хепатит Е – екзотика или тихо присъствие. Пазарджик, Барич и сие, 2022. 120 с. ISBN 9786197388381
7. Пишмишева М, Голкочева-Маркова Е, Насева Е, Аргирова Р. Анализ на някои епидемиологични и клинични характеристики на ентерално предаваните хепатити А и Е (собствени наблюдения) – Медицински преглед, 2018.54, № 6, 30-35.
8. Теохаров П, Кеворкян А. Основни хепатотропни вируси в България-характеристика, диагностика, разпространение, специфична профилактика. София: Изд. „Изток-Запад“ (НЦЗПБ), 2014

9. Adlhoch C, Wolf A, Meisel H, Kaiser M, Ellerbrok H, Pauli G. High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet Microbiol.* 2009;139(3-4):270-278. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.032
10. Akyüz F, Çavuş B, Pınarbaşı B, Bozacı M, Baran B, Akyuz U, Uyanıkoglu A, Demir K, Beşışık F, Özdil S, Boztaş G, Mungan Z, Badur S, Yenen S, Kaymakoglu S. Cryptogenic liver cirrhosis and hepatitis E virus (HEV): Are they related? *Ann Hepatol.* 2019 Jul-Aug;18(4):585-589. doi: 10.1016/j.aohep.2019.01.007. Epub 2019 May 4. PMID: 31130469.
11. Balaban HY, Aslan AT, Akdoğan-Kittana FN, et al. Hepatitis E Virus Prevalence and Associated Risk Factors in High-Risk Groups: A Cross-Sectional Study. *Turk J Gastroenterol.* 2022;33(7):615-624. doi:10.5152/tjg.2022.21493
12. Baymakova M, Terzieva K, Popov R, Grancharova E, Kundurzhiev T, Pepovich R, Tsachev I. Seroprevalence of Hepatitis E Virus Infection among Blood Donors in Bulgaria. *Viruses.* 2021 Mar 16;13(3):492. doi: 10.3390/v13030492. PMID: 33809748; PMCID: PMC8002317.
13. Bouquet J, Cherel P, Pavio N. Genetic characterization and codon usage bias of full-length Hepatitis E virus sequences shed new lights on genotypic distribution, host restriction and genome evolution. *Infect Genet Evol.* 2012;12(8):1842-1853. doi:10.1016/j.meegid.2012.07.021
14. Bruni R, Villano U, Equestre M, et al. Hepatitis E virus genotypes and subgenotypes causing acute hepatitis, Bulgaria, 2013-2015. *PLoS One.* 2018;13(6):e0198045. Published 2018 Jun <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198045>
15. Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, et al. The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(10):1429-1435. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03504.x
16. De Sabato L, Lemey P, Vrancken B, et al. Proposal for a new subtype of the zoonotic genotype 3 Hepatitis E virus: HEV-3l. *Virus Res.* 2018;248:1-4. doi:10.1016/j.virusres.2018.02.010
17. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol.* 2018;68(6):1256-1271. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.005
18. European Centre for Disease Prevention and Control. Options for national testing and surveillance for hepatitis E virus in the EU/EEA – Operational guidance. Stockholm: ECDC; 2019. Accessed August 25, 2025.

<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/options-national-testing-and-surveillance-hepatitis-e-virus-eueea-operational>.

19. Faber M, Askar M, Stark K. Case-control study on risk factors for acute hepatitis E in Germany, 2012 to 2014. *Euro Surveill*. 2018;23(19):17-00469. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.19.17-00469
20. Filipe R, Prista-Leão B, Silva-Pinto A, et al. Hepatitis E in a Portuguese cohort of human immunodeficiency virus positive patients: High seroprevalence but no chronic infections. *Health Sci Rep*. 2022;5(3):e624. Published 2022 May 20. doi:10.1002/hsr2.624
21. Gay L, Melenotte C, Lakbar I, et al. Sexual Dimorphism and Gender in Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2021;12:698121. Published 2021 Jul 22. doi:10.3389/fimmu.2021.698121
22. Golkocheva-Markova E, Ismailova C, Tenev T, Nikolaeva-Glomb L. Studies on the epidemiological and molecular characteristics of the hepatitis E virus in Bulgaria: a comprehensive review: HEV in Bulgaria. *Probl Inf Parasit Dis*. 2021;49(1):5-13. doi:10.54300/pipd.2021.15
23. Golkocheva-Markova E, Ismailova C, Kevorkyan A, Raycheva R, Zhelyazkova S, Kotsev S, Pishmisheva M, Rangelova V, Stoyanova A, Yoncheva V, et al. Age and Gender Trends in the Prevalence of Markers for Hepatitis E Virus Exposure in the Heterogeneous Bulgarian Population. *Life*. 2023; 13(6):1345. <https://doi.org/10.3390/life13061345>
24. Golkocheva-Markova E, Kevorkyan A, Raycheva R, et al. Assessment of hepatitis E seropositivity among HIV-infected patients in Bulgaria. *Braz J Infect Dis*. 2022;26(1):102329. doi:10.1016/j.bjid.2022.102329
25. Harritshøj LH, Kirkegaard-Klitbo DM, Mejer N, et al. Prevalence of anti-hepatitis E virus immunoglobulin G in HIV-infected individuals over three decades. *Int J Infect Dis*. 2019;84:67-72. doi:10.1016/j.ijid.2019.04.029
26. Hartl J, Otto B, Madden RG, et al. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. *Viruses*. 2016;8(8):211. Published 2016 Aug 6. doi:10.3390/v8080211
27. Hyams C, Mabayoje DA, Copping R, et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J Med Virol*. 2014;86(3):478-483. doi:10.1002/jmv.23827

28. Inoue J, Nishizawa T, Takahashi M, et al. Analysis of the full-length genome of genotype 4 hepatitis E virus isolates from patients with fulminant or acute self-limited hepatitis E. *J Med Virol*. 2006;78(4):476-484. doi:10.1002/jmv.20565
29. Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, et al. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(8):1274-1281. doi:10.3201/eid1808.120057
30. Jacobsen H, Klein SL. Sex Differences in Immunity to Viral Infections. *Front Immunol*. 2021;12:720952. Published 2021 Aug 31. doi:10.3389/fimmu.2021.720952
31. Jenckel M, Smith I, King T, et al. Distribution and Genetic Diversity of Hepatitis E Virus in Wild and Domestic Rabbits in Australia. *Pathogens*. 2021;10(12):1637. Published 2021 Dec 17. doi:10.3390/pathogens10121637
32. Karpe YA, Lole KS. NTPase and 5' to 3' RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain. *J Virol*. 2010;84(7):3595-3602. doi:10.1128/JVI.02130-09
33. Keane F, Gompels M, Bendall R, et al. Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection. *HIV Med*. 2012;13(1):83-88. doi:10.1111/j.1468-1293.2011.00942.x
34. Kevorkyan A, Golkocheva-Markova E, Raycheva R, et al. Hepatitis E Virus (HEV) Infection among Hemodialysis Patients from Southern Bulgaria. *Pathogens*. 2023;12(10):1208. Published 2023 Sep 30. doi:10.3390/pathogens12101208
35. Kotsev S, Pishmisheva-Peleva M, Golkocheva-Markova E, Ismailova C, Vatev N. Clinical course and outcome of acute hepatitis E infection in patients with chronic hepatitis B and C. *J Clin Infect Dis Pract*. 2023;8(1):171-173. doi:10.4171/2476-213X.1000171
36. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses*. 2016;8(8):212. Published 2016 Aug 5. doi:10.3390/v8080212
37. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Kamar N. Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. *J Clin Med*. 2020;9(2):331. Published 2020 Jan 24. doi:10.3390/jcm9020331
38. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol*. 2006;16(1):5-36. doi:10.1002/rmv.482

39. Lu YH, Qian HZ, Hu AQ, et al. Duration of viraemia in Chinese acute sporadic hepatitis E. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(5):755-759. doi:10.1007/s10096-013-2007-5
40. Lyoo KS, Yang SJ, Na W, Song D. Detection of antibodies against hepatitis E virus in pet veterinarians and pet dogs in South Korea. *Ir Vet J*. 2019;72:8. Published 2019 Jul 22. doi:10.1186/s13620-019-0146-4
41. Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, et al. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology*. 2016;63(4):1145-1154. doi:10.1002/hep.28436
42. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(18):9860-9865. doi:10.1073/pnas.94.18.9860
43. Mrzljak A, Dinjar-Kujundzic P, Knotek M, et al. Seroepidemiology of hepatitis E in patients on haemodialysis in Croatia. *Int Urol Nephrol*. 2020;52(2):371-378. doi:10.1007/s11255-019-02363-3
44. Muñoz-Chimeno M, Forero JE, Echevarría JM, et al. Full coding hepatitis E virus genotype 3 genome amplification method. *J Virol Methods*. 2016;230:18-23. doi:10.1016/j.jviromet.2016.01.004
45. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Usui R, Kobayashi E. Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection*. 2004;32(1):57-58. doi:10.1007/s15010-004-3078-0
46. Palombieri A, Tsachev I, Sarchese V, et al. A Molecular Study on Hepatitis E Virus (HEV) in Pigs in Bulgaria. *Vet Sci*. 2021;8(11):267. Published 2021 Nov 6. doi:10.3390/vetsci8110267
47. Pei Y, Yoo D. Genetic variation and clonal polymorphism of the hepatitis E virus. *Arch Virol*. 2002;147(1):135-148. doi:10.1007/s00705-002-0830-y
48. Pineda JA, Cifuentes C, Parra M, et al. Incidence and natural history of hepatitis E virus coinfection among HIV-infected patients. *AIDS*. 2014;28(13):1931-1937. doi:10.1097/QAD.0000000000000378
49. Pishmisheva M, Kotsev S, Golkocheva-Markova E, Argirova R. Extrahepatic manifestations in patients with acute hepatitis E – Pazardzhik, Bulgaria 2014 – 2022. *Probl Infect Parasit Dis*. 2024;52(1):5-10. doi:10.58395/sdrgfr19

50. Plümers R, Dreier J, Knabbe C, Steinmann E, Todt D, Vollmer T. Kinetics of Hepatitis E Virus Infections in Asymptomatic Persons. *Emerg Infect Dis*. 2024;30(5):934-940. doi:10.3201/eid3005.231764
51. Politou M, Boti S, Androutsakos T, Valsami S, Pittaras T, Kapsimali V. Seroprevalence of hepatitis E in HIV infected patients in Greece. *J Med Virol*. 2015;87(9):1517-1520. doi:10.1002/jmv.24214
52. Primadharsini PP, Miyake M, Kunita S, et al. Full-length genome of a novel genotype 3 hepatitis E virus strain obtained from domestic pigs in Japan. *Virus Res*. 2017;240:147-153. doi:10.1016/j.virusres.2017.08.003
53. Qin Y, Peng H, Li J, Gong J. Collateral effects of COVID-19 countermeasures on hepatitis E incidence pattern: a case study of china based on time series models. *BMC Infect Dis*. 2024 Mar 27;24(1):355. doi: 10.1186/s12879-024-09243-x.
54. Schielke A, Sachs K, Lierz M, Appel B, Jansen A, Johne R. Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virol J*. 2009;6:58. Published 2009 May 14. doi:10.1186/1743-422X-6-58
55. Tavakoli A, Alavian SM, Moghoofei M, Mostafaei S, Abbasi S, Farahmand M. Seroepidemiology of hepatitis E virus infection in patients undergoing maintenance hemodialysis: Systematic review and meta-analysis. *Ther Apher Dial*. 2021;25(1):4-15. doi:10.1111/1744-9987.13507
56. Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, et al. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res*. 2014;180:59-69. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.014
57. Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, et al. Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1112-1125. doi:10.1128/JCM.02002-09
58. Takova K, Koynarski T, Minkov I, Ivanova Z, Toneva V, Zahmanova G. Increasing Hepatitis E Virus Seroprevalence in Domestic Pigs and Wild Boar in Bulgaria. *Animals (Basel)*. 2020;10(9):1521. Published 2020 Aug 28. doi:10.3390/ani10091521

59. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991;185(1):120-131. doi:10.1016/0042-6822(91)90760-9
60. van Gageldonk-Lafeber AB, van der Hoek W, Borlée F, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among the general population in a livestock-dense area in the Netherlands: a cross-sectional population-based serological survey. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):21. Published 2017 Jan 5. doi:10.1186/s12879-016-2160-4
61. Varma SP, Kumar A, Kapur N, Durgapal H, Acharya SK, Panda SK. Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 3):572-581. doi:10.1099/vir.0.027714-0
62. Wang B, Akanbi OA, Harms D, et al. A new hepatitis E virus genotype 2 strain identified from an outbreak in Nigeria, 2017. *Virol J*. 2018;15(1):163. Published 2018 Oct 23. doi:10.1186/s12985-018-1082-8
63. Wingrove C, James C, Wang S. The impact of COVID-19 on hepatitis services and civil society organisations. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021;6(9):682-684. doi:10.1016/S2468-1253(21)00263-6
64. Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(12):2219-2221. doi:10.3201/eid2212.160979
65. Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(6):1044-1048. doi:10.3201/eid2006.140140
66. Wu J, Xiang Z, Zhu C, et al. Extrahepatic manifestations related to hepatitis E virus infection and their triggering mechanisms. *J Infect*. 2021;83(3):298-305. doi:10.1016/j.jinf.2021.07.021
67. Yano K. Wild boar as an important reservoir of hepatitis E virus in western Japan. *Hepatol Res*. 2007;37(3):167-169. doi:10.1111/j.1872-034X.2007.00034.x
68. Zeng MY, Gao H, Yan XX, et al. High hepatitis E virus antibody positive rates in dogs and humans exposed to dogs in the south-west of China. *Zoonoses Public Health*. 2017;64(8):684-688. doi:10.1111/zph.12377
69. Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, et al. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol*. 2009;81(8):1371-1379. doi:10.1002/jmv.21536

IX. Публикации, свързани с темата на дисертационния труд

1. **Ch. Ismailova**, A. Stoyanova, V. Yoncheva, T. Tenev, L. Nikolaeva Glomb, E. Golkocheva-Markova. Phylogenetic analysis of twelve Bulgarian sequences based on partial open reading frame 2 genome fragment of hepatitis E virus. Problems of Infectious and Parasitic Diseases. 2024;52(1):5-12. doi:10.58395/y45wev44 **Q4**
2. **Исмаилова Ч.**, Голкочева-Маркова Е., Тенев Т., Л. Николаева-Гломб. "Хепатит Е вирусна инфекция. Биологична характеристика и молекулярна епидемиология", МедИнфо. 2021, 3: 82-87.
3. Elitsa Golkocheva-Markova, **Chiydem Ismailova**, Tencho Tenev, Lubomira Nikolaeva-Glomb ,, "Studies on the epidemiological and molecular characteristics of the hepatitis E virus in Bulgaria: a comprehensive review: HEV in Bulgaria" Problems of Infectious and Parasitic Diseases. 2021; 49(3):27-34. doi:10.58395/pipd.v49i3.75 **Q4**
4. Komitova R, Kevorkyan A, Golkocheva-Markova E, Atanasova M, Rangelova V, Raycheva R, **Ismailova C**, Stoyanova A, Tenev T. Clinical and virological profile of locally acquired acute hepatitis E in South Bulgaria. The Journal of Infection in Developing Countries, 2024; 18:136–144. <https://doi.org/10.3855/jidc.18341>, SJR (2022) 0.47, IF (2022) 1.9 **Q3**
5. Elitsa Golkocheva-Markova, Ani Kevorkyan, Ralitsa Raycheva, **Chiydem Ismailova**, Viliana Yoncheva, Tencho Tenev, Radoslava Emilova, Lyubomira Grigorova, Ivan Baltadzhiev, Radka Komitova. Assessment of hepatitis E seropositivity among HIV-infected patients in Bulgaria. The Brazilian Journal of infectious diseases, 2022;26(1):102329; <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2022.102329> ; IF (2021) 3.257, , SJR 0.67 **Q3**

Х. Участия в международни и национални научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. **Ч. Исмаилова**, Т. Тенев, П. Генова-Калу, Е. Голкочева-Маркова. “Разпространение на антитела срещу вируса на хепатит Е при ветеринарни лекари” на онлайн международна научна конференция „Традиции и съвременност във ветеринарната медицина“ на ФВМ към ЛТУ, 16.04 – 18.04.2021 г. Постер
2. В. Йончева, **Ч. Исмаилова**, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова, Животински модели за изучаване на хепатит Е вирусна инфекция, XII работна среща с международно участие „Експериментални модели и методи в биомедицинските проучвания“, София, БАН, 9.06.-11.06.2021 г., Постер.
3. **Ч. Исмаилова**, В. Йончева, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова, Размножаване на хепатит Е вируса в клетъчни култури, XII работна среща с международно участие „Експериментални модели и методи в биомедицинските проучвания“, София, БАН, 9.06.-11.06.2021 г.
4. **Ч. Исмаилова**, В. Йончева, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова. “Хепатит Е вирусна ко-инфекция при пациенти инфектирани с други хепатитни вируси” XIX Национален Конгрес по Микробиология и Инфекции на БАМ, 14.09 - 16.09.2021 г. Постер (10 т.)
5. **Ч. Исмаилова**, В. Йончева, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова. “Въздействие на пандемията COVID-19 през 2020 г. върху тестването за вирусни хепатити” VIII Национална конференция -Ефектът на пандемията КОВИД-19 върху ХИВ/СПИН и други инфекциозни заболявания към МУ-Пловдив, 16.09.2021 г. - 19.09.2021 г., Цигов чарк. Постер (10 т.)
6. **Ch. Ismailova**, V. Yontcheva, T. Tenev, A. Stoyanova, E. Golkocheva-Markova: Determination of the molecular-epidemiology characteristics of the hepatitis E virus by Sanger sequencing technique. International Scientific Conference Kliment's Days 2022, 4 May 2022, Sofia, Bulgaria
7. **Ч. Исмаилова**, В. Йончева, Т. Тенев, А. Кеворкян, Р. Комитова, Т. Костадинова, В. Цеков, Ц. Чардакова, С. Сариян, Е. Голкочева-Маркова: Маркери за хепатит Е вирус и други хепатитни коинфекции при хемодиализни пациенти. Юбилеен XX национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на БАМ. 16-18.09.2022 г., Пловдив

8. В. Йончева, **Ч. Исмаилова**, Т. Тенев, Е. Голкочева-Маркова: Оценка на разпространението на антитела срещу хепатит Е в сборни плазми – начално проучване и преглед на литературата Юбилеен XX национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на БАМ. 16-18.09.2022 г., Пловдив
9. С. Коцев, М. Пишмишева-Пелева, В. Стоева, Е. Голкочева-Маркова, **Ч. Исмаилова**, Е. Насева, Н. Ватева „Разпространение на хепатит Е вирусната инфекция сред кръвни донори от област Пазарджик“ в Юбилейна национална научна конференция „ХИВ и екзотични паразитни и инфекциозни болести в пост пандемичния период на COVID-19“ ; Цигов чарк, 25-28. 05. 2023 г.
10. **Ch. Ismailova**, A. Stoyanova , V. Yontcheva, T. Tenev, St. Kotsev, M. Pishmisheva-Peleva, R. Komitova, L. Nikolaeva-Glomb, E. Golkocheva-Markova „Detection and diversity of Hepatitis E Virus genotype 3 in patients with Acute Viral Hepatitis E from Bulgaria“ за V. BALKAN AGRICULTURAL CONGRESS, September 20-23, 2023, Edirne, Turkey"
11. E. Golkocheva-Markova, **Ch. Ismailova**, T. Tenev, L. Nikolaeva Glomb. Evolution of the hepatitis E signal-to-Cutoff positive score among patients with acute viral hepatitis. P063. 23rd Annual Conference of the European Society for Clinical Virology (ESCV 2021), September 15-17, 2021, virtual.
12. **Ch. Ismailova**, R. Stefanova, T. Tenev, P. Miteva, S. Krumova, E. Golkocheva-Markova: Seroprevalence of antibodies against hepatitis E virus and Parvovirus B19 among hematology pediatric patients. International Scientific Conference 40th Annual Meeting of the ESPID. 9-13 May 2022, Athens & online"

XI. Научни проекти свързани с дисертационния труд

1. „Проучвания върху генотипното разнообразие и участието на полипролиновия регион в ин витро адаптацията на хепатит Е вируса“, договор № КП-06-Н33/2 на ФНИ
2. „Подобряване на националните диагностични възможности за откриване на вируса на хепатит Е при свине и продукти от свински произход“ (BUL5017), финансиран от Международната агенция по атомна енергия (МААЕ)
3. Проект № BG05M2OP001-1.002-0001, финансиран от Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“, съфинансирана от Европейския съюз чрез Европейски фонд за регионално развитие

XII. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Интерпретация на маркери на инфекция с HEV.

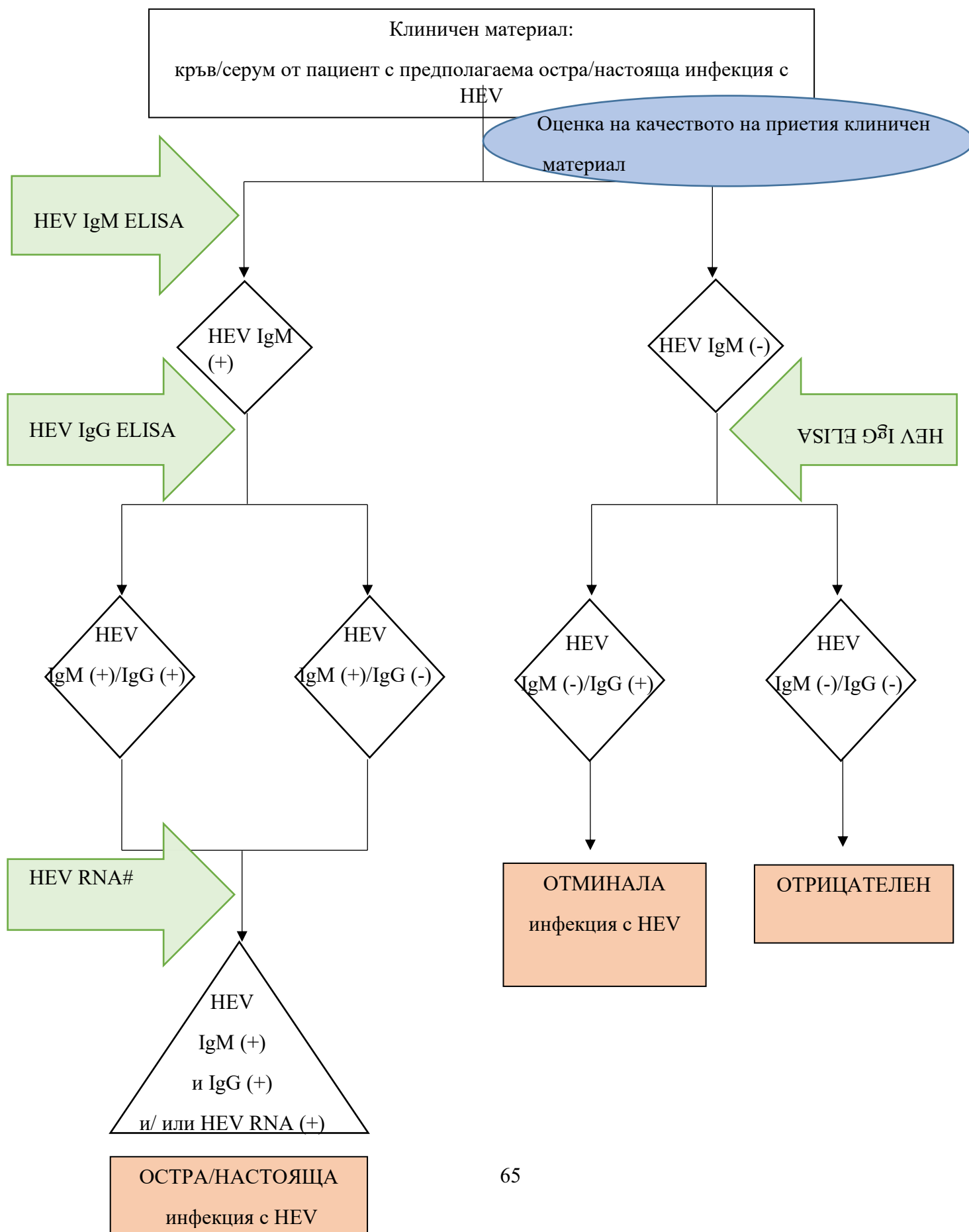
Давност на HEV инфекция	Позитивни маркери
Настояща ОСТРА	• HEV RNA • HEV RNA + anti-HEV IgM • HEV RNA + anti-HEV IgG • HEV RNA + anti-HEV IgM + anti-HEV IgG • Anti-HEV IgM + anti-HEV IgG (нарастващи стойности) • фекален HEV antigen
Настояща ХРОНИЧНА	• HEV RNA ($\pm$ anti-HEV) ≥ 3 месеца • фекален HEV antigen
Прекарана инфекция	• Anti-HEV IgG

Приложение 2. Лечебни заведения в страната, от които са постъпили пробите включени в дисертационния труд.

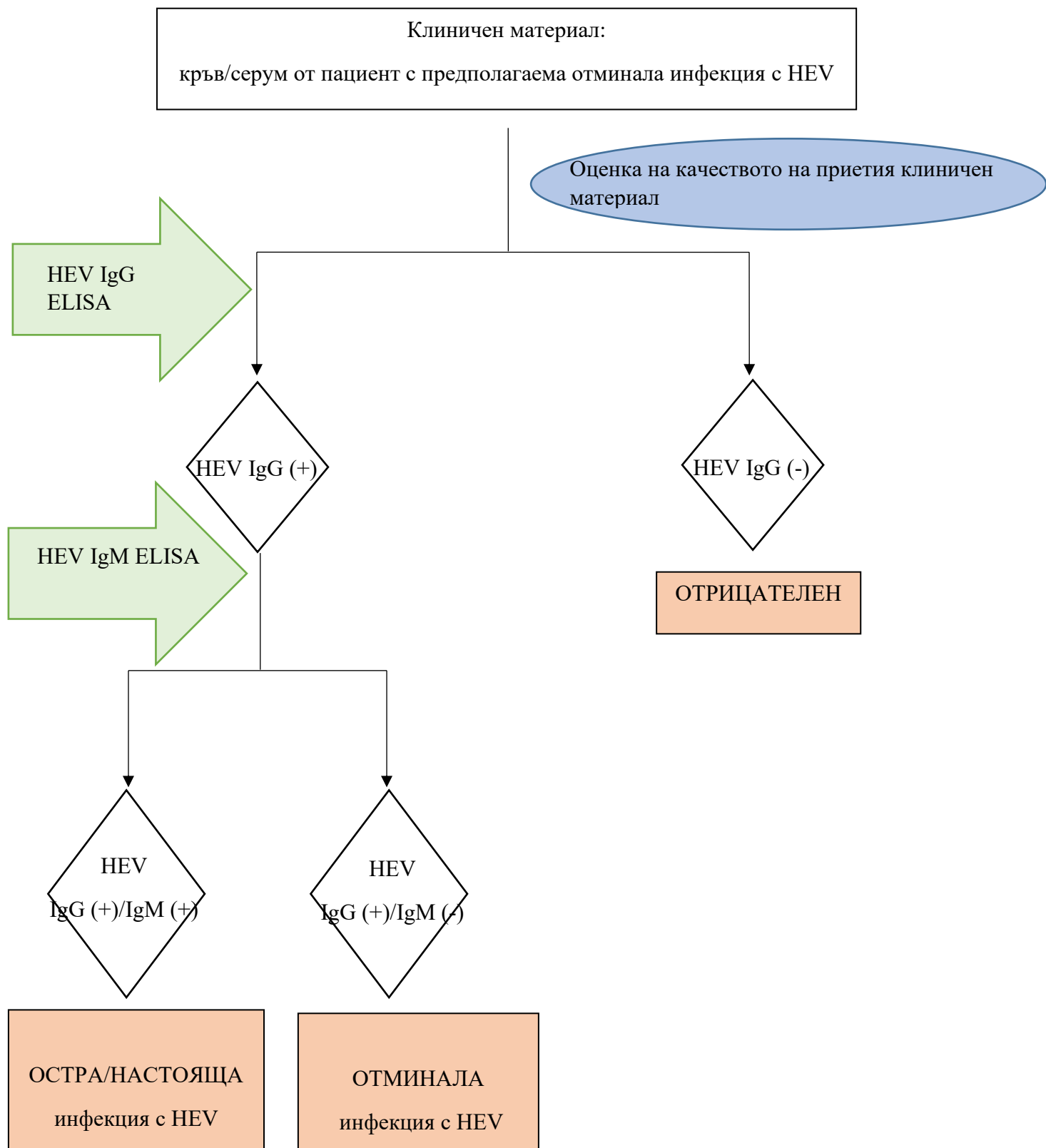
- СБАЛПФЗ ЕООД, София; УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, София; УМБАЛ „Царица Йоанна - ИСУЛ“ ЕАД, София; УМБАЛ „Св. Анна“ АД, София; МБАЛ „Княгиня Клементина“ ЕАД, София; УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов“ ЕАД, София; МБАЛ НКБ ЕАД, София; СБАЛ по детски болести “Проф. Иван Митев”, София; УМБАЛ АДЖИБАДЕМ СИТИ КЛИНИК ЕООД, София; ВТОРА МБАЛ София ЕАД, София; СБАЛИПБ „Проф. Иван Киров” ЕАД София; МБАЛ „Д-р Стамен Илиев“ АД Монтана; УМБАЛ Лозенец ЕАД, София; МБАЛ „Д-р Братан Шукеров“ АД Смолян; УМБАЛ Бургас АД, Бургас; МБАЛ Добрич АД, Добрич; УМБАЛ „Канев“ АД Русе; УМБАЛ „Св. Марина“ Плевен Варна; УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД, Плевен; МБАЛ „Д-р Тота Венкова“ АД, Габрово; МБАЛ „Д-р Асен Велев“ ЕООД, Разлог; МБАЛ Шумен АД, Шумен; МБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕООД, Дупница; МБАЛ Търговище АД, Търговище; СБАЛББ Перник ЕООД, Перник; МБАЛ Силистра АД, Силистра; МБАЛ „Св. Иван Рилски – 2003“ ООД, ДУПНИЦА; МБАЛ Благоевград АД, Благоевград; УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, Пловдив; МБАЛ „Рахила Ангелова“ АД, Перник; МБАЛ Самоков ЕООД; МБАЛ Пазарджик АД, Пазарджик; МБАЛ „СВ. Пантелеймон“ АД Ямбол.

Приложение 3. Алгоритми за диагностика на HEV инфекция (EASL, 2018).

А) Алгоритъм за лабораторно доказване на остра/настояща инфекция с HEV



Б) Алгоритъм за лабораторно доказване на отминала инфекция с HEV



Благодарности!

Изразявам своята най-искрена благодарност към моя научен ръководител, **доц. д-р Любомира Николаева-Гломб, дм,** и към моя научен консултант **гл. ас. Елица Голкочева-Маркова, дм.** Техните безценни съвети, задълбочени познания и изключителна подкрепа бяха решаващи за написването и успешното завършване на този дисертационен труд.

Специални благодарности отправям към Ръководството на НЦЗПБ за предоставената възможност и база за работа, към д-р Тенчо Тенев, завеждащ на Националната референтна лаборатория по хепатитни вируси, както и към целия екип на лабораторията. Тяхната професионална помощ беше от съществено значение за провеждането на изследването и за постигането на тези резултати.

Не на последно място, искам да изразя своята дълбока благодарност към моето семейство за безкрайното търпение, разбиране и подкрепа през всичките години. Без тяхната обич и вяра в мен, този труд не би бил възможен.