



НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Любомира Свиленова Григорова

Молекулярно-вирусологичен анализ на трансмисионните кълъстери на въведените и разпространени HIV-1 субтипове в България

**Автореферат
на дисертационен труд**

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по научна
специалност Вирусология

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

Професионално направление: 4.3. Биологически науки;

**Научен ръководител:
доц. Ивайло Алексиев Иванов, д-р**

София, 2025 г.

Дисертационният труд е разработен в Отдел „Вирусология“, в Национална Референтна Потвърдителна Лаборатория по HIV (НРПЛ по HIV), към Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), гр. София. Проучванията са финансирани от Националният център по заразни и паразитни болести, София, България, Министерство на здравеопазването на Република България 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“ и Европейския фонд за регионално развитие.

Вътрешната защита се състоя пред разширен колегиум на Отдел „Вирусология“ на 22.05.2025 г. от 13:00 ч.

Дисертационният труд се състои от списък с използвани съкращения, списък на използвани фигури, списък на използвани таблици, въведение, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, изводи, приноси, списък с използвана литература и приложения. Дисертационният труд съдържа 203 страници, 42 фигури и 19 таблици. Библиографията наброява 198 литературни източника, от които 2 на български език и 196 на английски език.

Дисертационният труд е насрочен за публична защита на 30.07.2025 г. от 13:00 ч. В аулата на НЦЗПБ, бул. Янко Сакъзов № 26, гр. София, на открито заседание на научното жури, назначено със заповед № 196/30.06.2025 г. на Директора на НЦЗПБ, съгласно ППЗРАСРБ на НЦЗПБ и ЗРАСРБ.

Съдържание

Съдържание	3
Списък с използвани съкращения	5
Списък на използвани фигури	6
Списък на използвани таблици	7
1. Въведение.....	8
2. Цел	10
2.1. Задачи	10
3. Материали и методи.....	11
3.1. Изследвани кръвни проби.....	11
3.2. Секвениране на вирусния геном	11
3.2.1. Технология за секвениране и анализ на HIV-1	12
3.2.2. Метод за секвениране с капиларен секвенатор и кит Viroseq	12
3.2.3. Етапи в процеса на генотипизиране.....	13
3.3. Филогенетичен анализ на HIV-1 генома	15
3.3.1. Използвани методи за филогенетичен анализ на HIV-1	15
4. Резултати.....	16
4.1. Демографска и епидемиологична характеристика на пациентите, инфектирани с HIV-1 субтип В в България.....	16
4.1.1. Субтипизиране и рекомбинантен анализ с Интернет базирани инструменти	21
4.1.2. Резултати от анализа на разпространението на HIV-1 субтип В в България	22
4.1.3. Филогенетичен трансмисионен анализ на HIV-1 субтип В	24
4.1.3.1. Подравняване на секвенции за филогенетичен анализ	24
4.1.3.2. Идентифициране на трансмисионни клъстери на HIV-1 субтип В с MicrobeTrace	24
4.1.3.3. Разширен анализ на трансмисионни клъстери на HIV-1 субтип В	26
4.1.3.4. Триади и Диади на предаване	28
4.1.3.5. Единични въвеждания на вируса.....	28
4.1.3.6 Регионално разпределение на единични секвенции.....	28
4.2. Демографска и епидемиологична характеристика на пациентите, инфектирани с HIV-1 CRF01_AE в България	30
4.2.1. Демографски и епидемиологични характеристики	30
4.2.2. Демографска структура на пациентите.....	31
4.2.3. Филогенетичен трансмисионен анализ на HIV-1 CRF01_AE	34
4.2.3.1. Идентифициране на трансмисионни клъстери на HIV-1 CRF01_AE с MicrobeTrace	34
4.2.3.2. Резултати от анализа с MicrobeTrace	35
4.2.3.3. Анализ на трансмисионни клъстери	36
4.2.3.4. Единични въвеждания на вируса.....	37
4.3. Демографска и епидемиологична характеристика на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 в България (2012 - 2020 г.).....	38
4.3.1. Демографски и епидемиологични данни.....	39
4.3.2. Епидемиологични данни за произход и вероятна страна на инфектиране	42
4.3.4. Субтипизиране и рекомбинантен анализ с Интернет базирани инструменти....	47
4.3.5. Анализ на трансмисионните категории в различните субтипове	49

4.3.5.1. Преобладаване на трансмисионната категория MSM в рекомбинантни форми	50
4.3.6. Анализ на трансмисионните категории по години.....	50
4.3.7. Реконструиране на филогенетично дърво	52
4.3.8. Реконструиране на филогенетично дърво на HIV-1 субтип В	54
4.3.9. Реконструиране на филогенетично дърво на HIV-1 не-В субтипове	59
5. Дискусия	63
6. Изводи	71
7. Приноси.....	73
Приноси с оригинален характер.....	73
Приноси с научно-приложен характер	74
8. Литературна справка.....	75
Благодарности.....	76
Публикации и участия свързани с дисертационния труд.....	77
Публикации с импакт фактор	77
Публикации без импакт фактор	77
Участия в научни форуми в България	78
Участия в научни форуми в чужбина	81

Списък с използвани съкращения

Съкращение	Пояснение към направеното съкращение
BEAST	Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
COMET	COntext-based Modeling for Expeditious Typing
CRF	Циркулираща рекомбинантна форма
HIV	Човешки имунодефицитен вирус
jpHMM	Jumping Profile Hidden Markov Model
Kb	Килобаза
MAFFT	Multiple Alignment using Fast Fourier Transform
NNRTI	Ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза
NRTI	Нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза
ORF	Отворена рамка за четене
PCR	Полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction)
PI	Протеазни инхибитори
RIP	Recombinant Identification Program
URF	Уникална рекомбинантна форма (Unique Recombinant Form)
ART	Антиретровирусна терапия
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
кДНК	Копие на ДНК молекулата
МСМ	Мъже, които правят секс с мъже
НРПЛ по HIV	Национална референтна потвърдителна лаборатория по HIV
НЦЗПБ	Национален център по заразни и паразитни болести
РНК	Рибонуклеинова киселина
УИН	Хора, употребяващи инжекционни наркотици
ХЕТ	Хетеросексуални

Списък на използвани фигури

1. Обобщение на процеса на секвениране с ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System.
2. Процентно разпределение по пол за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящият дисертационен труд.
3. Процентно разпределение по възраст при диагностициране за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящият дисертационен труд.
4. Процентно разпределение по страна на произход за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящият дисертационен труд.
5. Процентно разпределение по страна на инфектиране за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящият дисертационен труд.
6. Процентно разпределение по регион в България по постоянен адрес за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящият дисертационен труд.
7. Процентно разпределение по трансмисионна категория за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящият дисертационен труд.
8. Процентно разпределение на HIV-1 субтипове, CRF (класически рекомбинантни форми) и URF (неидентифицирани рекомбинантни форми) в България за периода 1986-2018 г. въз основа на данни от НРПЛ по HIV, НЦЗПБ.
9. Визуализация на трансмисионните клъстери на HIV-1 субтип В, идентифицирани с помощта на програмата MicrobeTrace при генетично разстояние от 1,5%.
10. Процентно разпределение по възраст при диагностициране за пациентите с HIV-1 CRF01_AE, включени в настоящият дисертационен труд.
11. Процентно разпределение по регион в България по постоянен адрес за пациентите с HIV-1 CRF01_AE, включени в настоящият дисертационен труд.
12. Процентно разпределение по трансмисионна категория за пациентите с HIV-1 CRF01_AE, включени в настоящият дисертационен труд.
13. Визуализация на MicrobeTrace клъстери в HIV-1 CRF01_AE в България. При анализ с използване на генетично отстояние 1,5%.
14. Процентно разпределение по пол на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 година в България.
15. Процентно разпределение по възраст на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 година в България.
16. Процентно разпределение на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 година в България, които са чуждестранни граждани.
17. Процентно разпределение на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 година в България, които съобщават за инфектиране в държава различна от България.
18. Процентно разпределение на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 година в България според регион в страната по постоянен адрес.
19. Процентно разпределение на HIV-1 субтипове, CRF и URFs в България за периода 2012-2020 г. при наивни пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV, НЦЗПБ.

20. Процентно разпределение по трансмисионна категория във HIV-1 субтипове, CRFs и URFs в България за периода 2012-2020 г. при наивни пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV, НЦЗПБ.
21. Разпределение на трансмисионните категории по години в България за периода 2012-2020 г. при HIV-1 наивни пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV, НЦЗПБ.
22. Филогенетично дърво, съдържащо 1053 секвенции от пациенти диагностицирани с HIV-1 в НРПЛ по HIV за периода 2012-2020 година.
23. Реконструирано филогенетично дърво, състоящо се от 595 секвенции, изолирани от наивни пациенти диагностицирани в България за периода 2012-2020 година с HIV-1 субтип В.
24. Реконструирано филогенетично дърво, съдържащо 458 секвенции, изолирани от наивни пациенти, диагностицирани в България за периода 2012-2020 година с HIV-1 не-В субтипове.

Списък на използвани таблици

1. Демографски данни за пациентите с HIV-1 субтип В включени в настоящият дисертационен труд.
2. Обща характеристика на 663 HIV-1 *pol* секвенции със субтип В в България за периода 1998-2018 г. при генетично разстояние 1,5%. Представя цялостната картина на демографското и епидемиологично разпространение на вируса в страната.
3. Демографски данни за пациентите с HIV-1 CRF01_AE в България (1995-2019)
4. Обща характеристика на всички 270 HIV-1 *pol* секвенции CRF01_AE в България за периода 1995-2019 г.
5. Демографски данни за наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 в България за периода 2012-2020 г.

1. Въведение

Първият случай на свързано с човешкия имунодефицитен вирус (HIV) заболяване е описан от Центъра за контрол и превенция на заболяванията през 1981 година. Описан е случай на пациент със заболяване от синдром на Капоши и пневмония от пневмоцистис карини. Пациентът е принадлежал към групата на мъже, които правят секс с мъже (MSM). HIV-1, вирусът причинител на СПИН е открит през 1983 г. от Франсоаз Баресинуси от лабораторията на Люк Монтание във Франция.

Още в ранните години на познание на вируса учените започват да изучават разпространението му и опитите си да възпроизведат трансмисията на инфекцията. За първи разпространител на вируса се смята, мъж на име Гаетан Дугас (Gaetan Dugas), който в литературата е наричан „пациент нула“. Учените описват сексуалните връзки на пациент нула, като го поставят в средата на своя клъстер. Образуваният клъстер съдържал повече от 40 MSM, които живеели в над 10 големи градове в Съединените Американски Щати. Проучването продължило и тъй като професията на пациент нула е била стюард, били открити още множество инфектирани. През 1987 година списание New York Post го нарича „човекът, който ни даде СПИН“. Така е запомнен и в историята. Това първо проучване на образувания HIV-1 клъстер дава началото на последващи изследвания и развитие методите за изследване, в началото серологични, а след това и молекулярни. По-късно обаче става ясно, че първоначалните представи са били опровергани и HIV е възникнал много по-рано, още в началото на XX век, в Централна Африка. Молекулярните и филогенетични анализи показват, че вирусът е циркулирал сред хората десетилетия преди официалното му идентифициране, а Гаетан Дугас не е бил първоизточникът на епидемията, както дълго се е смятало.

В настоящето епидемията от HIV е глобален проблем за общественото здраве, през 2023 г. 39.9 милиона души са носители на инфекцията и живеят с HIV. 630 000 души са починали от СПИН свързани заболявания. 1,3 милиона души са новозаразените с HIV. Приблизително 88,4 милиона [71,3-112,8 милиона] души са се заразили с HIV от началото на епидемията, а 42,3 милиона [35,7 - 51,1 милиона] са починали от заболявания, свързани със СПИН [<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>].

В България до 2023 г. са диагностицирани общо 4039 лица с HIV-1.

HIV-1 е познат със своето изключително голямо генетично разнообразие. Наблюдават се 4 групи, от които група М е най-широко разпространена и дава началото

на световната епидемия. Група М съдържа 10 субтипа, суб-субтипове, циркулиращи рекомбинантни форми (CRFs) и уникални рекомбинантни форми (URFs). Най-разпространен в световен мащаб е субтип С, който инфектира Южна Африка и Индия, където се наблюдава най-голям брой инфекции. В Западния свят субтип В е преобладаващата генетична форма на вируса. Общирно разпространени са субтип А, CRF02_AG и CRF01_AE. В България доминира субтип В.

Трансмисията на HIV се осъществява посредством няколко основни пътя на предаване, кръвен, полов и вертикален, от майка на новородено. В миналото е било възможно вирусът да се предаде чрез преливане на кръв и кръвни продукти, но в настоящето вероятността за предаване на инфекцията по този път сведена до нула, тъй като се използват съвременни тестове за детекция на сексуално предавани инфекции. Възможно е предаване от майка на дете, но то също е слабо застъпено. Най-масов е половият път на предаване на вируса. Здравните власти използват кампании за раздаване на безплатни игли, спринцовки и презервативи, с цел да ограничат разпространението на вируса сред рисковите групи.

Въпреки всички мерки и усилия в посока намаляване на вирусното разпространение HIV-1 остава сериозен здравен проблем в световен мащаб. Поради тази причина е необходимо обстойно да се проучват образуваните трансмисионни клъстери в различни генетични форми на вируса. Формираните множество връзки между рисковите групи показват на учените в световен мащаб, че е необходимо детайлно филогенетично проучване. С помощта на молекулярно-биологичните методи съвременната наука успява да реконструира филогенетични дървета, с които се улеснява изучаването на механизма на предаване на вируса.

Клъстерният анализ е основен елемент в разработване на съвременни проучвания върху вирусното разпространение. Познанията, които се натрупват за образуването и уголемяването на къстерите на HIV-1 дават възможност на учените и здравните власти да съсредоточат усилията си в определени области от общественото здраве, за да намалят разпространението на HIV-1 в световен мащаб.

2. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се анализират трансмисионните филогенетични клъстери на различните HIV-1 субтипове, въведени и разпространени в България, чрез секвениране и филогенетичен анализ на фрагмент от *pol* гена на HIV-1.

2.1. Задачи

1. Секвениране на фрагмент от *pol* гена на HIV-1 от селектирани плазмени проби.
2. Изготвяне на бази данни за анализ чрез комбиниране на геномни секвенции, демографски и епидемиологични данни.
3. Субтипироване, рекомбинантен и филогенетичен анализ на получените секвенции.
4. Идентифициране на трансмисионни филогенетични клъстери.
5. Молекулярно-епидемиологичен анализ на трансмисионните клъстери и тяхната връзка с въведените и разпространени HIV-1 субтипове, както и с демографските и епидемиологични характеристики на изследваната популация.

3. Материали и методи

3.1. Изследвани кръвни проби

В настоящото проучване са включени плазмени проби от пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV в периода от 1986 г. до 2020 г., разделени в 3 групи. Първата включва 663 секвенции на пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV, НЦЗПБ, София, България за периода от 1986 до 2018 г. с установен субтип В. Втората група включва 270 секвенции, изолирани от плазмени проби на пациенти диагностицирани в НРПЛ по HIV между 1995 и 2019 г., инфектирани с HIV-1 CRF01_AE. А третата включва 1053 секвенции на наивни пациенти, диагностицирани за периода от 2012 до 2020 година. С цел получаване на демографска и вирусологична информация са анализирани анкетите за самооценка на пациентите, които те са попълнили по време на процеса на диагностициране. Лабораторните изследвания включват набор от серологични и молекулярно-биологични изследвания, проведени по време на диагностичния процес и вирусологичния мониторинг на пациентите с HIV в България. Кръвните проби са свързани с демографските и клинични данни чрез анонимен цифров код в съответствие с етичните стандарти на Република България [Alexiev I., 2013].

3.2. Секвениране на вирусния геном

През 2002 г. в България за пръв път е проведено генотипиране чрез секвениране на участък от вирусния геном в НРПЛ по HIV. Старт на генотипирането на HIV-1 в България е даден с еднокапилярен секвенатор ABI 310 и тест-кит Viroseq. Този метод за генотипиране е интегриран в процеса на вирусологичен мониторинг на пациентите, диагностицирани с HIV, които са на Антиретровирусна терапия (АРТ).

През 2005 г. НРПЛ по HIV въвежда втори тип секвенатор, който използва геловата електрофореза с 12 старта и тест-кит Trugene. Новият метод предлага по-голям капацитет и по-бърза обработка на пробите, което се оказва необходимо за справяне с увеличаващия се брой на пациентите и натоварването на лабораторията. Този нов подход осигурява по-бързо генотипиране като същевременно позволява ефективно

проследяване на вирусната еволюция в българската популация на хората, живеещи с HIV.

През 2002 г. се извършват само 4 изследвания, докато през 2005 г. броят на генотипираните проби нараства до 42. Последващото разширяване на капацитета на лабораторията позволява през 2022 г. броят на генотипираните проби да достигне 195. Тези промени са свързани с нарастващия брой диагностицирани пациенти, както и с увеличаването на броя на пациентите, които започват АРТ и се нуждаят от мониторинг на вирусната резистентност.

3.2.1. Технология за секвениране и анализ на HIV-1

В НРПЛ по HIV основният генетичен материал, който се анализира, е *pol* генът на HIV-1, включващ гените *PR* и *RT*. Тези два гена са отговорни за основни вирусни ензими, които са цел на терапевтичните средства, използвани при лечението на HIV инфекция. За секвениране на *pol* гена се използват два основни теста: TRUGENE® HIV-1 генотипиращ кит и Viroseq HIV-1 генотипиращ тест. И двата теста са насочени към фрагмент от *pol* гена, който кодира протеазата и обратната транскриптаза - основните целеви ензими за три основни класа АРТ: нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NRTI), ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза (NNRTI) и протеазни инхибитори (PI).

3.2.2. Метод за секвениране с капиларен секвенатор и кит

Viroseq

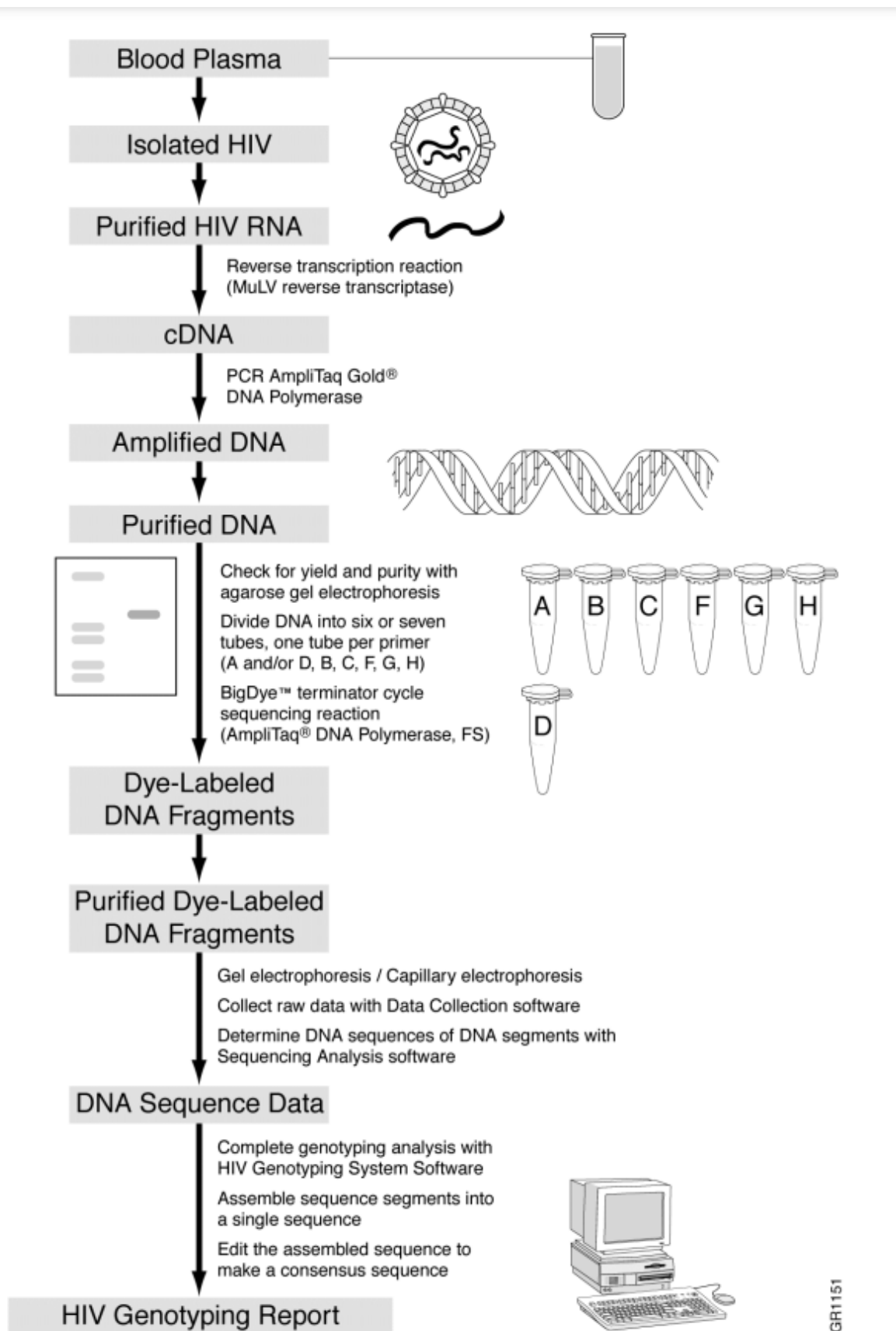
ViroSeq HIV-1 Genotyping System е усъвършенстван метод за секвениране на HIV-1, който позволява откриване на мутации в *pol* гена на HIV-1 и анализа на тяхната връзка с резистентността към АРТ. Методът използва амплификация на около 1,8 килобази (kb) ДНК, която включва целия *PR* ген и около две трети от *RT* гена в рамките *pol* отворена рамка за четене (ORF). След амплификация се използват седем праймера за сегментиране на амплифицираната ДНК, за да се образува консенсусна секвенция с размер 1,2 kb. Целта на генотипирането чрез секвениране на *pol* гена е не само да се идентифицират мутациите, които водят до резистентност към терапията, но и да се установи генетичната

принадлежност на вируса към различни субтипове и рекомбинантни форми на HIV-1. Това е от критично значение, тъй като различните субтипове могат да имат различни мутации, които да влияят на ефективността на терапиите. ViroSeq HIV-1 Genotyping System обработва проби с вирусен товар между 2 000 и 750 000 копия/мл, което прави системата изключително полезна за ежедневната диагностика и мониторинг.

3.2.3. Етапи в процеса на генотипизиране

Процесът на генотипизиране на HIV-1 с ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System включва пет основни етапа, които гарантират точно и ефективно генотипизиране (Фигура 1):

- I. Екстракция и пречистване на вирусната РНК от изследваната плазма. Този етап включва отделяне на вируса от клетъчните компоненти и неговото подготвяне за последваща амплификация.
- II. Обратна транскрипция на HIV-1 генома в кДНК което е необходимо, тъй като HIV е РНК вирус.
- III. Полимеразна верижна реакция (PCR) амплификация на *PR* и *RT* гените от кДНК. По време на този етап се създават многобройни копия на конкретни участъци от HIV-1 генома, които ще бъдат подложени на секвениране.
- IV. Директно секвениране на PCR амплифицирания продукт, чрез добавяне на шест или седем праймера в реакционната смес. Този етап позволява по-детайлно покритие и по-висока точност.
- V. Идентифициране и анализ на получените сурови данни, с помощта на специализиран софтуер ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System. В този етап се извършва сглобяване и редакция на получената 1,2 kb консенсусна секвенция и идентифициране на мутации, свързани с резистентността към АРТ, както и на нововъзникнали мутации, които не са били открити. Софтуерът извършва и сравнение на получената секвенция с референтната секвенция pNL4-3, препоръчана от AIDS Clinical Trials Group, за да се установи наличието на известни мутации.



Фиг. 1 Обобщение на процеса на секвениране с ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System. Източник: ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System, Version 2, User's Manual.

3.3. Филогенетичен анализ на HIV-1 генома

Филогенетичният анализ на вирусните геноми е основен инструмент за разкриване на еволюционната история на вирусите и за проследяване на техния генетичен напредък в популацията. В контекста на HIV-1 разширеното разбиране на неговата генетична диверсификация е от съществено значение за диагностика, лечение и контрола на вируса. Генетичният полиморфизъм в HIV-1 генома е основна причина за разнообразието на вируса, водещо до формиране на различни субтипове и рекомбинантни форми. Освен това, мутациите в HIV-1 генома играят ключова роля за развитието на резистентност към АРТ, което затруднява лечението на пациентите.

3.3.1. Използвани методи за филогенетичен анализ на HIV-1

В нашето изследване използвахме различни техники и специализирани програми за биоинформационен анализ, които позволяват точно определяне на вирусните субтипове, идентифициране на рекомбинантни форми и филогенетичен анализ на HIV-1. При проведения анализ бяха използвани интернет базирани инструменти и мануални методи, за да гарантираме висока точност на получените резултати.

В нашето изследване използвахме няколко основни инструмента за субтипироване, рекомбинантен анализ и филогенетично подравняване: REGA HIV-1 Subtyping Tool - Version 3.0, COMET HIV-1 Version 2.4, BLAST, RIP, jpHMM, MicrobeTrace, MAFFT, IQTree, FastTree Version 2.1.10, BEAST, ClusterPicker, AliView както и мануален филогенетичен анализ.

4. Резултати

4.1. Демографска и епидемиологична характеристика на пациентите, инфектирани с HIV-1 субтип В в България

Изследваните проби обхващат периода от 1986 до 2018 г. и включват проби от различни географски региони на Република България. Те обхващат всички основни трансмисионни групи на населението, които са изложени на риск от инфектиране с HIV-1. След успешното секвениране на получените проби, резултатите бяха подложени на анализ с помощта на интернет-базирани инструменти за субтипирание, както и на мануален филогенетичен анализ, който позволи идентифицирането и категоризирането на филогенетичните трансмисионни клъстери на HIV-1 субтип В. Чрез глобално филогенетично дърво, българските 663 HIV *pol* изолата бяха сравнени с международни секвенции, които отговарят на критериите за чист HIV-1 субтип В.

Демографските и епидемиологичните характеристики на пациентите с HIV-1 субтип В в България бяха установени чрез анализ на данни, предоставени от самите пациенти по време на диагностичния процес. Информацията беше събрана чрез попълване на въпросници, които се базират на принципа на самоопределяне за принадлежност към уязвими групи и рискови практики. Демографските данни включват информация за пола, възрастта при диагностициране, страната на произход, вероятната страна на инфектиране, регион по постоянен адрес и трансмисивната категория. Обобщените резултати се представят в Таблица 1, която показва разпределението на пациентите по тези демографски и епидемиологични характеристики.

Таблица 1. Демографски данни за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящият дисертационен труд.

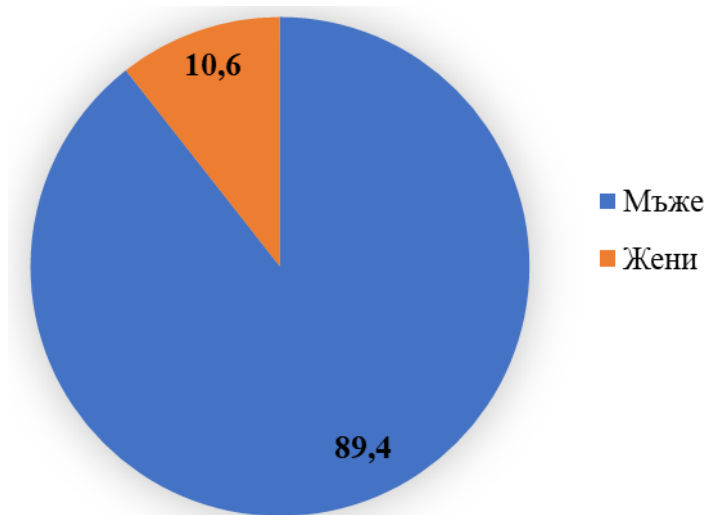
Демография	Субтип В	
	брой	(%)
Общ брой	663	100
Пол		
Мъже	593	89,4
Жени	70	10,6
Възраст в години		
≤19	23	3,5
20-29	253	38,2
30-39	256	38,6
40-49	92	13,9
≥50	39	5,9
Страна на произход		
България	651	98,2
Друга	12	1,8
Вероятна страна на инфектиране		
България	585	88,2
Друга	78	11,8
Регион в България по постоянен адрес		
София	368	55,5
Пловдив	44	6,6
Варна	48	7,3
Друг	203	30,6
Трансмисионна група		
ХЕТ	256	38,6
МСМ	376	56,7
УИН	22	3,3
МСМ+ УИН	1	0,2
Кръвопреливане (в първите години на епидемията)	4	0,6
МТС	4	0,6

Легенда: ХЕТ – Хетеросексуални лица; МСМ – Мъже, които правят секс с мъже; УИН – Употребяващи интравенозни наркотици; МСМ + УИН – Лица, попадащи в две трансмисионни групи (мъже, които правят секс с мъже и употребяващи интравенозни наркотици); МТС – Вертикална трансмисия от майка на дете (Mother to Child).

През ранните години на HIV епидемията в България групата на ХЕТ представлява най-голям дял от регистрираните случаи на HIV инфекция. С нарастващата глобализация и промените в социално-икономическата ситуация на страната, тенденциите на

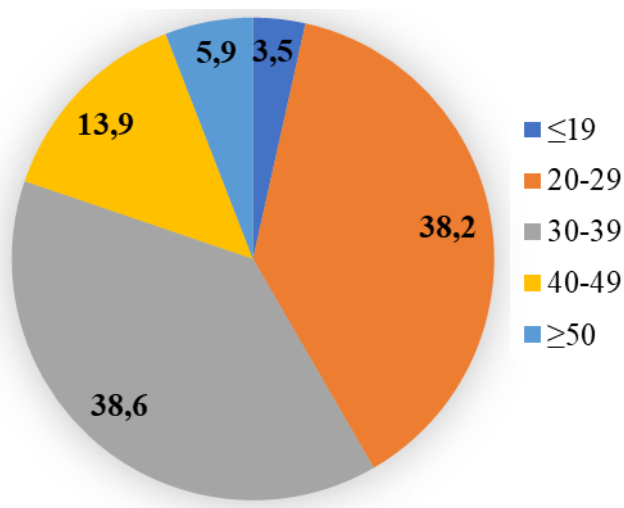
разпространение на HIV се променят, като с времето броят на заразените в тази трансмисионна категория продължава да нараства. Групата на MSM демонстрира значително увеличение след 2005 г., като този тренд продължава да расте експоненциално. Тази тенденция е в съответствие с наблюденията в други европейски страни, като се изразява в увеличеното осъзнаване и отчетност на сексуалните практики в тези общности. Възникването на HIV инфекцията в групата на УИН е наблюдавано през 2004 г., като през 2009 г. се регистрира пиково нарастване на случаите в тази уязвима група [Alexiev I., 2016].

Анализът на демографските и епидемиологични данни за пациентите, диагностицирани в НРПЛ по HIV за периода 1986-2018, показва, че 593 (89,4 %) от пациентите са мъже, докато 70 (10,6 %) са жени (фигура 2).



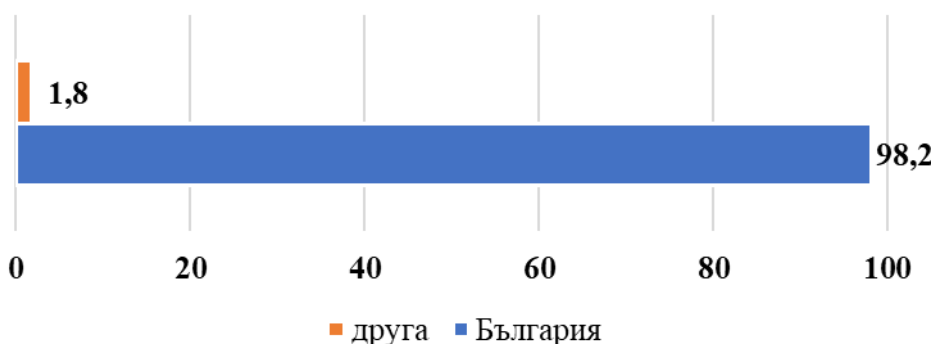
Фиг. 2. Процентно разпределение по пол за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящия дисертационен труд.

Средната възраст на пациентите при диагностициране е 33 години, като възрастта на пациентите варира от 1 до 73 години. Възрастовата група 20-39 години обхваща 76,8% от изследваните пациенти. Най-малък е дялът на пациентите в групата до 19 години (3,5 %), докато 5,9% от пациентите са на възраст над 50 години. Възрастовата група 40-49 години е представена с 13,9% (фигура 3).



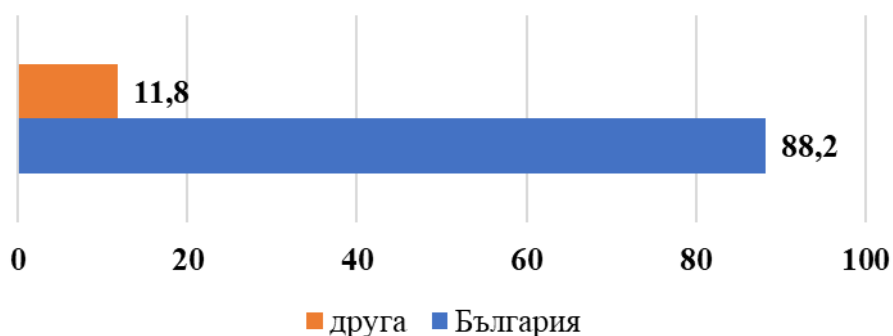
Фиг. 3. Процентно разпределение по възраст при диагностициране за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящия дисертационен труд.

Епидемиологичните данни показват, че 651 (98,2 %) от пациентите са български граждани, а 12 (1,8 %) са чужденци (фигура 4).



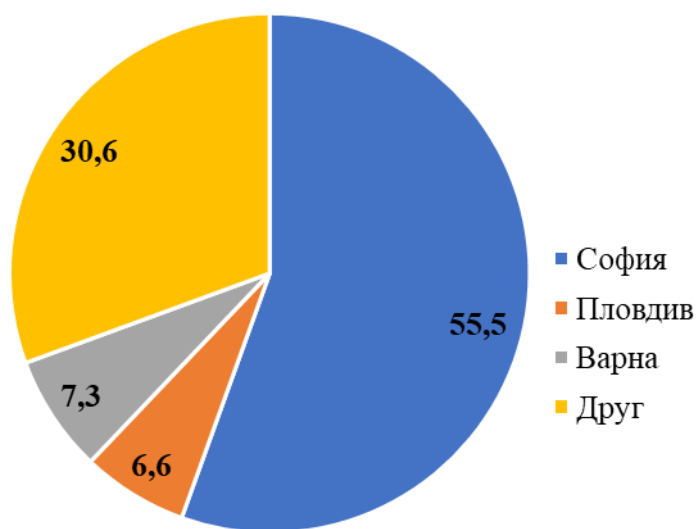
Фиг. 4. Процентно разпределение по страна на произход за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящия дисертационен труд.

Повечето от тях (585 или 88,2%) заявяват, че са придобили инфекцията на територията на България, докато 78 (11,8%) твърдят, че инфекцията им е настъпила извън страната, като 63 (9,5%) от тях са заразени в Европейския съюз (фигура 5). Това показва, че България остава основен регион за разпространение на HIV сред пациентите със субтип В, въпреки че миграцията и международните пътувания могат да играят значителна роля в предаването на инфекцията.



Фиг. 5. Процентно разпределение по страна на инфектиране за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящия дисертационен труд.

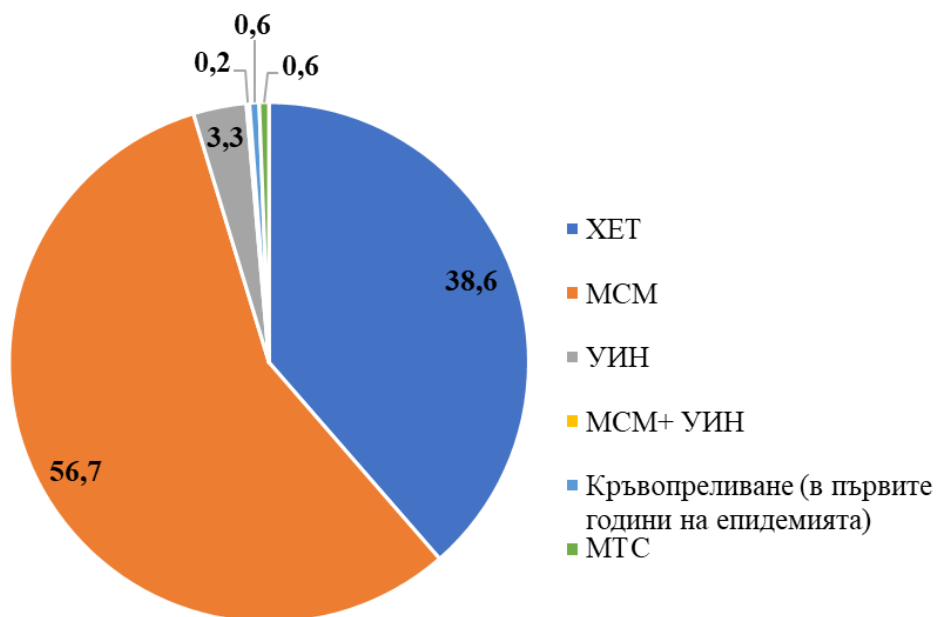
Географският анализ показва, че повече от половината от изследваните проби принадлежат на пациенти с постоянен адрес в София (55,5 %). Следващите най-големи региони са Варна (7,3 %) и Пловдив (6,6 %) (фигура 11), докато останалите региони на страната имат по-малко представителство. Това отразява не само демографските тенденции, но и достъпа до медицински грижи и диагностика в по-големите урбанизирани области.



Фиг. 6. Процентно разпределение по регион в България по постоянен адрес за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящия дисертационен труд.

Анализът по трансмисионни категории разкрива доминацията на групата на MSM, която обхваща 56,7 % от пациентите, следвана от хетеросексуалните лица (38,6 %) и интравенозните наркомани (3,3 %). Другите уязвими групи са слабо застъпени, като процентите им са под 1 % (фигура 7). Тези данни подчертават необходимостта от

целенасочени превантивни мерки, които да обхващат специфични рискови групи и да се адаптират към променящите се социални и епидемиологични условия.



Фиг. 7. Процентно разпределение по трансмисионна категория за пациентите с HIV-1 субтип В, включени в настоящия дисертационен труд.

4.1.1. Субтипирание и рекомбинантен анализ с Интернет базирани инструменти

Един от основните етапи в процеса на генетичен анализ на HIV-1 е субтипирането на изолираните секвенции, което предоставя важна информация за епидемиологичната динамика и молекулните характеристики на инфекцията. Процесът на субтипирание обикновено включва използването на напреднали интернет-базирани инструменти, които позволяват анализиране на големи обеми данни за сравнително кратко време. В рамките на настоящия дисертационен труд бяха използвани последователности от различни независими онлайн инструменти, за да се гарантира точното и прецизно определяне на субтиповете на изолираните HIV-1 секвенции.

Първият използван инструмент е REGA HIV-1 Subtyping Tool версия 3.0 (<http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>), разработен в Университета „Лиланд Станфорд-младши“ в Станфорд, Калифорния. Този инструмент използва мощни алгоритми за субтипирание чрез филогенетичен анализ и bootscanning, които са подходящи за обработка на големи данни. Основното предимство на REGA

инструмента е, че той изгражда множество филогенетични дървета за всяка отделна секвенция, като така оптимизира точността при определяне на съответния HIV-1 субтип. Чрез този подход инструментът дава възможност за най-точно класифициране на вирусни изолати на ниво субтип.

След като изолираните HIV-1 секвенции преминаха през процеса на субтипирание с REGA инструмента, те бяха анализирани с втори инструмент COMET HIV-1 версия 2.4 (<https://comet.lih.lu/>), разработен от Института по здраве в Люксембург. COMET предоставя контекстно базирана оценка на вирусните последователности, като ги сравнява с референтни секвенции, позволявайки по-дълбочинно разбиране за принадлежността на всяка нуклеотидна последователност към конкретен субтип, CRF (класически рекомбинантен форми) или URF (неидентифицирани рекомбинантни форми). Това позволява на учените да идентифицират не само стандартни субтипове, но и рекомбинантни форми, които могат да имат епидемиологично значение.

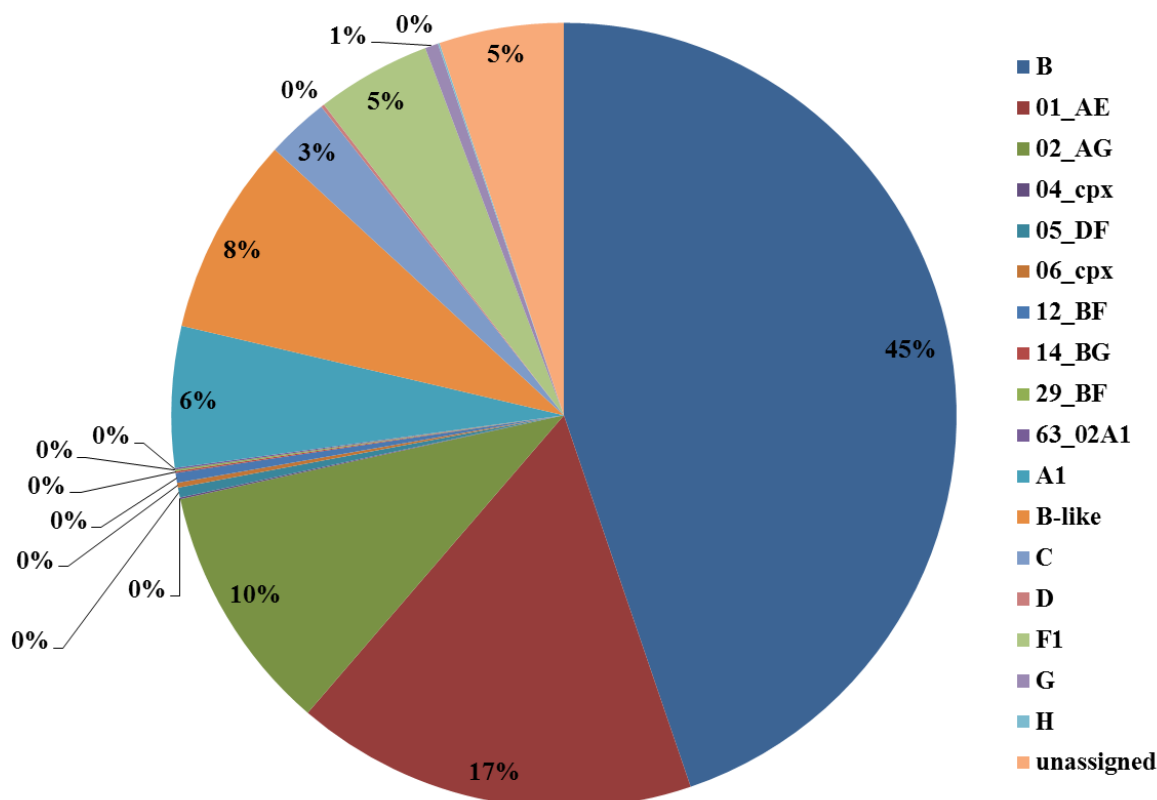
Използването на тези инструменти в последователност от стъпки осигурява висока точност при субтипирането и гарантира правилността на оценката на резултатите. Методологията е приложена към трите основни набора от данни, използвани в настоящето изследване, което позволи да се постигне консистентност и надеждност на получените резултати.

4.1.2. *Резултати от анализа на разпространението на HIV-1 субтип В в България*

Нашето изследване показва, че през 1988 г. в България е диагностициран първият пациент, инфектиран със субтип В на HIV-1 [Alexiev I., 2013]. През първоначалния период на епидемията, вирусният субтип не е бил особено широко разпространен, но от 1996 г. насам, над половината от новорегистрираните случаи на HIV в страната са били свързани със субтип В. Това показва, че от този период именно субтип В започва да доминира в епидемиологичните данни за България.

През 2001 г. 62,5% от всички диагностицирани с HIV в България са били носители на HIV-1 субтип В. Въпреки това, по-късно се наблюдава спад в процента на инфектираните със субтип В, като през 2008 г. той намалява до 20%. Тази промяна може да бъде обяснена с промените в поведението на рисковите групи и разпространението на други субтипове, като и с развитието на превантивни мерки срещу HIV.

През следващия период от 2009 до 2018 г. в България са регистрирани 558 нови случая на HIV-1 инфекция със субтип В, което представлява 48,3% от всички диагностицирани с HIV-1 субтип В за периода 1986-2018 г. в страната. Това подчертава продължаващото значение на субтип В в епидемиологичната картина на България, въпреки конкурентността на други варианти на вируса и новите форми на инфекция, които бяха наблюдавани през изследваните години.



Фиг. 8. Процентно разпределение на HIV-1 субтипове, CRF (класически рекомбинантни форми) и URF (неидентифицирани рекомбинантни форми) в България за периода 1986-2018 г. въз основа на данни от НРПЛ по HIV, НЦЗПБ. В графиката са представени процентните дялове на различните субтипове и рекомбинантни форми, като всяка категория е маркирана с различен цвят, което позволява лесно да се наблюдава промените в разпространението на вирусните форми през времето.

Тази графика не само визуализира резултатите от нашето изследване, но и подчертава тенденцията за увеличаване на рекомбинантни форми и поява на нови вариации на вируса, което е от ключово значение за развитието на стратегии за превенция и лечение на HIV инфекцията в България.

4.1.3. *Филогенетичен трансмисионен анализ на HIV-1 субтип В*

4.1.3.1. *Подравняване на секвенции за филогенетичен анализ*

Предварителната стъпка при изграждането на филогенетично дърво е подравняването на секвенциите, което е от съществено значение за последващия филогенетичен анализ. В рамките на настоящото изследване трите бази данни от HIV-1 субтип В последователности бяха подравнени с помощта на алгоритъма MUSCLE, използвайки био-информационната програма AliView v.1.23. Алгоритъмът MUSCLE е признат за един от най-ефективните методи за многократно подравняване на секвенции и осигурява висока точност при обработка на вирусни изолати, което е от критично значение за правилното интерпретиране на генетичната информация.

Освен автоматизираното подравняване, част от секвенциите преминаха през мануално подравняване, което беше извършено с цел да се осигури допълнителна прецизност в процеса на подравняване на нуклеотидните последователности. Мануалното подравняване е важно, когато автоматичните алгоритми не могат да разрешат специфични несъответствия, особено в области с висока вариабилност в генома на вируса, което е често срещано при HIV-1.

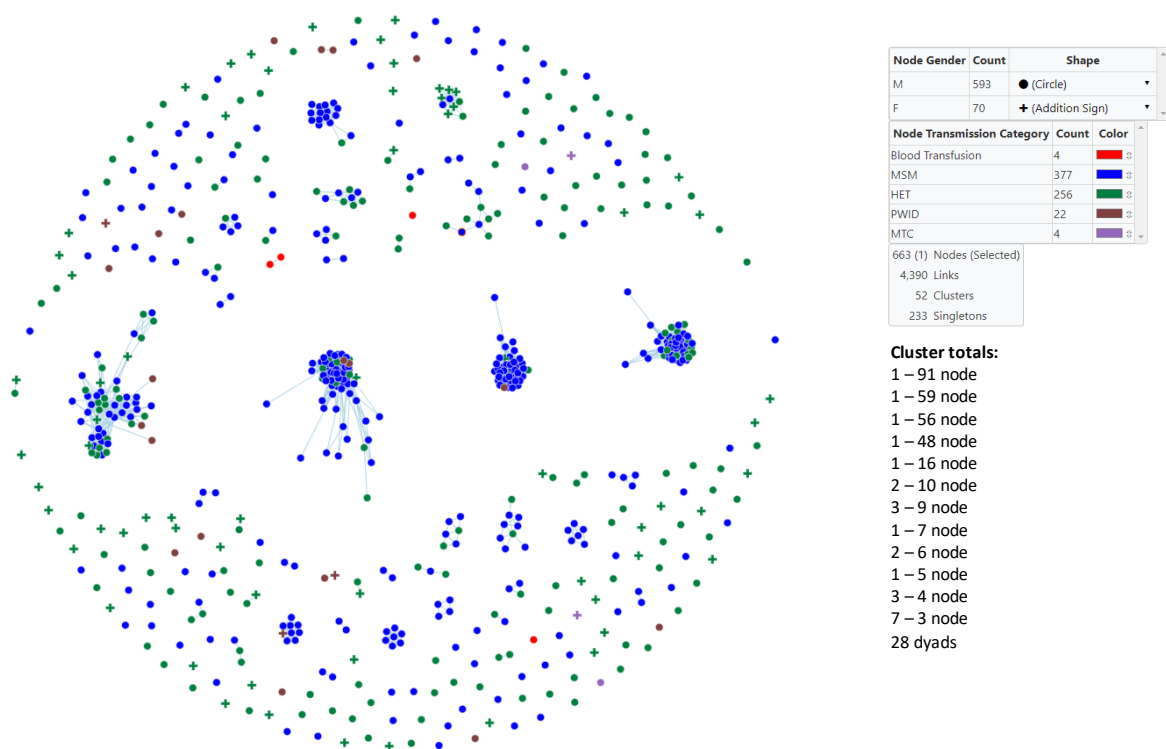
4.1.3.2. *Идентифициране на трансмисионни клъстери на HIV-1 субтип В с MicrobeTrace*

След като секвенциите бяха подравнени беше извършен анализ за идентифициране на трансмисионни клъстери на HIV-1 субтип В с помощта на биоинформационната програма MicrobeTrace. Използваният алгоритъм Tamura-Nei (d) за генетичната дистанция е основополагающ, като той също така съобразява добре известната мутационна скорост на HIV-1. За целите на нашето изследване беше избран праг на генетично разстояние от 1,5%, което е оптимално за анализ на вирусни изолати, съответстващи на настоящата епидемиологична ситуация и позволява ясно разграничаване на трансмисионните клъстери.

Програмата MicrobeTrace графично визуализира трансмисионните клъстери чрез свързване на възли с линии, като всеки възел представлява индивидуална пациентска

секвенция. Линиите между възлите показват генетичната близост и формирането на клъстери. За образуване на клъстер се считат две или повече секвенции, които са свързани помежду си. В нашето изследване открихме 52 трансмисионни клъстери, от които 24 клъстера бяха съставени от 3 или повече последователности, а 28 клъстера бяха двойки секвенции, формирани от близкородствени вируси (фигура 9).

Разпределението на участващите в клъстерите секвенции по пол показва, че 68,8% от анализираните секвенции принадлежат на мъже, а 31,2% на жени. Интересно е да се отбележи, че в три големи клъстера, съдържащи съответно 56, 59 и 91 последователности, основната трансмисионна група беше MSM (мъже, които правят секс с мъже), с проценти 55,4%, 73% и 80% за трите клъстера. Следващата по големина група беше ХЕТ (хетеросексуални), която съставлява 39,3%, 27,1% и 17,6% от съответните клъстери. Групата на УИН (интравенозни наркомани) също беше представена в два от разглежданите клъстери, като интересен резултат е, че в най-малкия клъстер (с 56 секвенции), процентът на УИН беше най-голям – 5,4%, докато в най-големия клъстер процентът на УИН беше само 2,2%.



Фиг. 9. Визуализация на трансмисионните клъстери на HIV-1 субтип В, идентифицирани с помощта на програмата MicrobeTrace при генетично разстояние

от 1,5%. Полът на пациентите е обозначен с кръг за мъже и знак „+“ за жени, а трансмисионната категория е показана чрез различни цветове: червен – кръвопреливане, син – МСМ, зелен – ХЕТ, кафяв – УИН, лилав – МТС. Визуализацията съдържа също общия брой на връзките между секвенциите, броя на клъстерите и единичните секвенции.

4.1.3.3. Разширен анализ на трансмисионни клъстери на HIV-1 субтип В

За по-лесното разглеждане на формираните трансмисионни клъстери беше взето решение те да бъдат условно номерирани. Това не само улесни класифицирането, но и позволи по-ясно разграничаване на тяхната структура и епидемиологична важност. С увеличаването на номерата на клъстерите се наблюдава тенденция за намаляване на тяхната големина, като в по-големите клъстери присъстват повече участващи секвенции, докато по-малките клъстери обикновено съдържат по-малък брой изолати (Таблица 2).

Клъстер 1 е съставен от 91 последователности, като преобладаващата част от тях са мъжки (90,1%), с едва 1 секвенция от жена. В този клъстер се открива широк спектър от трансмисионни групи: 73 мъже са съобщици за предаване на HIV по МСМ път, докато 15 мъже и 1 жена попадат в групата на ХЕТ, а още двама мъже са идентифицирани като УИН. При анализа на този клъстер беше установено, че инфекцията е предавана между трите уязвими групи, като МСМ групата е най-силно засегната. Това подчертава високото значение на МСМ като основен канал на предаване на HIV-1 в България през този период.

Клъстер 2 съдържа 59 последователности, всички от които са изолирани от мъже. В този клъстер 43 мъже съобщават за принадлежност към групата МСМ, докато 16 мъже съобщават за принадлежност към ХЕТ групата. Въз основа на филогенетичния анализ в този клъстер се наблюдава образуването на мост на предаване между групите МСМ и ХЕТ, което предполага, че инфекцията се е предавала по оста МСМ – ХЕТ. Това може да отразява динамиката на предаване в контекста на различни сексуални и социални взаимодействия.

Клъстер 3 включва 56 секвенции, от които 52 са на мъже и 4 на жени. Анализът показва, че в този клъстер 31 мъже принадлежат към групата МСМ, 22 мъже попадат в ХЕТ групата, а 3 мъже са идентифицирани като УИН. Този клъстер представя интересна

трансмисия, която се осъществява чрез тройния път: МСМ → ХЕТ → УИН. Това доказва, че предаването на вируса може да протича по различни пътеки, които включват взаимодействия между основните уязвими групи.

Клъстер 4 включва 48 секвенции, които са съставени от 47 мъже и 1 жена. Този клъстер демонстрира широко представяне на групата МСМ, като 43 от последователностите са от МСМ групата, 4 от ХЕТ и 1 от УИН. Интересно е да се отбележи, че в този клъстер също се установява мост на предаване между МСМ, ХЕТ и УИН. Това потвърждава наличието на мулти-групова трансмисия на вируса, в която различни уязвими категории активно участват в процеса на разпространение на инфекцията.

Клъстер 5 съдържа 16 вирусни нуклеотидни последователности, които са изолирани изцяло от мъже. От тези секвенции 15 мъже принадлежат към МСМ групата, а 1 мъж е от ХЕТ групата. Филогенетичният анализ показва, че вирусът вероятно е предаден от МСМ групата към ХЕТ групата, като се установява директен трансфер между тези две основни трансмисионни категории.

Клъстер 6, съставено от 10 секвенции, представлява изключение сред всички анализирани клъстери, тъй като то е предимно с участието на жени. В този клъстер се открива 6 жени и 4 мъже, като двама от мъжете са съобщили, че са заразени чрез МСМ контакт, докато останалите осем пациенти са инфектирани по ХЕТ път. Това предполага, че в този клъстер инфекцията може да е преминала от ХЕТ към МСМ, което е необичайно, но важно за разширеното разбиране на динамиката на предаването на HIV-1 сред различните гендерни и социални групи.

Клъстери 7, 9, 10, 12, 14 и 15 демонстрират преобладаваща тенденция за предаване по оста МСМ → ХЕТ, като тези клъстери съдържат предимно участници от тези две групи. Това подсказва, че най-голямото разпространение на инфекцията в България е свързано с тези два основни трансмисионни пътя.

Клъстери 8, 11, 13, 16 и 17 установяват още по-широко разпространение на вируса сред МСМ групата. Това допълнително доказва, че МСМ е най-голямата уязвима група и основен канал за предаване на HIV-1 в страната.

4.1.3.4. Триади и Диади на предаване

При анализа на триадите, при генетична отдалеченост от 1,5%, установихме, че има 7 триади, съдържащи общо 21 секвенции, изолирани изцяло от мъже. В тези триади беше установено, че МСМ и ХЕТ трансмисионни категории са представени сравнително равно, което показва, че вирусът активно се предава между тези две уязвими групи по оста ХЕТ – МСМ.

Детайлният анализ на диадите или близкородствени двойки разкри, че те включват 56 пациенти, от които 47 мъже и 9 жени. В тези диади, МСМ и ХЕТ категориите са представени поравно, като също така бяха идентифицирани 5 пациента от УИН групата и 2 пациента, които са били заразени чрез кръвопреливане в ранните години на епидемията, когато контролът върху преливаната кръв е бил по-слаб. Това подчертава важността на старите канали на инфекция, като например кръвопреливането, които все още могат да бъдат значителни в определени региони.

4.1.3.5. Единични въвеждания на вируса

При анализа на единичните секвенции установихме, че има доминиране на пациенти от ХЕТ групата, които представляват 138 изолирани HIV-1 субтип В *pol* секвенции. Групата на МСМ е представена от 79 пациента, докато УИН групата включва 10 секвенции. Забележително е, че в групата на вертикална трансмисия МТС също бяха открити 4 единични случая на инфекция. Интересен резултат беше, че тези случаи не попадаха в образуваните клъстери или близкородствени двойки, което показва, че те остават изолирани от основната трансмисионна мрежа на вируса.

4.1.3.6 Регионално разпределение на единични секвенции

Единичните секвенции показват идентично регионално разпределение, като 4 от 12-те случаи са локализирани в София, а останалите са разпределени в различни региони на страната. Това подчертава важността на географското разпределение и локализацията на епидемиологичните огнища на HIV-1 в България.

Таблица 2. Обща характеристика на 663 HIV-1 *pol* секвенции със субтип В в България за периода 1998-2018 г. при генетично разстояние 1,5%. Представя цялостна картина на демографското и епидемиологично разпространение на вируса в страната.

№ на групиранието	Брой секвенции	Мъже		Жени		МСМ		ХЕТ		УИН		Кръвопреливане		МТС		Страна на произход - България		Страна на произход - чужбина	
		n	(%)	N	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
1	91	90	98,9	1	1,1	73	80,2	16	17,6	2	2,2	0	0	0	0	83	91,2	8	8,8
2	59	59	100	0	0	43	72,9	16	27,1	0	0	0	0	0	0	54	91,5	5	8,5
3	56	52	92,9	4	7,1	31	55,4	22	39,3	3	5,4	0	0	0	0	51	91,1	5	8,9
4	48	47	97,9	1	2,1	43	89,6	4	8,3	1	2,1	0	0	0	0	46	95,8	2	4,2
5	16	16	100	0	0	15	93,8	1	6,3	0	0	0	0	0	0	15	93,8	1	6,3
6	10	4	40	6	60	2	20	8	80	0	0	0	0	0	0	9	90	1	10,0
7	10	9	90	1	10	4	40	6	60	0	0	0	0	0	0	10	100	0	0,0
8	9	8	88,9	1	11,1	8	88,9	0	0	1	11,1	0	0	0	0	9	100	0	0,0
9	9	9	100	0	0	7	77,8	2	22,2	0	0	0	0	0	0	6	66,7	3	33,3
10	9	9	100	0	0	4	44,4	5	55,6	0	0	0	0	0	0	8	88,9	1	11,1
11	7	7	100	0	0	7	100	0	0	0	0	0	0	0	0	7	100	0	0,0
12	6	6	100	0	0	4	66,7	2	33,3	0	0	0	0	0	0	5	83,3	1	16,7
13	6	6	100	0	0	6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	4	66,7	2	33,3
14	5	5	100	0	0	4	80	1	20	0	0	0	0	0	0	5	100	0	0,0
15	4	4	100	0	0	3	75	1	25	0	0	0	0	0	0	4	100	0	0,0
16	4	4	100	0	0	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	3	75	1	25,0
17	4	4	100	0	0	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	3	75	1	25,0
7 триади (общо 21 посл.)		21	100	0	0	12	57,1	9	42,9	0	0	0	0	0	0	18	75	3	14,3
28 диади (общо 56 посл.)		47	83,9	9	16,1	24	42,9	25	44,6	5	8,9	2	3,6	0	0	51	91,1	5	8,9
Единични (общо 233 посл.)		185	79,4	48	20,6	79	33,9	138	59,2	10	4,3	2	0,9	4	1,7	194	83,3	39	16,7
Общ брой		593	89,4	70	10,6	377	56,9	256	38,6	22	3,3	4	0,6	4	0,6	585	88,4	78	11,8

Легенда:

1. Клъстерите с размер по-малък от 3 и единичните секвенции са групирани.
2. Съкращенията са означени както следва: МСМ- мъже, които правят секс с мъже; ХЕТ- хетеросексуални лица; УИН- употребяващи интравенозни наркотици и МТС- вертикална трансмисия от майка на дете (Mother To Child).

4.2. Демографска и епидемиологична характеристика на пациентите, инфектирани с HIV-1 CRF01_AE в България

Вторият набор от данни, включен в настоящия дисертационен труд, обхваща всички лица, диагностицирани в България за периода от 1995 до 2019 година с установен HIV-1 CRF01_AE субтип. За този набор от пациенти бяха използвани данни от 270 пациенти, които попадат в различни трансмисионни категории, като основната засегната група е УИН (употребяващи интравенозни наркотици). За установяване на HIV-1 CRF01_AE субтип беше използвана секвенирана *pol* нуклеотидна последователност на вируса, извлечена от пациентските плазмени проби, събрани и анализирани в НРПЛ по HIV. За успешно секвениране на пациентските проби е необходимо те да имат вирусен товар $\geq 1\,000$ копия/mL, като генерираните секвенции преминават през редица анализи, както е описано по-горе, за да бъде точно определен техният субтип. След успешно секвениране и субтипироване на тези 270 *pol* секвенции, те бяха включени в анализ, проведен с програмата MicrobeTrace, с цел установяване на образуваните трансмисионни клъстери и мостове на предаване на вируса между различните уязвими групи.

4.2.1. Демографски и епидемиологични характеристики

Демографските и епидемиологични характеристики на пациентите с HIV-1 CRF01_AE субтип, диагностицирани в България за периода 1995-2019, бяха анализирани на база данни, събрани чрез попълнени въпросници от самите пациенти. Въпросниците се попълват по време на диагностичния процес и включват въпроси за самооценка на рискови практики и възможности за инфектиране. Обобщените резултати от тези данни са представени в Таблица 3, която показва основните демографски и епидемиологични характеристики на разглежданите пациенти.

Таблица 3. Демографски данни за пациентите с HIV-1 CRF01_AE в България (1995-2019 г.).

Демография	Субтип CRF01_AE	
	брой	(%)
Общ брой	270	100
Пол		
Мъже	187	69,3
Жени	83	30,7
Възраст в години		
≤19	28	10,4
20-29	108	40
30-39	90	33,3
40-49	35	13
≥50	9	3,3
Страна на произход		
България	269	99,6
Друга	1	0,4
Вероятна страна на инфектиране		
България	251	93
Друга	19	7
Регион в България по постоянен адрес		
София	164	60,7
Пещера	20	7,4
Друг	86	31,9
Трансмисионна група		
ХЕТ	101	37,4
МСМ	13	4,8
УИН	141	52,2
Други	15	5,6

Легенда:

ХЕТ- Хетеросексуални лица

МСМ- Мъже, които правят секс с мъже

УИН- употребяващи интравенозни наркотици

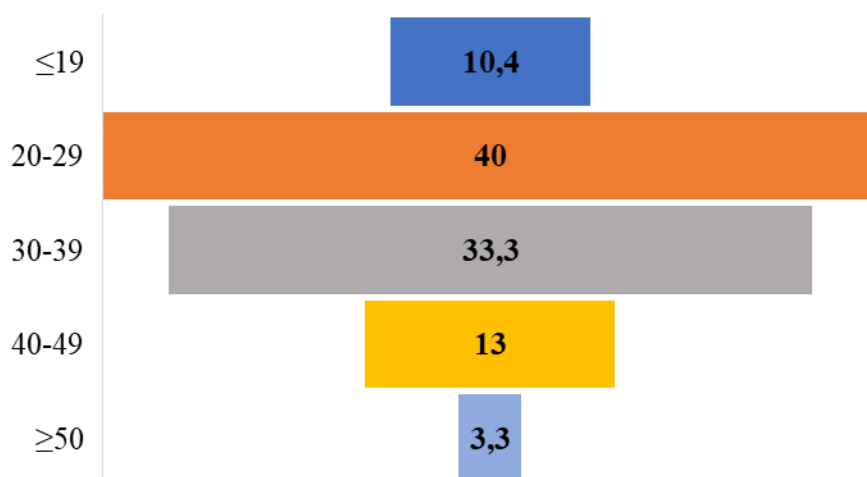
4.2.2. Демографска структура на пациентите

Анализът на данните показва, че първият пациент с HIV-1 CRF01_AE в България е диагностициран през 1995 г. и е хетеросексуален мъж. Четири години по-късно, през 1999 г., е диагностицирано първото новородено, инфектирано по вертикален път с този субтип. През 2002 г., CRF01_AE е въведен в групата на УИН, като това е ключова година за разпространението на този субтип сред рисковите групи в България. През 2009 г.,

седем години след въвеждането на CRF01_AE в групата на УИН, е открито епидемично огнище в София, което включва 26 новодиагностицирани пациенти със субтип CRF01_AE, като 69,2% от тях (18 пациенти) се самоопределят като УИН. След още две години, през 2011 г., е установено ново огнище на вируса, в което са открити 31 пациенти с CRF01_AE, от които 54,8% са от групата на УИН, 38,7% са ХЕТ и 6,5% са МСМ пациенти. Това показва активното разпространение на вируса сред различни уязвими групи, като най-висок е процентът на инфектираните от УИН групата [L. Grigorova, 2021].

4.2.2.1. Възрастова структура на пациентите

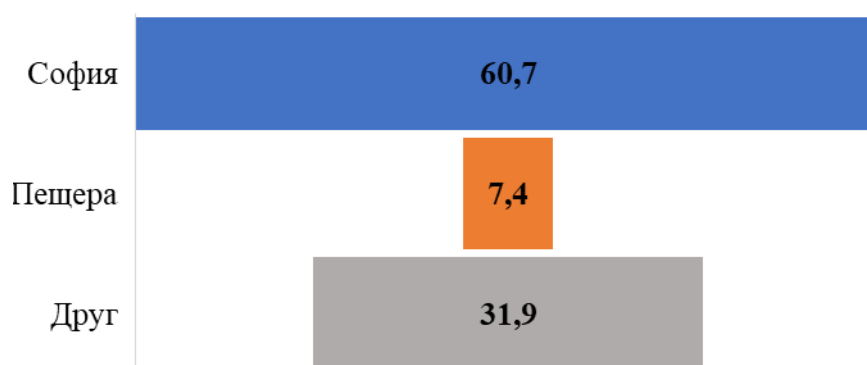
Средната възраст на пациентите при диагностициране е 30 години, като най-голямото разпространение на инфекцията е наблюдавано в групите 20-29 години и 30-39 години, които обхващат общо 73,3% от всички пациенти с HIV-1 CRF01_AE (фигура 10). Най-малко засегната е групата на пациентите на възраст ≥ 50 години, която е представена само с 3,3% от всички случаи. Най-младият пациент, диагностициран с HIV-1 CRF01_AE, е новородено момче, а най-възрастният е 63-годишен хетеросексуален мъж от Силистра.



Фиг. 10. Процентно разпределение по възраст при диагностициране за пациентите с HIV-1 CRF01_AE, включени в настоящия дисертационен труд

4.2.2.2. Географско разпределение

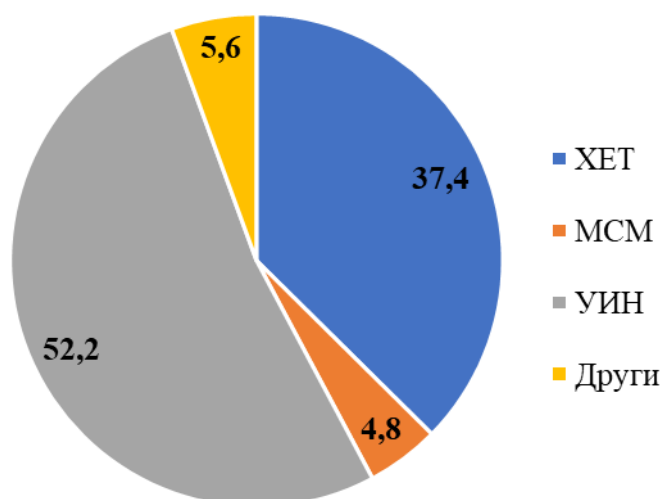
София е най-засегнатият регион, като 60,7% от пациентите с HIV-1 CRF01_AE имат постоянен адрес в столицата. Следващият по големина регион е Пещера, с 7,4% от пациентите (фигура 11). Останалите областни градове са по-слабо представени, като разпределението им не е равномерно. Тези резултати показват, че епидемията е съсредоточена основно в големите урбанизирани райони на България, където е и концентрацията на рискови групи.



Фиг. 11. Процентно разпределение по регион в България по постоянен адрес за пациентите с HIV-1 CRF01_AE, включени в настоящия дисертационен труд

4.2.2.3. Трансмисионни групи

Наблюденията от анализа на трансмисионните групи показват, че УИН е най-засегнатата група сред пациентите с HIV-1 CRF01_AE, като процентът им е 52,2%, което е значително по-високо от процента на инфектираните с други субтипове. Групата на ХЕТ е със сходен процент на разпространение като при не-CRF01_AE инфекции, съставлявайки 37,4% от случаите, докато МСМ са най-малко засегнати с 4,8% от всички пациенти (фигура 12).



Фиг. 12. Процентно разпределение по трансмисионна категория за пациентите с HIV-1 CRF01_AE, включени в настоящия дисертационен труд

Този анализ показва, че HIV-1 CRF01_AE субтипът има различна епидемиологична характеристика в България в сравнение с други HIV-1 субтипове. Разпространението на този субтип е силно свързано с групата на употребяващите интравенозни наркотици (УИН), като най-голямото разпространение е наблюдавано в големите градове, като София. Това подчертава необходимостта от специфични интервенции, насочени към най-засегнатите групи в контекста на епидемията.

4.2.3. Филогенетичен трансмисионен анализ на HIV-1 CRF01_AE

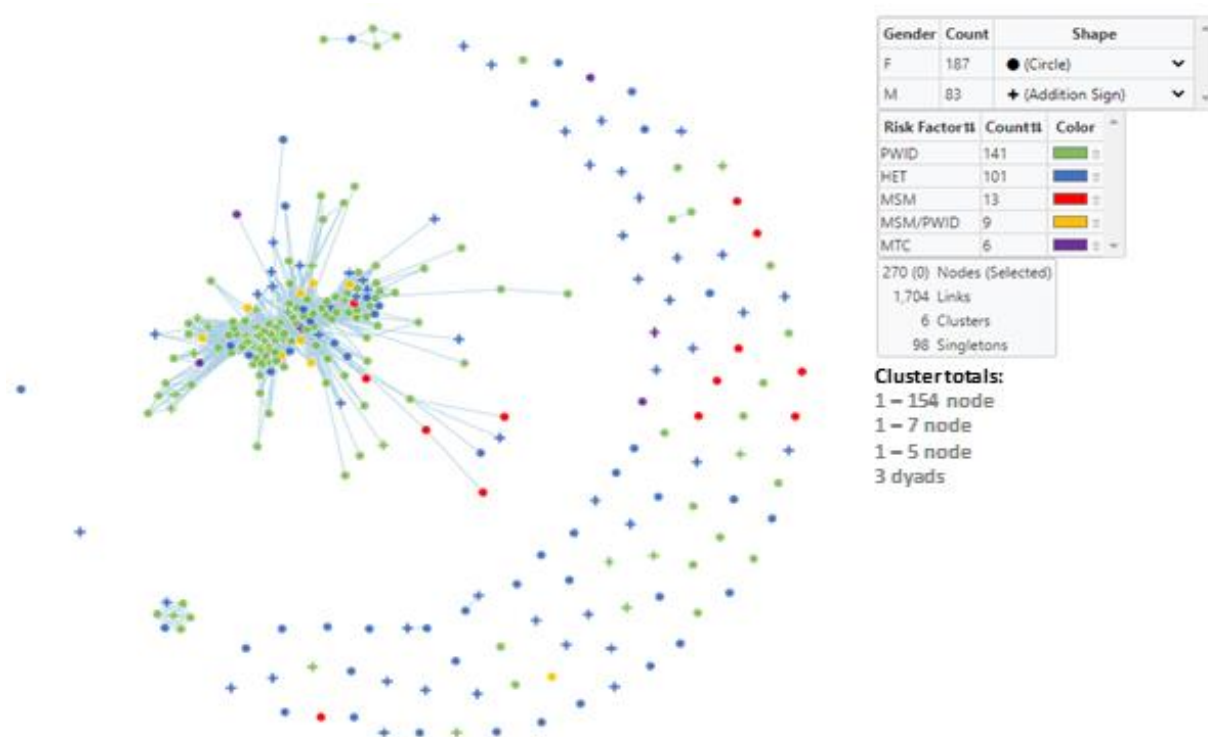
4.2.3.1. Идентифициране на трансмисионни клъстери на HIV-1 CRF01_AE с MicrobeTrace

В настоящото изследване за идентифициране на образуваните трансмисионни клъстери на HIV-1 CRF01_AE беше използвана интернет-базираната програма MicrobeTrace. За изготвянето на филогенетичния анализ беше избран праг на генетично разстояние от 1,5% и използван алгоритъмът Tamura-Nei (d), с помощта на който бяха идентифицирани и визуализирани трансмисионните клъстери (фигура 13). Този подход позволи точно да се картографират филогенетичните връзки между вирусни изолати и да се разкрие потенциалът за предаване на HIV-1 в различни уязвими групи.

4.2.3.2. Резултати от анализа с MicrobeTrace

При анализа на получените данни с MicrobeTrace беше установено, че в изследваното население са идентифицирани 6 клъстера, включващи три по-големи трансмисионни клъстера, съставени от 5 или повече последователности, и три близкородствени двойки вируси (фигура 13). Останалите 98 секвенции, не свързани с други, бяха класифицирани като единични въвеждания на вируса, което подсказва за индивидуални случаи на инфектиране, които не образуват клъстерни групи.

От общия брой участници в трансмисионните клъстери, 130 (75,6%) са мъже, а 42 (24,4%) са жени. Основната трансмисионна категория в клъстерите е групата на УИН, която включва 119 (69,2%) от всички последователности, следвани от ХЕТ с 37 (21,5%) последователности. Групите на МСМ и други уязвими групи имат значително по-малко представяне, което отразява тяхната по-малка тежест в разпространението на HIV-1 CRF01_AE в България.



Фиг. 13. Визуализация на MicrobeTrace клъстери в HIV-1 CRF01_AE в България. При анализ с използване на генетично отстояние 1,5% бяха идентифицирани 6 клъстера.

Полът се обозначава с знак плюс „+“ (мъже) и кръг (жени). Трансмисионната категория се отбелязва с цвят: зелен- лица, употребяващи инжекционни наркотици (УИН); син- хетеросексуални (ХЕТ); червен- мъже, които правят секс с мъже (МСМ); жълт- МСМ+УИН; лилав- вертикална трансмисия от майка на дете (МТС) Упоменати са общия брой връзките между секвенциите, броя кълстери и единични секвенции.

4.2.3.3. Анализ на трансмисионни кълстери

Клъстер 1 е най-големият и съдържа 154 последователности, от които 116 (75,3%) са мъже, а 38 (24,7%) са жени. В този клъстер преобладава УИН групата, която съставлява 70,1% от секвенциите, последвана от ХЕТ (19,5%) и МСМ (3,2%). Интересен резултат в този клъстер е, че в него попадат и 3 новородени, инфектирани по вертикален път от майка към дете. 92,9% от участниците в този клъстер съобщават за инфектиране в пределите на Република България, а 7,1% посочват чужбина като вероятна страна на инфектиране. Това показва, че CRF01_AE е широко разпространен в България, особено сред уязвимите групи.

Клъстер 2 е значително по-малък, състоящ се от 7 секвенции. Пет от тях принадлежат на УИН мъже, а останалите две са на ХЕТ жени. В този клъстер беше открит мост на предаване по оста УИН → ХЕТ, което показва възможността за трансфер на вируса между тези две уязвими групи. Интересно е, че един от пациентите съобщава за инфектиране в чужбина, което предполага, че вирусът може да е бил пренесен в България.

Клъстер 3 съдържа 5 секвенции, всички от които са на мъже. Четири от тези мъже принадлежат към УИН групата, а един към ХЕТ. Въпреки малкия размер на клъстера, беше установено предаване на вируса по оста УИН → ХЕТ, което предполага, че вирусът преминава между тези две трансмисионни категории.

Кълстери 4, 5 и 6 са диади (близкородствени двойки), съставени от вирусни изолати, които също показват предаване между УИН и ХЕТ групите, като допълнително потвърждават образуването на мостове на предаване на HIV-1 между тези категории.

4.2.3.4. Единични въвеждания на вируса

При анализа на единичните въвеждания на вируса установихме сравнително равномерно разпределение по пол, като 65,3% от тези случаи са на ХЕТ пациенти и 22,4% на УИН пациенти. Въпреки това, единичните секвенции показват интересни наблюдения, като включват 3 новородени, които обаче не образуват близкородствени двойки със своите родители, което предполага, че тези случаи са независими и не са част от съществуващите клъстери или трансмисионни мрежи.

Таблица 4. Обща характеристика на всички 270 HIV-1 *pol* секвенции CRF01_AE в България за периода 1995-2019 г.

№ на клъстер	Брой секвенции	Мъже		Жени		МСМ		ХЕТ		УИН		МТС		Страна на произход - България		Страна на произход - чужбина	
		п	(%)	п	(%)	п	(%)	п	(%)	п	(%)	п	(%)	п	(%)	п	(%)
1	154	116	75	38	25	5	3,2	30	19,5	108	70,1	3	1,9	143	92,9	11	7,1
2	7	5	71	2	29	0	0	2	28,6	5	71,4	0	0	6	85,7	1	14,3
3	5	5	100	0	0	0	0	1	20	4	80	0	0	5	100	0	0
3 диади (общо 6 секвенции)		4	67	2	33	0	0	4	66,7	2	33,3	0	0	5	83,3	1	16,7
Единични (общо 98 секвенции)		57	58	41	42	1	1	64	65,3	22	22,4	3	3,1	92	93,9	6	6,1
Общ брой	270	187	69	83	31	9	3,3	101	37,4	141	52,2	6	2,2	251	93	19	7

Легенда:

1. Клъстерите с размер по-малък от 3 и единичните секвенции са групирани.
2. Съкращенията са, означени както следва: МСМ- мъже, които правят секс с мъже; ХЕТ- хетеросексуални лица; УИН- употребяващи интравенозни наркотици и МТС- вертикална трансмисия от майка на дете (Mother To Child).

Анализът на генетичните данни с MicrobeTrace показва ясно формирането на трансмисионни клъстери сред HIV-1 CRF01_AE пациентите в България. Въпреки че основната трансмисионна група е УИН, вирусът активно циркулира и между ХЕТ и МСМ групите. Това демонстрира сложността и динамиката на епидемията в България и необходимостта от целенасочени превантивни мерки за различните рискови групи.

4.3. Демографска и епидемиологична характеристика на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 в България (2012 - 2020 г.)

Третият набор от данни, който е включен в настоящия дисертационен труд, обхваща периода от 2012 до 2020 г., като в проучването са включени само пациенти, диагностицирани с HIV-1, които отговарят на критерия наивност към АРТ. Наивността се дефинира като липса на предходно лечение с антиретровирусни лекарства, което е критично за изследването на епидемиологията на новите случаи на инфекция. Това изследване обхваща 1053 наивни пациента, диагностицирани в България през този период и включва генерирани HIV-1 *pol* секвенции, които са събрани от петте инфекциозни отделения в страната, в които функционират сектори за лечение на HIV. Използваните плазмени проби са от пациенти, живеещи в различни географски региони на страната и обхващат всички трансмисионни категории, включително MSM, ХЕТ и УИН.

За да бъдат включени в изследването, пациентите трябва да имат вирусен товар $\geq 1\ 000$ копия/mL, което е минималният праг за успешно секвениране в НРПЛ по HIV. Получените секвенции преминаха през серия от интернет-базирани инструменти и мануален анализ, за да бъде успешно определен техният субтип. След като беше уточнен субтипът на всяка от изследваните секвенции, бяха построени филогенетични дървета, с които бяха дефинирани образуваните трансмисионни клъстери и възможни мостове на предаване на инфекцията между различните уязвими групи. Тези филогенетични структури ни позволиха да проследим еволюцията на HIV-1 инфекцията в България и да разкрием как различните социални и поведенчески фактори влияят на разпространението на вируса.

4.3.1. Демографски и епидемиологични данни

Демографските и епидемиологични характеристики на 1053 наивни пациенти, диагностицирани с HIV-1 в България за периода 2012-2020 г., бяха анализирани въз основа на данни, предоставени от самите пациенти. Всеки пациент попълва въпросник по време на диагностичния процес, който има за цел да идентифицира рискови практики и да помогне за самоопределянето на пациента към съответната уязвима група. Данните от въпросниците бяха използвани за категоризиране на пациентите по пол, възраст, трансмисионна група и вероятна страна на инфектиране. Таблица 5 показва обобщените данни за тези пациенти и предоставя информация относно техния пол, възраст при диагностициране, страна на произход, вероятна страна на инфектиране, регион по постоянен адрес в България и трансмисионна група.

Таблица 5. Демографски данни за наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 в България за периода 2012-2020 г.

Демография	Диагностицирани с HIV-1 в България за периода 2012-2020 година	
	брой	(%)
Общ брой	1053	100
Пол		
Мъже	905	85,9
Жени	148	14,1
Възраст в години		
≤19	25	2,4
20-29	345	32,8
30-39	418	39,7
40-49	182	17,3
≥50	83	7,9
Страна на произход		
България	851	80,8
друга	202	19,2
Вероятна страна на инфектиране		
България	870	82,6
друга	183	17,4
Регион в България по постоянен адрес		
София	514	48,8
Пловдив	113	10,7
Варна	46	4,4
Пазарджик	40	3,8
Друг	340	32,3
Трансмисионна група		
ХЕТ	401	38,1
МСМ	534	50,7
УИН	101	9,6
МСМ+УИН	17	1,6

Легенда:

ХЕТ - Хетеросексуални лица

МСМ - Мъже, които правят секс с мъже

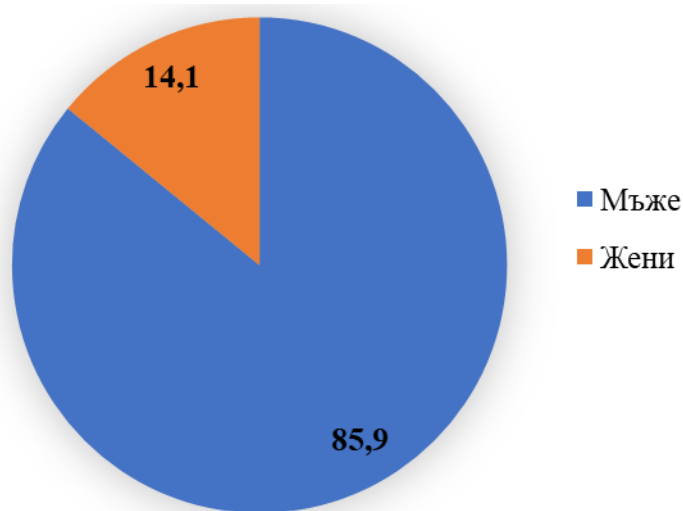
УИН - Употребяващи интравенозни наркотици

МСМ+УИН - Лица попадащи в две трансмисивни групи, а именно мъже, които правят секс с мъже и употребяващи интравенозни наркотици

В настоящото проучване са включени 1053 пациента, при които инфекцията е установена в периода 2012-2020 г. Тези пациенти отговарят на критерия наивност към антиретровирусна терапия, което означава, че нито един от тях не е получавал предходно

лечение с антиретровирусни лекарства. За всички включени пациенти са събрани HIV-1 *pol* секвенции, които преминават през серия от генетични и филогенетични анализи, с цел точно определяне на субтипа на вируса и анализ на възможните трансмисионни клъстери. Събрани са данни от петте основни инфекциозни отделения в страната, които извършват диагностика и лечение на HIV, като пациентите идват от различни географски региони на България.

Първият демографски критерий, по който пациентите бяха разделени, е пол. Резултатите показват доминиране на мъжкия пол, като мъжете съставляват 905 пациенти (85,9%), докато жените са 148 пациенти (14,1%) (фигура 14). Тези резултати съответстват на глобалната тенденция, при която мъжете, особено в рискови групи като MSM, са по-често засегнати от HIV инфекция.

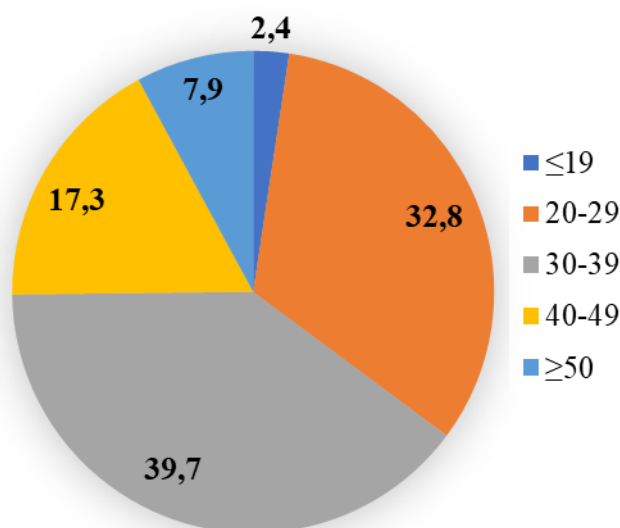


Фиг. 14. Процентно разпределение по пол на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 г. в България

Възрастовото разпределение на участниците показва, че възрастта на пациентите варира между 13 и 78 години, като средната възраст на всички наивни пациенти е 34,4 години. Относително малка част от пациентите са на възраст ≤ 19 години, само 25 (2,4%) от всички пациенти попадат в тази възрастова група (фигура 15). Не се наблюдават новородени пациенти, диагностицирани с инфекция по вертикален път, което показва ефективността на превенцията на вертикалната трансмисия в страната.

Най-често засегнатите възрастови групи са 20-29 години (32,8%) и 30-39 години (39,7%). Това е очаквано, тъй като тези възрастови групи попадат в периода на полова зрялост и активно социално поведение, което води до по-голям риск от сексуално предаване на вируса. Общо 72,5% от всички наивни пациенти диагностицирани с HIV-1

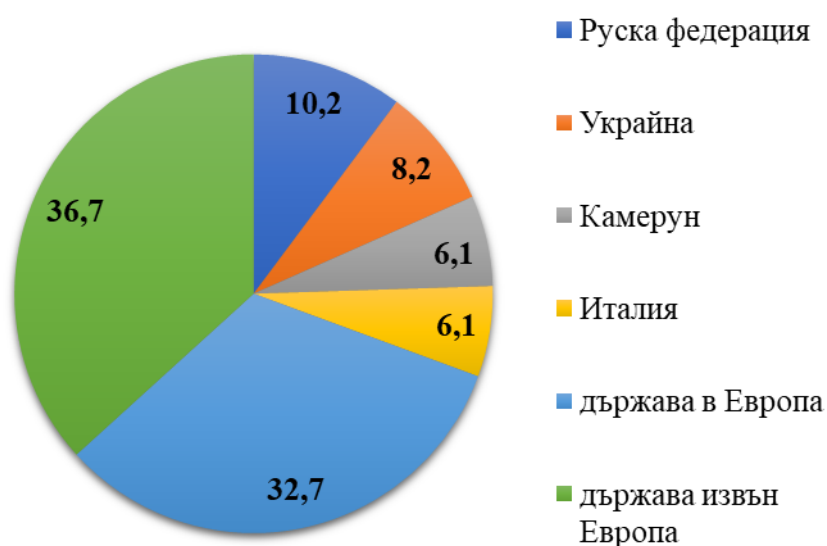
в България за периода 2012-2020 г. са на възраст между 20 и 39 години, което показва, че това е основната възрастова група, подложена на инфектиране. Възрастовите групи 40-49 години и ≥ 50 години са представени в по-нисък процент – 17,3% и 7,9% съответно, което е логично предвид по-ниската сексуална активност и рискови практики в тези възрастови категории.



Фиг. 15. Процентно разпределение по възраст на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 г. в България

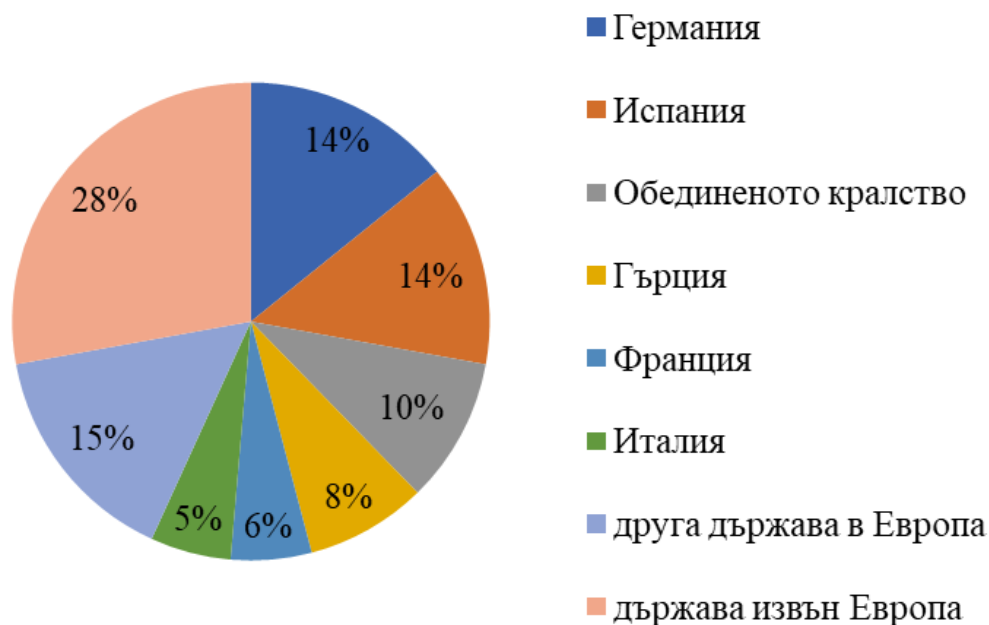
4.3.2. Епидемиологични данни за произход и вероятна страна на инфектиране

Епидемиологичните данни показват, че 80,8% от всички регистрирани пациенти в България за периода 2012-2020 г. са граждани на Република България, а 19,2% са чуждестранни граждани, които са диагностицирани в България. Това подчертава международния характер на HIV епидемията и важността на миграцията и мобилността на населението. Сред чуждестранните граждани са диагностицирани 5 пациента от Руската федерация, 4 от Украйна, 3 от Камерун и 3 от Италия, като останалите страни са по-слабо представени (фигура 16).



Фиг. 16. Процентно разпределение на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 г. в България, които са чуждестранни граждани

Инфектирали се в България са 82,6% от пациентите, докато 17,4% са се заразили в чужбина. Изключително важно е да се отбележи, че 132 (72,1%) от 183 наивни пациенти, които съобщават, че инфекцията е придобита извън България (фигура 17), посочват, че са се инфектирали в Европа. Най-често инфекцията е осъществена в Германия (14,2%) и Испания (13,7%), следвани от Обединеното кралство (9,8%), Гърция (8,2%), Франция и Италия (по 5,5% от случаите). Това потвърждава тенденцията за предаване на HIV-1 в рамките на Европа, като тези страни се явяват основни източници на инфекцията за България.



Фиг. 17. Процентно разпределение на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 г. в България, които съобщават за инфектиране в държава, различна от България

В допълнение, пациентите от страни извън Европа също са добре представени, но в значително по-малка степен. Например, Съединените американски щати (3,3%), Руската федерация (2,7%) и Турция (2,2%) са основните страни извън Европа, откъдето идват инфектираните пациенти. Рядко срещани са пациенти от страни като Камерун, Кот д'Ивоар, Китай, Австралия, Израел и други, което показва, че разпространението на вируса е най-силно концентрирано в Европа, като миграционните потоци от тези региони играят важна роля за разпространението на HIV.

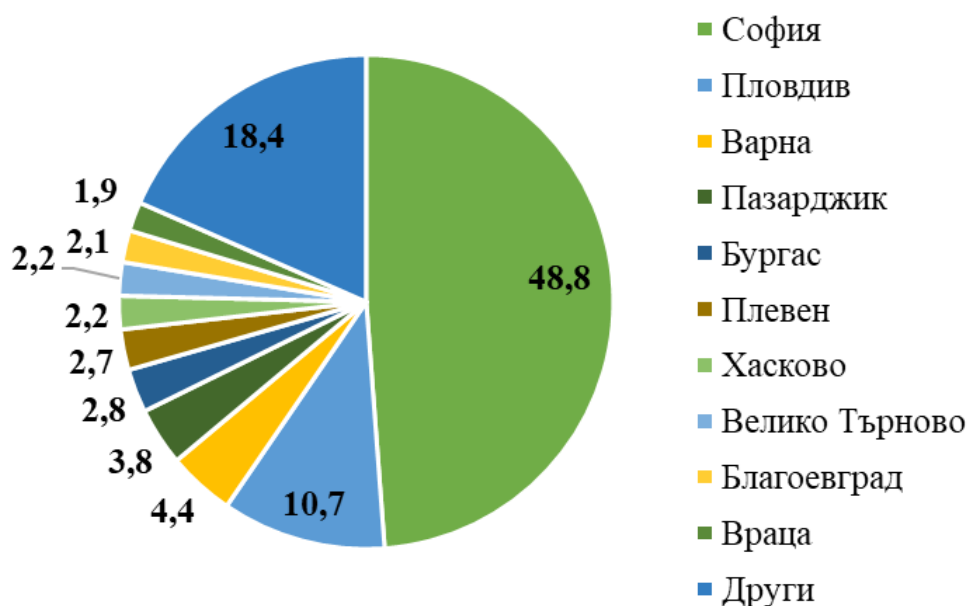
4.3.3. Географско разпределение на наивните пациенти

Географският анализ показва, че София е най-силно засегнатият регион в България, с 514 пациента (48,8%), което е почти половината от всички диагностицирани случаи през разглеждания период (фигура 18). Това потвърждава, че столицата е основният фокус на разпространението на HIV-1 в страната, вероятно поради концентрацията на мигранти, туристи и по-добрата достъпност до здравни услуги. Следващият по големина регион е Пловдив с 113 пациента (10,7%), като разликата със София е почти 40%. Останалите региони на страната имат по-нисък процент на

диагностицирани пациенти, като те формират 40,5% от всички наивни инфекции за периода 2012-2020 г. Възможно е разпространението на инфекцията в по-малките региони да бъде повлияно от по-ниската мобилност и по-малкото миграционни потоци.

Най-слабо разпространение на HIV-1 инфекцията се наблюдава в райони като Добрич, Габрово, Разград, Шумен и Кърджали, където диагностицираните пациенти съставляват малка част от общия брой (само 4,1%). Това показва, че разпространението на HIV-1 в България не е равномерно, а е концентрирано в определени географски региони, което може да бъде свързано както с социално-икономическите фактори, така и с миграционните тенденции и нивото на общественото здраве в различните области на страната.

Проучването показва, че HIV-1 инфекцията в България е силно концентрирана в мъжката популация и в активната възрастова група между 20-39 години, като тези пациенти представляват 72,5% от всички диагностицирани случаи. Миграцията и международните мобилни потоци играят важна роля в разпространението на инфекцията, като основните източници на инфектиране са Европейските държави, а по-малко значими са страни извън Европа. Столицата София е основният регион с висока концентрация на новодиагностицирани случаи, докато малките региони на страната показват по-ниска заболяемост. Тези резултати подчертават нуждата от таргетирани здравни интервенции и превантивни мерки, насочени към рисковите групи, особено в урбанизираните и миграционно активни райони.



Фиг. 18. Процентно разпределение на наивните пациенти, диагностицирани с HIV-1 за периода 2012-2020 г. в България според регион в страната по постоянен адрес.

В рамките на проведеното изследване на географското разпределение на пациентите, диагностицирани с HIV-1 в България за периода 2012-2020 г., установихме значителни разлики в разпространението на инфекцията по региони. Проучването показва, че почти половината от всички случаи на HIV-1 инфекция през този период са диагностицирани в региона на столицата София, като 514 пациента (48,8%) са от този регион. Това представлява почти половината от всички ново диагностицирани случаи на HIV-1 в страната, което подчертава концентрацията на заразените в най-големия урбанизиран и икономически активен район на България. Разликата със следващия най-силно засегнат регион – Пловдив, който съставлява 113 пациента (10,7%), е значителна и възлиза на почти 40% от общия брой на случаите, диагностицирани в страната през разглеждания период.

Тези данни подчертават, че инфекцията е по-силно разпространена в големите градове, което може да бъде свързано с фактори, като висока мобилност на населението, по-добър достъп до здравни услуги и по-голямо социално взаимодействие, които увеличават шансовете за предаване на вируса. В същото време по-малките региони на България показват по-ниски нива на инфектираност, като в тези области случаите на HIV-1 инфекция са значително по-малко. Общо, регионите извън София и Пловдив представляват 40,5% от всички диагностицирани случаи в страната през периода 2012-2020 г. Това означава, че разпространението на HIV-1 в тези райони е много по-малко изразено, което може да се дължи на фактори като по-ниска социална мобилност, по-малка концентрация на рискови групи и по-малък достъп до специализирана медицинска помощ.

Някои от регионите в България, които са по-слабо засегнати от HIV-1 инфекцията, включват Варна с 46 пациента (4,4%), Пазарджик с 40 пациента (3,8%), Бургас с 30 пациента (2,8%), Плевен с 28 пациента (2,7%), както и по-малки проценти за Хасково и Велико Търново, където се наблюдават по 23 пациента (2,2%) във всяко от тези региони.

Сред по-слабо засегнатите региони наблюдаваме Благоевград с 22 пациента (2,1%), Враца с 1,9%, както и райони като Русе, Стара Загора, Перник, Видин, Кюстендил, Монтана, Ловеч, Сливен, Ямбол и Смолян, които имат под 20 диагностицирани наивни пациенти за целия период. Тези региони представляват общо 14,3% от всички диагностицирани пациенти с HIV-1 в страната, което показва, че те са втора категория в разпространението на инфекцията.

Най-малко инфектирани пациенти с HIV-1 са диагностицирани в Добрич, Габрово, Разград, Шумен, Кърджали, Силистра, Търговище и Пещера. Тези райони формират само 4,1% от всички диагностицирани случаи в страната за периода 2012-2020 г. Това по-слабо разпространение може да се обясни с по-ниската мобилност на населението, по-малката концентрация на рискови групи и възможно по-малък достъп до здравни услуги в тези по-малко урбанизирани и по-слабо развити региони.

Анализът на географското разпределение на HIV-1 инфекцията в България показва ясно, че инфекцията е силно концентрирана в големите урбанизирани региони като София, с важен фактор като мобилността на населението и достъпа до здравни услуги, играещи важна роля в разпространението на вируса. Въпреки това и в по-малките региони на страната е налице HIV-1 инфекция, като броят на диагностицираните случаи остава значителен в тези райони, макар и с по-ниски стойности. Разпределението на случаите показва нуждата от таргетирани превантивни мерки и усилия за повишаване на информираността сред населението, особено в най-засегнатите и слабо засегнатите региони на страната.

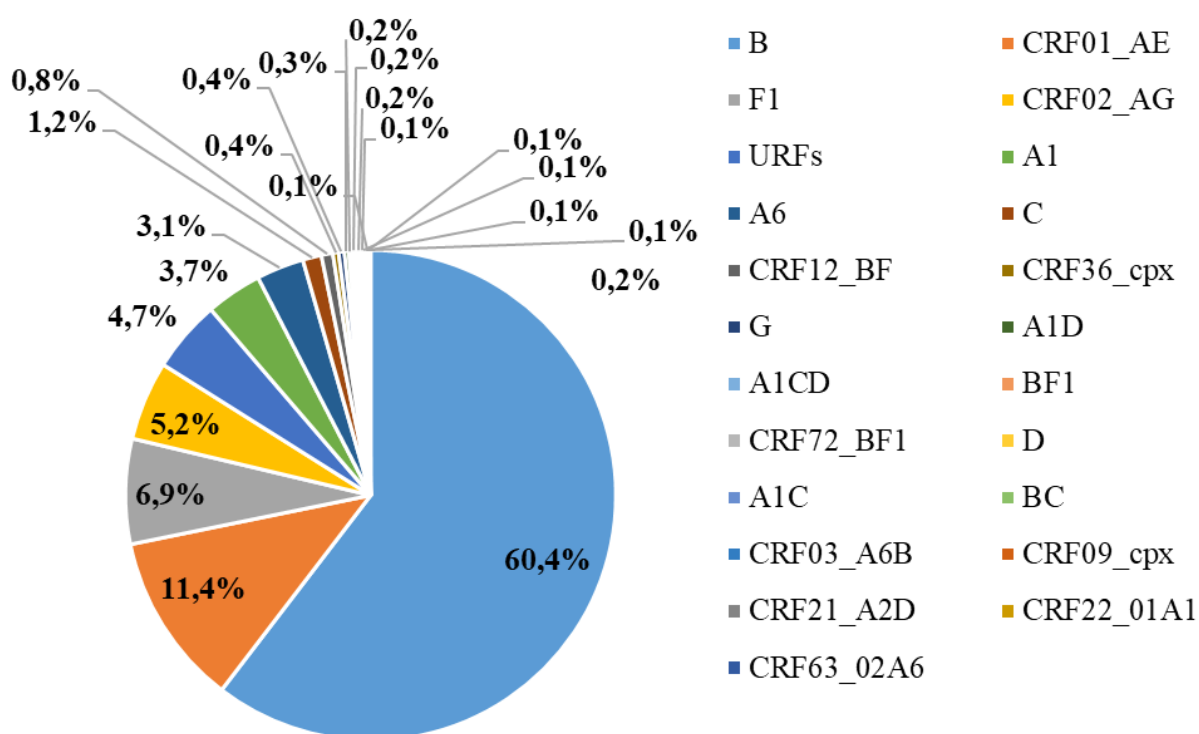
4.3.4. Субтипирание и рекомбинантен анализ с Интернет базирани инструменти

Изолираните 1053 секвенции на HIV-1 бяха подложени на процес на субтипирание с помощта на различни интернет базирани инструменти. Това е една от основните стъпки в предварителния анализ на генетичните данни, тъй като тези инструменти притежават значителен капацитет за обработка на големи обеми от данни. Използването на такива платформи позволява бързо и ефективно получаване на достоверна информация относно субтипа на вируса и наличието на генетични мутации във всяка отделна секвенция, което е ключово за последващия анализ и интерпретация на резултатите.

Същевременно, субтипирането и рекомбинантният анализ на секвенциите бяха извършени чрез по-горе описаните методи и последователности. Тези анализи позволиха разделянето на диагностицираните наивни пациенти на две основни групи – инфектирани с HIV-1 субтип В и инфектирани с други субтипове и рекомбинантни форми на HIV-1 вируса. Това разделение беше от съществено значение поради различията в доминиращите трансмисивни категории между субтип В и останалите

генетични форми на вируса, което е от ключово значение за разбирането на епидемиологичните тенденции и рисковите групи за разпространение на инфекцията.

При извършването на анализа на субтипите на всички 1053 генерирани секвенции от диагностицирани наивни HIV-1 пациенти за периода 2012-2020 г., установихме, че най-широко разпространеният субтип в България е субтип В, като процентът на инфектираните с този субтип е 60,4% (фигура 19). Следващите по разпространение субтипове са CRF01_AE с 11,4%, F1 с 6,9% и CRF02_AG с 5,2%. Останалите субтипове и рекомбинантни форми на HIV-1 вируса са с по-ниски стойности, като не преминават границата от 5%. Тези резултати ясно показват доминирането на субтип В в страната и неговото преобладаващо разпространение сред новите инфекции.



Фиг. 19. Процентно разпределение на HIV-1 субтипове, CRF и URFs в България за периода 2012-2020 г. при наивни пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV, НЦЗПБ. С цветове са маркирани различните субтипове и рекомбинантни форми, добавено е и процентното им разпределение

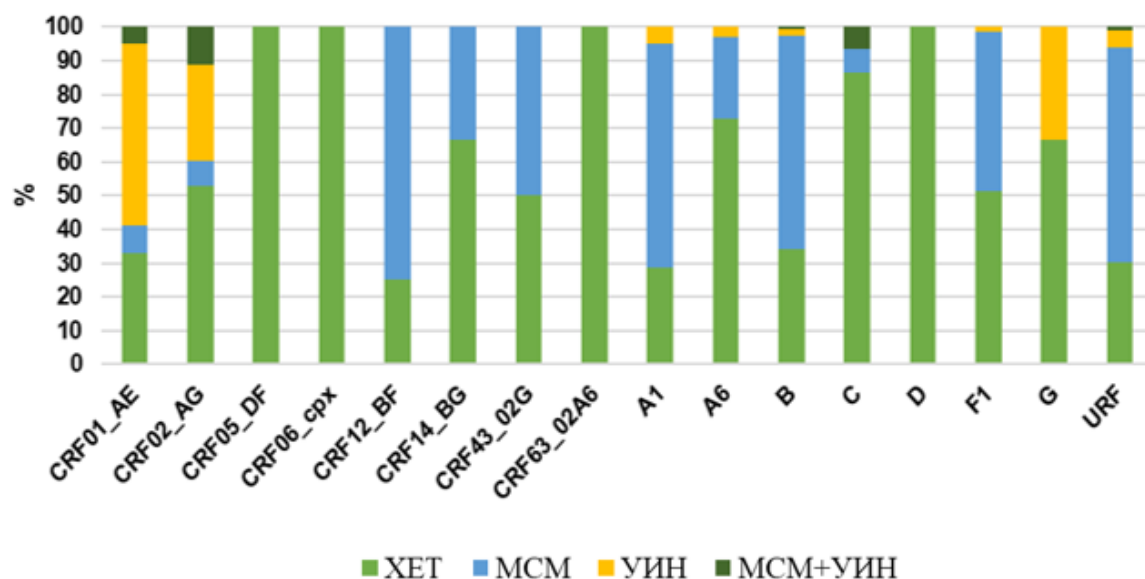
4.3.5. Анализ на трансмисионните категории в различните субтипове

При анализа на трансмисивните категории в различните субтипове (фигура 20) установихме, че субтип В е доминиран от трансмисивната категория на МСМ. Разпределението на трансмисионните категории в субтип В е както следва: МСМ – 63,4%, ХЕТ – 34,1%, УИН – 2% и МСМ+УИН – 0,5%. Това подчертава, че МСМ представляват основната рискова група за разпространението на субтип В в България, което съответства с международните тенденции, при които тази група е основно засегната от HIV инфекцията.

Що се отнася до CRF01_AE, трансмисивната категория на УИН доминира с 53,8%, следвани от ХЕТ с 32,8%, МСМ с 8,4% и МСМ+УИН с 5%. Това разпределение показва, че УИН е основната рискова категория за този рекомбинантен вирус, като също така демонстрира разликите в епидемиологичната картина за различните генетични форми на HIV-1.

При субтип F1 наблюдаваме сравнително равномерно разпределение между МСМ (47,3%) и ХЕТ (51,4%), като процентът на МСМ+УИН е сравнително малък – 1,3%. Това може да бъде обяснено с различия в социалните и поведенчески модели в различните трансмисивни групи в страната.

Последният разглеждан субтип, CRF02_AG, е доминиран от ХЕТ (52,8%), последвани от УИН (28,3%), МСМ (7,6%) и МСМ+УИН (11,3%). Това разпределение показва, че ХЕТ играят по-голяма роля в разпространението на вируса, което може да бъде свързано с конкретни локални социални и поведенчески фактори.



Фиг. 20. Процентно разпределение по трансмисионна категория във HIV-1 субтипове, CRFs и URFs в България за периода 2012-2020 г. при наивни пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV, НЦЗПБ

4.3.5.1. Преобладаване на трансмисионната категория MCM в рекомбинантни форми

Наблюдавахме преобладаване на инфектирани MCM във всички рекомбинантни форми на субтип В, което доказва бързото разпространение на субтип В в тази уязвима група. Тази тенденция е важен индикатор за необходимостта от целеви здравни интервенции, насочени към MCM за ограничаване на разпространението на HIV-1.

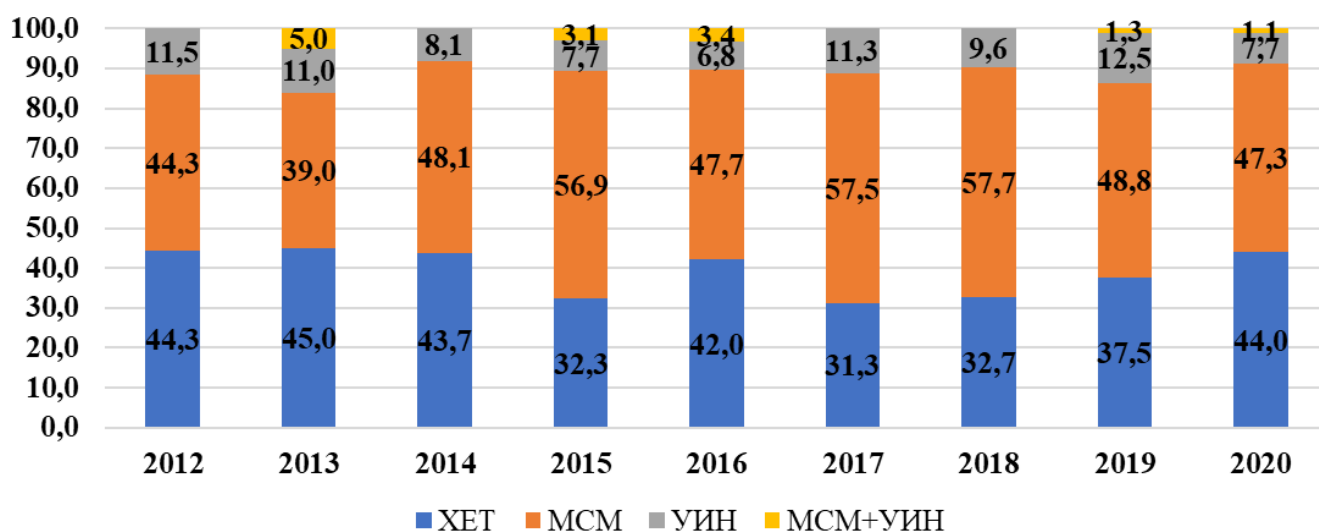
4.3.6. Анализ на трансмисионните категории по години

Извършихме анализ по години на разпределението на трансмисионните категории (фигура 21), като установихме, че процентният дял на диагностицираните наивни MCM през целия период на проучването е сравнително постоянен – средно 49,7% от всички диагностицирани пациенти. Въпреки това, наблюдаваме понижение на процентът на диагностицираните MCM през 2013 г., което съвпада с началните години на изследвания

период, когато стигмата и социалната дискриминация в България са били сериозни препятствия за диагностика и лечение на HIV инфекция.

Наблюдаваме три пика на инфектирани МСМ през 2015 г. с 56,9%, както и през 2017 и 2018 година с 57,5% и 57,7% съответно. Това показва стабилно увеличение на новите случаи в тези години, като се предполага, че социалната осведоменост и усилията за премахване на стигмата относно HIV инфекцията в България са изиграли роля за увеличаване на диагностицирането и лечението на тази група.

Следващата по големина е трансмисионна категория е ХЕТ, като техният среден процент през целия период е 39,2%. Процентното разпределение на ХЕТ е близко до това на МСМ, като в годините с пикове при МСМ, наблюдаваме спадове на ХЕТ и обратно. Средният процент на диагностицирани УИН за периода 2012-2020 г. е 9,6%, а на МСМ+УИН е 1,6%.



Фиг. 21. Разпределение на трансмисионните категории по години в България за периода 2012-2020 г. при HIV-1 наивни пациенти, диагностицирани в НРПЛ по HIV, НЦЗПБ.

Проведеният анализ на субтипове и рекомбинантни форми на HIV-1 в България показва ясно доминиране на субтип В, като този субтип е основно разпространен сред МСМ трансмисивната категория. По този начин целевите здравни интервенции за намаляване на HIV инфекцията трябва да се фокусират върху тази уязвима група, като се обърне внимание и на други рискови групи, като УИН и ХЕТ, при които също има значително разпространение на инфекцията.

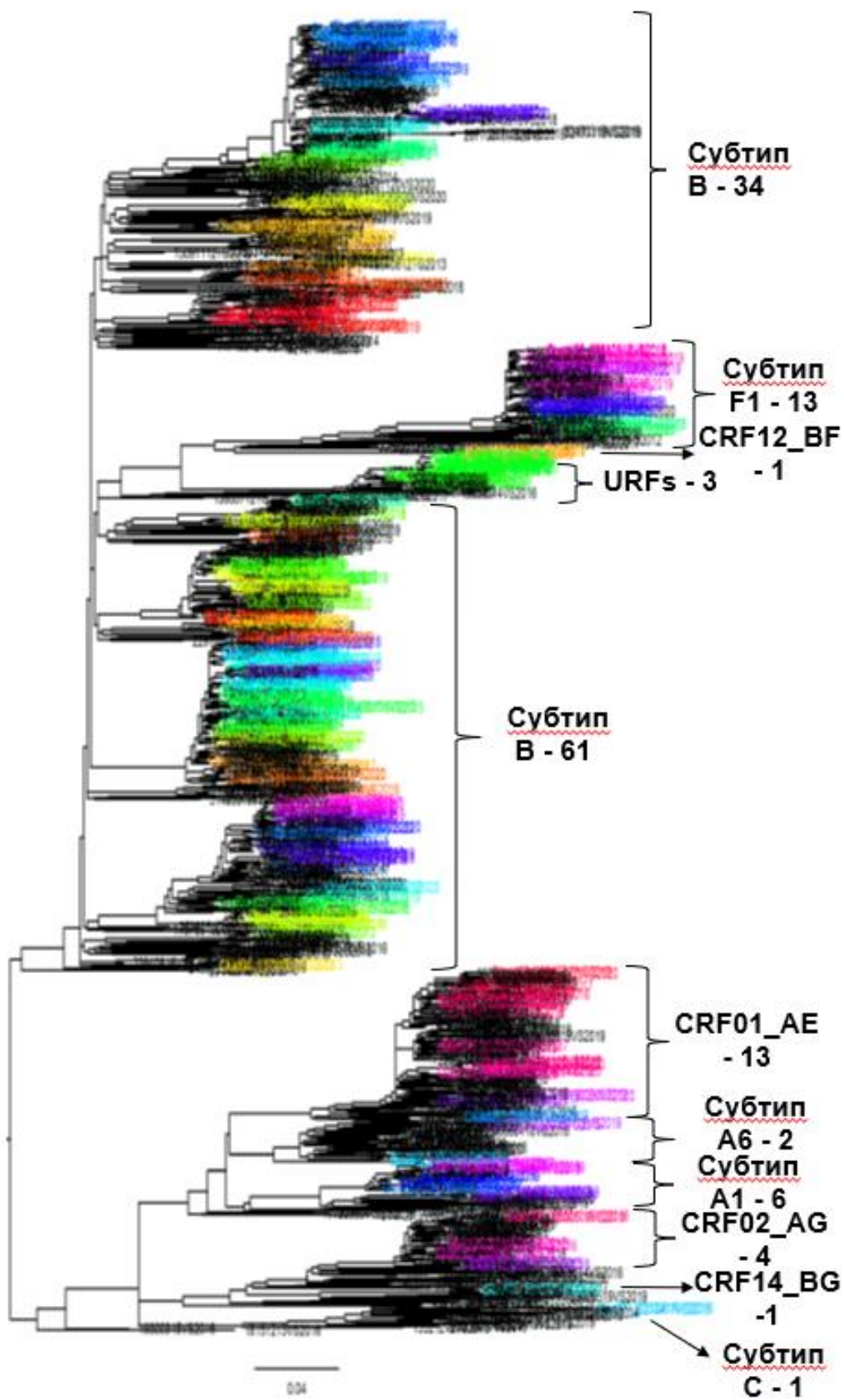
4.3.7. Реконструиране на филогенетично дърво

Първото филогенетично дърво, което реконструирахме, включваше всички 1053 секвенции на наивни пациенти, диагностицирани с HIV-1 в България за периода 2012-2020 г. (фигура 22). Това филогенетично дърво беше основен инструмент в нашето проучване, тъй като предостави ценна информация за генетичните връзки и еволюционните пътища на вируса в разглежданата популация.

При построяването на дървото установихме, че секвенциите със субтип В се разделят на два клона, като между тях попадат и клоните на субтип F1, CRF12_BF и URFs. В отделен и доста отдалечен клон се отделиха CRF01_AE, субтип А6, субтип А1, CRF02_AG, CRF14_BG и субтип С. Това разделение показва ясно различията в генетичните характеристики на вируса в България, което е важно за оценка на епидемиологичната ситуация.

При по-детайлен анализ с помощта на програмата Cluster Picker установихме наличието на множество клъстери. В по-отдалечения от корена на дървото клон, съдържащ субтип В, бяха открити 34 клъстера, докато в по-близкия до корена клон бяха наблюдавани 61 клъстера. За субтип F1 бяха установени 13 клъстера, за CRF12_BF само 1 клъстер, а за URFs открихме 3 клъстера. В долния клон на дървото, където са разположени останалите HIV-1 генетични форми, открихме 13 клъстера за CRF01_AE, 2 за субтип А6, 6 за субтип А1, 4 за CRF02_AG, 1 за CRF14_BG и 1 за субтип С.

Това разделение на най-големия субтип В в два отделни клона наложи разделянето на секвенциите в две категории: секвенции със субтип В и секвенции с не-В субтип. Тази стъпка беше необходима, за да се извърши по-добра оценка на образуваните трансмисивни клъстери и възможните мостове на предаване на инфекцията между различните уязвими групи в популацията. По тази причина бяха построени две отделни филогенетични дървета, като всяко от тях се съсредоточава върху съответните трансмисивни категории.



Фиг. 22. Филогенетично дърво, съдържащо 1053 секвенции от пациенти диагностицирани с HIV-1 в НРПЛ по HIV за периода 2012-2020 г. На филогенетичното

дърво със скоби и стрелки са отбелязани субтиповете на HIV-1. След името на всеки субтип с тире е отбелязан броят образувани клъстери. Всеки клъстер е оцветен с цвят различен от черен.

4.3.8. Реконструиране на филогенетично дърво на HIV-1 субтип В

При реконструкцията на филогенетично дърво за HIV-1 субтип В бяха използвани 595 секвенции от наивни пациенти, диагностицирани с HIV-1 субтип В в България за периода 2012-2020 г. (фигура 23). Проведен беше клъстерен анализ с помощта на програмата Cluster Picker, която установи наличието на 88 клъстера. Критерият за класифициране на клъстерите бе зададен на 2 или повече секвенции с $\text{bootstrap} \geq 90$. Голямата част от наблюдаваните клъстери съдържаха между 2 и 4 секвенции от една и съща трансмисивна категория, като MSM беше преобладаващата трансмисивна група. Въз основа на това, в настоящото изследване се реши да се разгледат само клъстери, съдържащи 5 или повече нуклеотидни последователности, тъй като тези клъстери предоставят по-добри доказателства за възможното формиране на трансмисивни мостове на предаване на инфекцията между различните уязвими групи от популацията.

Първият клъстер, който разгледахме, беше клъстер 25. Той съдържа 6 последователности, всички от които принадлежат на мъже от уязвимата група на MSM. Средната възраст на диагностициране на пациентите е 26,83 години. Един от участващите мъже в клъстера беше диагностициран по време на сероконверсия, което може да е важен показател за ранното откриване на HIV инфекцията. Всички пациенти са родени в България, но трима съобщават, че вероятно са придобили инфекцията в чужбина — съответно във Франция, Израел и Обединеното кралство. Трима от пациентите също така съобщават за наличието на други сексуално предавани инфекции, като двама страдат от сифилис, а един от гонорея. Поради наличието само на една трансмисивна категория, този клъстер не доказва образуването на мостове на предаване на HIV-1 инфекцията в различни уязвими групи.

Следващият клъстер, който отговаря на критериите за 5 или повече секвенции, е клъстер 26, който съдържа точно 5 последователности. Четири от тези секвенции принадлежат на MSM, а една на ХЕТ жена. Средната възраст на диагностициране е 27 години. Всички пациенти са български граждани, инфектирани в границите на

Република България. Един от пациентите съобщава за инфектиране с друга сексуално предавана инфекция, а именно хепатит Б, която е често срещана коинфекция с HIV. Въпреки малкия размер на клъстера, той доказва възможността за предаване на инфекцията между различни трансмисивни категории, като MSM вероятно е предал инфекцията на ХЕТ жена, което предполага възможни мостове на предаване между уязвими групи.

Клъстер 29 съдържа 9 нуклеотидни последователности, като 8 от тях принадлежат на MSM, а 1 на ХЕТ. Средната възраст при диагностициране е 28,4 години. Пациентите са родени в България и съобщават за инфектиране в страната. Четирима от пациентите имат постоянен адрес в София, а останалите имат адреси в различни региони на страната, като Пазарджик, Бургас, Ямбол, Благоевград и Варна. Двама от пациентите съобщават за наличието на друга сексуално предавана инфекция, а именно гонорея и сифилис. Разгледаният клъстер не доказва образуването на мостове между различни трансмисивни категории, но показва възможни пътища на разпространение на инфекцията в различни региони на страната, което подчертава важноста на регионалните различия при разпространението на инфекцията.

Клъстер 33 съдържа 7 секвенции, всички от които принадлежат на мъже, родени и инфектирани в България. Средната възраст при диагностициране е 36,7 години. Трима от пациентите в клъстера имат постоянен адрес в София, а останалите четирима са с адреси в Варна, Пловдив, Плевен и Стара Загора. В този клъстер се наблюдава образуван мост на предаване на инфекцията, тъй като 3 от последователностите принадлежат на MSM, а останалите 4 на ХЕТ мъже. Това доказва предаването на инфекцията между различни трансмисивни категории, показвайки възможен път на предаване на инфекцията от MSM към ХЕТ мъже.

Клъстер 55 съдържа 5 секвенции. Всички пациенти в този клъстер са български граждани, като четирима от тях живеят в региона на София, а един в Перник. Всички пациенти попадат в трансмисионната категория MSM и средната им възраст при диагностициране е 29,2 години. Клъстерът включва двама пациенти, които предполагат, че са се инфектирали в чужбина, един в Обединените арабски емирства, а другият в Обединеното кралство. Освен инфекцията с HIV, и двамата пациенти, инфектирани в чужбина, съобщават за коинфекция с хламидия, което е често срещано при пациенти с HIV, като това може да се дължи на по-висок риск от сексуално предавани инфекции в тези региони. Въпреки, че този клъстер не доказва образуването на мостове на предаване

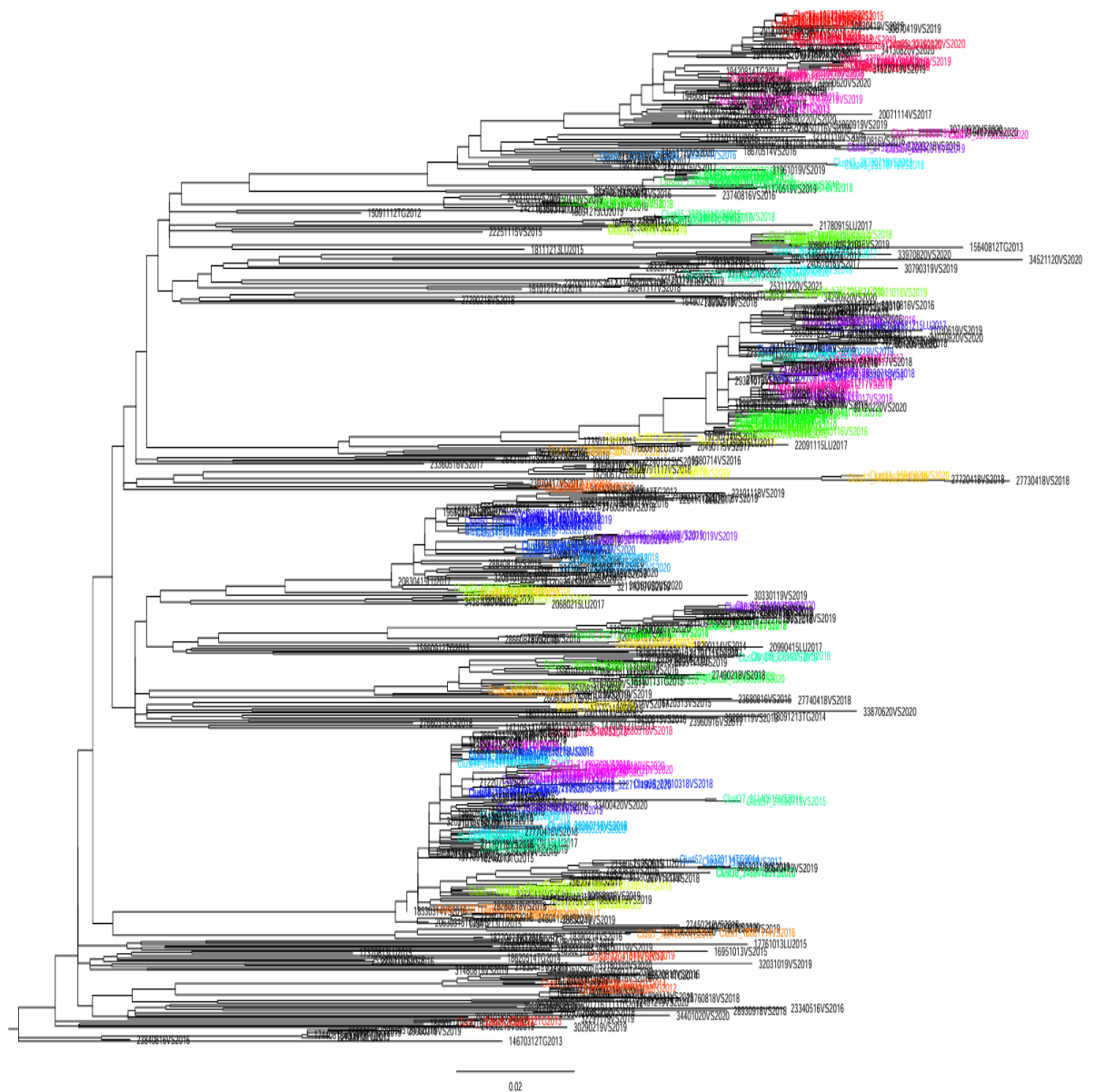
на инфекцията, той предоставя интересни данни за двукратното въвеждане на генетично близки вируси на HIV-1 субтип В в България от две различни страни, разположени на различни континенти. Това е показателно за динамиката на предаването на вируса и възможните международни пътища за разпространение.

Клъстер 58 съдържа 7 нуклеотидни последователности, като всички те принадлежат на MSM, родени и инфектирани в България и живеещи в София. Средната възраст при диагностициране на пациентите е 30,7 години. Един от пациентите съобщава, че освен с HIV е инфектиран и със сифилис и гонорея, което също е често срещана коинфекция с HIV и подчертава важността на ранното откритие и лечение на сексуално предавани инфекции сред тази популация. Поради хомогенността на клъстера, като всички участници са от същата трансмисивна категория MSM, не можем да установим наличие на мостове на предаване на инфекцията между различни трансмисивни групи, но този клъстер ясно показва пътя на инфектиране на всеки отделен индивид, съдържащ се в него. Това също така подчертава важността на целенасоченото лечение и профилактика в специфични популации.

Клъстер 60 съдържа 5 секвенции на български граждани, всички от които са инфектирани в България и живеят в София. Средната възраст при диагностициране е 39,2 години. Клъстерът включва петима мъже, от които тримата са ХЕТ. Единият от тях съобщава за коинфекция с хепатит В, което също е важен аспект при лечението и управлението на HIV инфекцията. Останалите двама мъже са част от трансмисивната категория MSM. Подобно на клъстер 58, този клъстер не доказва образуването на мостове на предаване на инфекцията между уязвимите групи, но предоставя полезна информация за вътрешната структура на трансмисивната група, както и за коинфекциите, които могат да съществуват при пациентите с HIV.

Клъстер 78 съдържа 5 секвенции, всички принадлежат на MSM, родени и инфектирани в България. Средната възраст при диагностициране е 32,6 години. Четирима пациенти в клъстера имат постоянен адрес в София, а един в Ловеч. Един от пациентите е диагностициран в началото на развитието на инфекцията, по време на сероконверсия, което може да бъде показателно за ранно откритие на HIV. Въпреки, че този клъстер не доказва наличие на мостове на предаване на инфекцията, той е интересен, тъй като представлява изолирана група с единни генетични характеристики, показваща пътищата на инфектиране в тази специфична група. Това подчертава важността на диагностицирането на HIV в ранните стадии и контрол на инфекцията.

Клъстер 88 съдържа 7 нуклеотидни последователности, всички от които принадлежат на мъже, родени и инфектирани в България. Средната възраст на пациентите при диагностициране е 42,7 години. Шестима от тях имат адрес в София и принадлежат към трансмисивната категория MSM, а един пациент е от Плевен и принадлежи към ХЕТ категория. Този клъстер е интересен, тъй като включва пациенти, които съобщават за инфектиране по време на кръводаряване, което е възможен път за разпространение на HIV в случай на недостатъчни мерки за контрол на заразата в периода на ранното разпространение. Двама от пациентите съобщават за наличие на сексуално пребаваните инфекции сифилис и гонорея, като това показва важността на ранната диагностика и лечение на сексуално предавани инфекции. Клъстер 88 е от особено значение, тъй като показва мост на предаване на HIV-1 субтип В инфекцията от MSM към ХЕТ. Това е доказателство за възможността за пренасяне на инфекцията между различни трансмисивни категории, което има сериозни епидемиологични последици, особено в контекста на профилактиката и контрол на инфекцията.



Фиг. 23. Реконструирано филогенетично дърво, състоящо се от 595 секвенции, изолирани от наивни пациенти диагностицирани в България за периода 2012-2020 г. с HIV-1 субтип В

4.3.9. Реконструиране на филогенетично дърво на HIV-1 не-B субтипове

При реконструкцията на филогенетичното дърво, включващо всички не-B субтипове, CRFs и URFs, които са извън субтип В, бяха използвани 458 секвенции от наивни пациенти, диагностицирани в България за периода 2012-2020 г. с HIV-1 не-B субтипове (фигура 24). След извършването на клъстерен анализ с помощта на програмата Cluster Picker, установихме формирането на 50 клъстера. Клъстерният критерий беше зададен за 2 или повече секвенции с $\text{bootstrap} \geq 90$.

Анализът на данните показва, че в CRF01_AE са образувани 14 клъстера, които включват общо 34 пациенти, от които 4 са ХЕТ, 6 са МСМ и 25 са УИН. Важен е клъстер 22, който представлява близкородствена двойка от двама мъже с различни трансмисионни категории — 1 ХЕТ и 1 УИН. Този клъстер демонстрира предаване на инфекцията по оста ХЕТ-УИН, показвайки потенциалните пътища за предаване на HIV сред тези уязвими групи. Клъстер 27 включва 3 секвенции, всяка от които попада в различна трансмисионна категория. В този клъстер наблюдаваме образуването на връзка ХЕТ-МСМ-УИН, което доказва възможността за предаване на инфекцията между различни трансмисионни групи.

CRF02_AG формира 4 клъстера с общо 9 секвенции, от които 2 ХЕТ, 6 УИН и 1 МСМ+УИН. Това показва разнообразие в трансмисията сред пациентите с този рекомбинантен вирус и предполага възможността за множество пътища на инфектиране в различни уязвими групи.

При CRF12_BF беше установен един клъстер, съставен от 4 секвенции, всички от които принадлежат към трансмисивната категория МСМ. Възможните пътища на инфектиране в този клъстер показват, че МСМ играят централна роля в разпространението на този рекомбинантен вирус.

CRF14_BG образува 1 клъстер, съставен от близко родствена двойка, която включва двама мъже с различни трансмисионни категории — 1 ХЕТ и 1 УИН. Този клъстер доказва наличието на мост на предаване на инфекцията, което е доказателство за взаимодействието между различни уязвими групи в България и потенциалните пътища на предаване между тях.

Субтип А1 формира 6 клъстера, включващи 19 пациенти. От тези пациенти, 4 са ХЕТ, 14 са МСМ и 1 е УИН. Тези клъстери показват доминирането на трансмисията чрез

хетеросексуален и хомосексуален път, като се наблюдава висока концентрация на пациенти от уязвимата група MSM.

При субтип A6 бяха установени 2 клъстера. Единият клъстер съдържа 2 ХЕТ пациенти, докато другият е съставен от 3 мъже, които принадлежат към трите основни уязвими групи — 1 ХЕТ, 1 MSM и 1 УИН. Въпреки малкия размер на този клъстер, той ясно очертава възможността за предаване на инфекцията между различни трансмисионни категории.

Субтип С формира един клъстер, съставен от близкородствена двойка — ХЕТ мъж и жена. Този клъстер дава ясна информация за хетеросексуалното предаване на HIV в рамките на двойката и подчертава важността на профилактиката сред хетеросексуалните индивиди.

Субтип F1 формира най-голям брой клъстери — 15 клъстера, които включват общо 38 пациенти, от които 15 ХЕТ и 23 MSM. Това показва, че субтип F1 има широко разпространение сред MSM и ХЕТ, като вероятно тези две трансмисионни категории играят основна роля в разпространението на този субтип.

Освен клъстери, съставени от субтипове и CRFs, открихме и клъстери в URFs. Това са 6 клъстера, които включват 33 пациенти, от които 4 ХЕТ, 28 MSM и 1 УИН. Тези URF клъстери показват силно доминиране на MSM като основен път на предаване на HIV в тези нововъзникващи рекомбинантни форми.

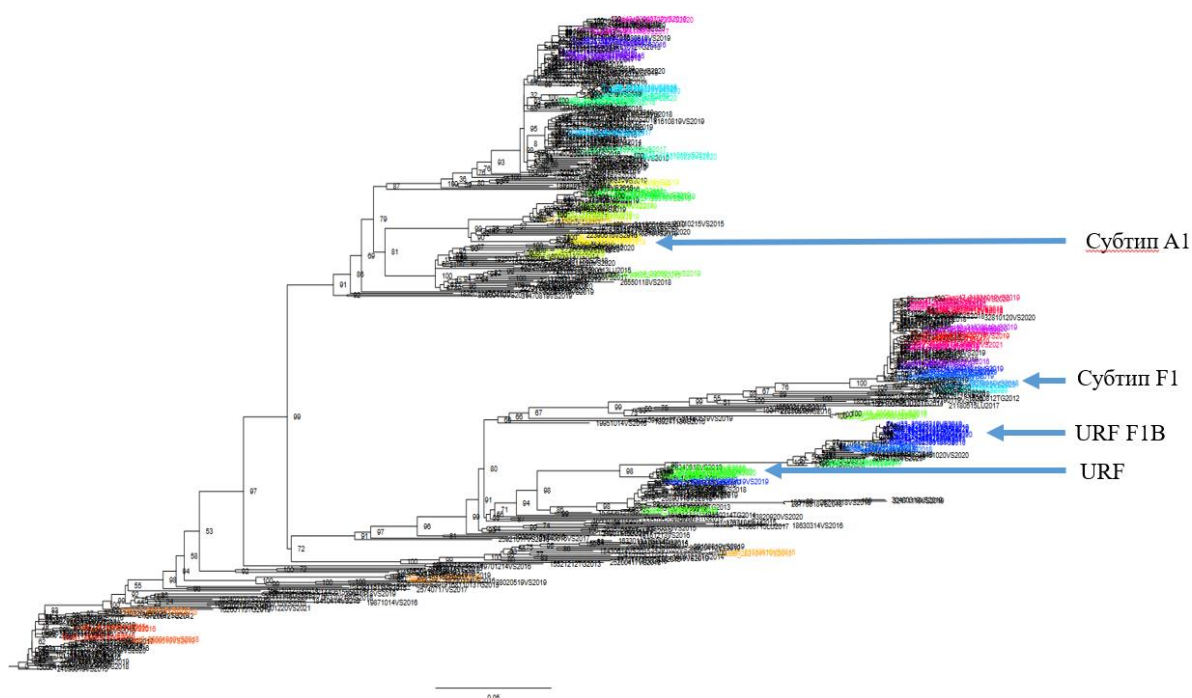
След прилагане на критерия за разглеждане на клъстери с 5 или повече нуклеотидни последователности, бяха разгледани и анализирани 4 клъстера, които попадаха в различни субтипове.

Клъстер 8 е съставен от 5 секвенции от субтип A1. Средната възраст при диагностициране е 31,8 години. Четирима от пациентите са български граждани, а един е гражданин на Република Северна Македония, но всички съобщават България като вероятна страна на придобиване на инфекцията. Четирима от тях имат постоянен адрес в София, а един в Кърджали. Пациентите попадат в уязвимата група MSM. Двама от пациентите съобщават за наличие на други сексуално предавани инфекции, като хепатит Б и Трихомонас вагиналис. Въпреки че този клъстер не доказва образуването на мост на предаване на инфекцията в различни трансмисионни групи, той показва възможен пренос на вируса в съседни държави, като Република Северна Македония, което подчертава значението на международния контрол и сътрудничество за справяне с HIV.

Клъстер 16 е образуван от 7 секвенции с URF. Средната възраст при диагностициране е 37 години. Всички секвенции принадлежат на мъже, родени в България. Петима съобщават, че са придобили инфекцията в страната, а двама в чужбина — един в Испания и един в Обединените Американски Щати. Четирима от мъжете имат постоянен адрес в София, а останалите в Шумен, Пазарджик и Ловеч. Трансмисионната категория на шестима от участниците е МСМ, а на един е ХЕТ. Трима от пациентите съобщават за наличието на други сексуално предавани инфекции: 2 сифилис и 1 кондиломи. Двама от пациентите са диагностицирани по време на кръводаряване. Анализираният клъстер дава информация за възможна трансмисия между две уязвими групи и образуван мост МСМ-ХЕТ. Това показва потенциалната мобилност на инфекцията сред различни трансмисионни категории и възможността за взаимодействие между тях.

Клъстер 31 съдържа 5 нуклеотидни последователности от субтип F1. Тези секвенции принадлежат на български граждани, инфектирани в страната. Трима от тях живеят в София и двама в Пловдив. Средната възраст при диагностициране е 31,6 години. Четирима от участниците са с трансмисионна категория МСМ, а 1 с ХЕТ. Клъстерът носи информация за образуване на мост между МСМ и ХЕТ уязвимите групи, което показва, че инфекцията може да бъде предавана между тези две основни трансмисионни категории, независимо от малкия размер на клъстера. Това може да означава, че дори и при малък брой секвенции, вирусът може да се разпространява между различни социални групи.

Клъстер 33 е най-големият анализиран клъстер, съставен от 14 URF F1B секвенции. Той включва само мъже, със средна възраст при диагностициране от 28,9 години. Тринадесет от пациентите са родени в България, от които 11 съобщават, че са инфектирани в границите на страната. В клъстера попада и един гражданин на Република Молдова, който е инфектиран в родната си страна, но живее в София. Двама предполагат, че са инфектирани в Испания и Италия. Петима от мъжете живеят в София, а останалите в различни области на страната. Петима съобщават за друга сексуално предавана инфекция, като най-често тя е сифилис. Двама от участниците са ХЕТ, а 12 са МСМ. Поради своята големина, клъстер 33 показва сериозно разпространение на URF F1B в цялата страна. Освен това, ясно наблюдаваме предаване на инфекцията по оста МСМ-ХЕТ, което доказва възможността за трансмисионни мостове между тези две различни групи, в контекста на националната епидемиологична ситуация.



Фиг. 24. Реконструирано филогенетично дърво, съдържащо 458 секвенции, изолирани от наивни пациенти, диагностицирани в България за периода 2012-2020 г. с HIV-1 не-V субтипове. Със сини стрелки са отбелязани местата на образуване на големи клъстери, съдържащи 5 или повече секвенции, упоменати са и генетичните форми на секвенциите в клъстера.

Тези клъстери и проведените филогенетични анализи доказват важността на мониторинга и задълбоченото разбиране на трансмисионните пътища на HIV-1, както и на разпространението му сред различни уязвими групи. Също така, анализът демонстрира, че въпреки съществуващите различия в трансмисионните категории, инфекцията продължава да се разпространява и в по-малки, но значими клъстери, което подчертава необходимостта от постоянно проследяване и превенция на инфекцията.

5. Дискусия

Това проучване е проведено върху три големи групи данни. Те включват най-разпространените HIV-1 субтипове в България – субтип В и циркулиращата рекомбинантна форма CRF01_AE, както и върху други субтипове и рекомбинантни форми, които са анализирани в рамките на голяма група данни от новодиагностицирани лица с HIV-1 наивни за АРТ.

Изследването на демографските и епидемиологични характеристики на HIV-1 субтип В пациентите в България, извършено в периода 1986-2018 г., предоставя задълбочено разбиране за разпространението на инфекцията в страната, динамиката на епидемията и значението на различни социални и биологични фактори, които оказват влияние върху развитието на HIV инфекцията. Включването на данни от различни географски региони на България и анализът на трансмисионните групи, изложени на риск от инфектиране, дава цялостна картина за HIV-1 субтип В, който е основен причинител на епидемията в страната. Това изследване използва съвременни биоинформационни и генетични инструменти за субтипване и филогенетичен анализ, които също така разглеждат глобалните тенденции и локални особености в епидемиологията на HIV инфекцията.

Наблюденията върху демографските характеристики показват, че мъжете съставляват 89,4% от всички пациенти с HIV-1 субтип В в България. Това не е изненада, тъй като при HIV инфекцията глобално мъжете са по-представени в епидемиологичната статистика, особено в случаи на MSM. Възможните обяснения за този дисбаланс между мъжете и жените включват социални, културни и здравни фактори, които в значителна степен влияят на диагностицирането и лечението на жените с HIV в България. Освен това, мъжете, които правят секс с мъже, съставляват основната уязвима група, което води до преобладаващото разпространение на инфекцията сред тях. От друга страна, сравнително малкият дял на жените (10,6%) показва, че HIV инфекцията е по-малко разпространена в женската популация, което обаче не трябва да води до недооценка на риска сред жените, особено при тяхното нарастващо включване в социални и сексуални мрежи, които ги поставят в риск. Освен това, жените често изпитват по-силна стигматизация, свързана с HIV инфекцията, което може да повлияе на тяхната склонност да се подлагат на тестове и да потърсят лечение.

Разпределението на възрастовите групи показва, че най-много заразени са пациентите в диапазона от 20 до 39 години, които съставляват 76,8% от изследваните

пациенти. Това е в съответствие с глобалните тенденции, при които младите хора са по-податливи на HIV инфекция [<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>]. Възрастовата група от 20 до 39 години обикновено включва лица с активни социални и сексуални практики, които увеличават вероятността от контакт с инфекцията. Най-малък е дялът на пациентите в групата до 19 години (3,5%), което може да се тълкува като относително по-нисък риск за инфектиране в тази възрастова категория. Това обаче не означава, че младите хора са напълно защитени. Програмите за сексуално здраве и превенция, насочени към по-младото поколение, трябва да бъдат засилени, за да се избегнат бъдещи разпространения на инфекцията в тази възрастова група. Също така, 5,9% от пациентите са на възраст над 50 години, което е интересен резултат, тъй като показва възможни тенденции за нарастваща инфекция в по-късна възраст, което може да се дължи на променени социални навици, миграция или по-малко активно тестване и диагностика сред възрастните хора.

Най-голямата концентрация на HIV-1 субтип В пациенти е в столицата София (55,5%), последвана от Варна (7,3%) и Пловдив (6,6%). Въпреки че повече от половината от изследваните пациенти живеят в София, наличието на случаи в по-малко урбанизирани области показва, че разпространението на HIV-1 субтип В не се ограничава само до големите градове, а изисква усилия за създаване на стратегия за превенция, която да обхваща всички части на страната.

Малка част от пациентите (1,8%) са чужденци, което подчертава, че HIV-1 субтип В е основно локализиран в България. Въпреки това, миграцията и международните пътувания също играят важна роля в разпространението на инфекцията. 11,8% от пациентите съобщават, че са заразени извън България, като значителна част от тези случаи са в други европейски страни. Тези данни показват, че България остава основен източник за разпространение на HIV-1 инфекция сред българите, въпреки участието на международни фактори. Тези резултати дават основа за по-добро разбиране на глобалните и локални фактори, които влияят на разпространението на HIV-1 и подчертават значението на сътрудничеството между държавите в борбата срещу епидемията.

Епидемиологичните данни показват, че най-голямото разпространение на HIV-1 субтип В е сред MSM – 56,7%. Този тренд се наблюдава и в други европейски страни, където MSM се явява основен рисков фактор за инфекция. Тъй като групата на MSM е основен източник на разпространение на HIV, тестването и образованието на тези лица

трябва да бъде приоритет в стратегиите за превенция. Важно е също така да се обърне внимание на други рискови групи, като ХЕТ и УИН, които също представляват значителни рискови категории.

Филогенетичният анализ на трансмисионни клъстери с помощта на инструмента MicrobeTrace разкрива важни подробности за генетичната близост между различни HIV изолати в България. Въз основа на генетичната дистанция бяха идентифицирани 52 трансмисионни клъстера, които показват основния път на разпространение на HIV-1 в страната. Интересно е, че голяма част от тези клъстери са свързани с групата на MSM, което подчертава основното значение на тази група в разпространението на HIV в България.

След успешното подравняване и субтипичане на вирусните последователности, следващият ключов етап е анализът на трансмисионните клъстери. Това са групи от вирусни изолати, които показват висока генетична близост, което предполага, че тези изолати принадлежат на пациенти, които вероятно са били инфектирани чрез общи пътища на предаване. Основната цел на този филогенетичен анализ е да се установи генетичната връзка между вирусните изолати от различни пациенти и да се идентифицират пътищата на предаване на HIV в рамките на определени рискови групи.

Използването на софтуер, като MicrobeTrace, за изчисляване на генетичната дистанция, позволява генерирането на визуални графики, които показват как различните вирусни изолати са свързани помежду си, формирайки клъстери. За целите на това изследване беше използван праг на генетична отдалеченост от 1,5%, което е оптимално за разделяне на изолатите, които са вероятно част от една епидемиологична група. В резултат на този анализ бяха идентифицирани 52 трансмисионни клъстера.

Всеки от идентифицираните трансмисионни клъстери показва различна структура, която може да предостави важна информация за епидемиологичните мрежи на HIV в България. Например, в три от големите клъстери, съдържащи съответно 56, 59 и 91 секвенции, преобладаващата трансмисионна група са MSM. В тези клъстери процентът на MSM е 55,4%, 73% и 80%, което подчертава основната роля на тази група като основен път за разпространение на HIV-1 в България. Също така, хетеросексуалните лица също са значителен компонент на тези клъстери. Например, в клъстерите с 56 и 59 секвенции, процентът на ХЕТ е съответно 17,6% и 27,1%. Тези резултати подчертават важността на хетеросексуалните контакти в предаването на HIV. Допълнителен интерес представлява групата на интравенозни наркомани, която също е представена в тези

кълстери. Възможността за предаване на HIV, чрез споделяне на инжекционни практики, поставя УИН, като уязвима група за инфектиране, като същевременно показва, че трансмисията може да бъде по различни пътища и да свързва различни уязвими групи.

Ние анализирахме кълстерите според тяхната големина и структурни характеристики. Например, в кълстер 1, който включва 91 вирусни изолата, преобладаващата група от 80,2% са МСМ, като в този кълстер също се откриват представители на ХЕТ и УИН групите. Това показва, че инфекцията в този кълстер е преминала между различни трансмисионни групи, като МСМ вероятно играе основната роля в предаването. Подобен анализ за кълстер 2 с 59 секвенции, в който 72,9% от мъжете са част от групата МСМ, а 27,1% от тях принадлежат към ХЕТ групата, показва наличието на пряка връзка между тези две основни рискови групи.

След всички наши констатации за трансмисионните групи, не бива да пренебрегваме съществуването на стигма, която е свързана с HIV/СПИН и със сексуалните практики.

В настоящото изследване беше извършен и детайлен филогенетичен анализ на HIV-1 CRF01_AE с помощта на програма MicrobeTrace, която позволява идентифицирането на генетични кълстери и проследяване на предаването на вируса в определени популации. CRF01_AE е една от най-широко разпространените рекомбинантни форми на HIV-1, което подчертава важността на нейното изследване в контекста на България, където този вирусен субтип играе значителна роля в епидемията.

Използването на генетичните отстояния между вирусни изолати от 1,5%, позволи да бъдат разкрити филогенетичните връзки между различни HIV-1 CRF01_AE изолати, да се идентифицират трансмисионни кълстери и да се оценят пътищата на предаване в различни рискови групи в България. Резултатите от анализа показват, че HIV-1 CRF01_AE активно циркулира в страната, като се разпространява не само в традиционно уязвимите групи като УИН, но и между ХЕТ и МСМ.

В изследваното население с HIV-1 CRF01_AE в България бяха идентифицирани 6 трансмисионни кълстери, включващи три по-големи кълстера, съставени от 5 или повече вирусни секвенции, и три близкородствени двойки. Това показва, че въпреки че вирусът се предава в сравнително малък брой случаи (диадите), съществуват и по-широки кълстери, в които участващите вирусни изолати могат да имат общи предци, показвайки, че вирусът може да се разпространява активно в различни социални мрежи и уязвими групи.

От общия брой участници в трансмисионните клъстери, 75,6% са мъже и 24,4% са жени. Това е интересно, тъй като подчертава преобладаването на мъжете в тези клъстери, което може да бъде резултат от преобладаващото участие на мъже в групите с високо разпространение на HIV, като УИН и МСМ. Основната трансмисионна категория в тези клъстери е групата на УИН, която представлява 69,2% от всички вирусни секвенции. Това подчертава критичната роля на употребата на интравенозните наркотици в разпространението на HIV-1 CRF01_AE в България. Следваща по значимост е групата на ХЕТ, която съставлява 21,5% от секвенциите. По-малък процент от изолатите се откриват в групата на МСМ (3,3%), което показва, че разпространението на HIV-1 CRF01_AE в България е по-силно концентрирано след употребяващите венозни наркотици и хетеросексуалните лица, отколкото в хомосексуалните общности.

Клъстер 1 е най-големият клъстер, съдържащ 154 секвенции, от които 75,3% са мъже, а 24,7% са жени. В този клъстер преобладава групата на УИН, като 70,1% от секвенциите принадлежат на наркомани. След това, в клъстера, 19,5% от участниците са хетеросексуални, а 3,2% са мъже, които правят секс с мъже. Интересно е, че в този клъстер са открити и три новородени, които са заразени по вертикален път, което може да показва локални огнища на HIV инфекция и важността на контрола върху вертикалната трансмисия. 92,9% от участниците съобщават, че са инфектирани в България, което подчертава, че вирусът активно циркулира в страната.

Клъстер 2, съставен от 7 секвенции, има 71,4% мъже и 28,6% жени. В този клъстер се открива мост на предаване по оста УИН към ХЕТ, което показва, че вирусът преминава между тези две групи, подчертавайки динамиката на инфекцията между различни социални групи. Един от пациентите съобщава, че е бил инфектиран в чужбина, което предполага, че вирусът може да бъде пренесен в страната чрез миграцията.

Клъстер 3, който включва 5 секвенции, също показва предаване по оста УИН към ХЕТ, но с малък размер на клъстера, което отразява по-малък брой участници и по-ограничено предаване между тези групи.

Клъстери 4, 5 и 6 представляват диади или близкородствени двойки, които показват предаване между УИН и ХЕТ групите, като тези клъстери допълнително потвърдиха съществуването на мостове на предаване между различни рискови категории.

При анализирането на единичните секвенции, които не образуват клъстери, беше установено равномерно разпределение по пол - 65,3% от единичните случаи са при хетеросексуални пациенти, а 22,4% са при наркомани. Един интересен резултат е, че три

новородени също бяха класифицирани като единични случаи, без да бъдат свързани с други секвенции в съществуващите клъстери, което показва, че те са независими случаи и не са част от основната епидемиологична мрежа на HIV.

В допълнение към най-разпространените субтипове на HIV-1 (субтип В и CRF01_AE) беше проведен задълбочен анализ върху голям брой наивни за АРТ лица с HIV, сред които са идентифицирани множество други субтипове и рекомбинантни форми на HIV-1.

В рамките на изследване, проведено между 2012 и 2020 г. в България, бяха анализирани 1053 пациенти, диагностицирани с HIV-1 инфекция, които отговарят на критерия за наивни към антиретровирусна терапия (АРТ). Проведеният филогенетичен анализ чрез субтипирание и класифициране на вирусните изолати чрез ни позволи да бъдат изяснени генетичните профили на вирусите и идентифицирането на трансмисионни клъстери, които разкриват пътищата на предаване на инфекцията сред различни уязвими групи.

Резултатите от демографския анализ показват, че повечето от диагностицираните пациенти са мъже, които съставляват 85,9% от всички случаи, докато жените представляват 14,1%. Това съответства на глобалната тенденция, в която мъжете, особено тези от рисковите групи, като МСМ, са по-често засегнати от HIV инфекция [Alexiev, 2020]. Възрастовото разпределение показва, че основната възрастова група, диагностицирана с HIV-1, е между 20 и 39 години, като тези пациенти съставляват 72,5% от всички случаи в периода 2012-2020 г. Това е в съответствие с активния социален и сексуален живот в тези възрастови групи, което ги поставя в риск от сексуално предаване на вируса. Възрастта на пациентите варира от 13 до 78 години, като най-малък процент от тях са на възраст до 19 години.

Епидемиологичните данни показват, че 80,8% от пациентите са български граждани, докато 19,2% са чуждестранни граждани, диагностицирани в България. Това потвърждава международния характер на HIV епидемията и подчертава важноста на миграцията и мобилността на населението за въвеждането и разпространението на HIV. Най-често инфекцията е придобита в Европейския съюз, с преобладаващи случаи от Германия, Испания и Обединеното кралство. Въпреки това, има и значителен брой пациенти, които се заразяват в България, което подчертава важноста на вътрешните механизми на разпространение на HIV в страната.

Географският анализ показва, че София е най-силно засегнатият регион, с почти половината от всички диагностицирани случаи. Този резултат не е изненадващ, като се има предвид по-високата мобилност на населението. Пловдив е вторият по големина регион, но разликата със София е значителна. Въпреки това, разпространението на HIV-1 инфекцията в по-малките региони на страната е по-ниско, което може да се обясни с по-ниска социална мобилност и по-малко миграционни потоци в тези области.

Когато се разгледа разпределението на трансмисионните категории, резултатите показват ясно доминиране на МСМ, като тази категория обхваща 50,7% от всички диагностицирани случаи. Следваща по големина категория е ХЕТ, с 38,1%, докато УИН съставляват 9,6% от случаите. Присъствието на категорията МСМ+УИН (лица, които попадат в две трансмисионни групи) е малко, което показва, че въпреки малкия брой, тази група все пак е уязвима на инфекция поради съвпадения в рисковите практики.

Процесът на субтипване на HIV-1 секвенциите показва, че доминиращият субтип в България е субтип В, който съставлява 60,4% от всички случаи. Следват CRF01_AE с 11,4%, F1 с 6,9% и CRF02_AG с 5,2%. Останалите субтипове и рекомбинантни форми на HIV-1 вируса имат по-ниски стойности, като не преминават границата от 5%. Това показва, че субтип В продължава да бъде основната форма на HIV-1 инфекция в България и водеща в новите случаи.

Филогенетичният анализ с използване на Cluster Picker разкри наличието на 88 клъстера за субтип В, като фокусът беше върху тези с 5 или повече секвенции. Това позволи да се проследи еволюцията на вируса и да се идентифицират възможни мостове на предаване между различни трансмисионни категории. Клъстерите, съдържащи само една трансмисионна категория, като МСМ, не показват образуването на мостове, докато по-сложни клъстери, които включват пациенти от различни трансмисионни категории, като МСМ и ХЕТ, показват възможни пътища за разпространение на вируса между тези групи. Например, в клъстер 26 се наблюдава прехвърляне на инфекцията от МСМ към ХЕТ жена, което демонстрира важността на фокусирани превантивни мерки, които да обхванат различни социални и сексуални групи.

При анализа на не-В субтипове (включително CRF01_AE, CRF02_AG, CRF12_BF и URFs), бяха открити 50 клъстера, като най-големият брой клъстери беше свързан с CRF01_AE, което обикновено е свързано с УИН групата. Възможността за предаване на инфекцията между различни рискови групи се наблюдава и тук, като например, в клъстер 22 на CRF01_AE, където се наблюдава прехвърляне на инфекцията между ХЕТ и УИН.

Това показва, че въпреки разликите в трансмисионните категории, HIV-1 продължава да се разпространява между различни социални и сексуални групи, което налага целенасочени усилия за предотвратяване на епидемията.

Изводите от този анализ подчертават важността на фокусирането към основните рискови групи като МСМ и УИН чрез целенасочени здравни интервенции. Разпределението на HIV показва, че въпреки глобалната тенденция към увеличение на новите инфекции в урбанизираните райони, по-малките региони също не са освободени от разпространението на HIV, което изисква подобряване на достъпа до медицински услуги и профилактика в тези области [Alexiev, 2020; Alexiev, 2016].

Обобщените резултати от анализа на пациенти, диагностицирани с HIV-1 в България, подчертават ключови аспекти на епидемиологичната ситуация, включително доминирането на субтип В и значението на МСМ и ХЕТ като основни трансмисионни групи. Концентрираното разпространение на инфекцията в урбанизираните региони, като София и Пловдив, показва географски специфични тенденции, а миграцията играе важна роля в разпространението на вируса, като основни източници на инфектиране са европейските държави.

Филогенетичният и трансмисионният анализ на HIV-1 в България предоставя ценни доказателства за динамиката на епидемията, като откритията за трансмисионни клъстери и генетичната близост между вирусни изолати разкриват сложността на разпространението през различни рискови групи. Резултатите показват, че HIV инфекцията в България се разпространява основно сред МСМ и ХЕТ групите, като важна роля в епидемиологичната мрежа играят и уязвимите групи, като УИН.

Допълнително, анализът на HIV-1 CRF01_AE показва сложността на епидемиологичната ситуация, като основен канал на разпространение остава групата на УИН, но се наблюдава и значително предаване между ХЕТ и МСМ. Тези резултати подчертават необходимостта от целенасочени превантивни мерки, които да се фокусират върху уязвимите групи и да включват стратегии за предотвратяване на вертикална трансмисия, наркотици и хетеросексуални отношения, за да се намали разпространението на HIV в България.

Тези изводи подчертават важността на адаптиране на превантивните стратегии към специфичните епидемиологични условия в България и фокусиране върху рисковите групи за ефективна борба с епидемията.

6. Изводи

1. Чрез внимателен подбор по време на периода на изготвяне на настоящия дисертационен труд бяха селектирани подходящи пациенти с HIV-1 за целите на проучването. От техните плазмени проби успешно беше секвениран фрагмент от *pol* гена на HIV-1 за по-нататъшен анализ.
2. Получената генетична информация бе групирана със секвенции от архива на НРПЛ по HIV. Пълен набор от данни бе генериран чрез използване на демографски и епидемиологични данни за изследваните пациенти, необходими за прецизен молекулярно-епидемиологичен анализ.
3. Посредством използване на инструменти за субтипирание, рекомбинантен анализ и мануален филогенетичен анализ бяха дефинирани субтиповете и циркулиращите рекомбинантни форми на изследваните секвенции. Нашият анализ установи, че най-често срещан субтип е HIV-1 субтип В, следван от CRF01_AE и CRF02_AG, както и наличието на многократни въвеждания на разнообразни генетични форми в България от различни географски региони.
4. Чрез филогенетичен анализ бяха идентифицирани трансмисионни клъстери както при широко разпространените субтипове и CRF-и, така и при по-рядко срещаните генетични субтипове на HIV-1, което потвърждава разнообразието и сложността на епидемичния процес в популацията от HIV-1 в страната.
5. Анализът на трансмисионните клъстери показва широко разпространение на HIV-1 в страната с множество въвеждания от чужбина. Идентифицираните клъстери бяха хетерогенни по отношение на пол, възраст, поведенчески рискови фактори и социални групи, което подчертава наличието на мостове за предаване на инфекцията между различни уязвими популации.
6. Цялостният молекулярно-епидемиологичен анализ разкри, че епидемията от HIV-1 в България се характеризира със значително разнообразие от различни субтипове и рекомбинантни форми на HIV-1 и динамика на разпространението,

като резултат от множество независими въвеждания от други страни и наличие на вътрешна трансмисия между разнообразни уязвими групи от населението. Тези резултати подчертават сложността и динамиката на HIV-1 епидемията в страната и предоставят ценна информация за нейното развитие и характеристики.

7. Приноси

Приноси с оригинален характер

1. Проведено е първото детайлно молекулярно-вирусологично проучване върху трансмисионните клъстери на въведените и разпространени HIV-1 субтипове в България.
2. Анализирани са общо 1 466 секвенции от *pol* гена на HIV-1, изолирани от пациенти с диагностицирана HIV-1 инфекция в България. Изследваните проби включват основните циркулиращи генетични форми в страната: субтип В, CRF01_AE, CRF02_AG и други. Секвенциите от проучването са депозирани в генбанката на NCBI.
3. Реконструирани са филогенетични дървета, съставени от български и референтни секвенции, които показват сходството между секвенциите и проследяват еволюционната история на трансмисионните връзки в страната.
4. Установени са множество трансмисионни клъстери, които се различават по големина и хетерогенност и включват представители на разнообразни уязвими групи от популацията с възможно преливане на инфекцията между тях.
5. Идентифицираните филогенетични клъстери показват наличието на динамични трансмисионни събития сред уязвими групи от населението за кратък период от време.
6. Получените резултати от нашето проучване имат значителен принос към по-доброто разбиране на епидемията от HIV-1 в България.

Приноси с научно-приложен характер

1. Идентифицирането на голямо разнообразие от субтипове и рекомбинантни форми, както и характеризирането на трансмисионните кълстери с участието на уязвими групи от населението, може да послужи като основа за разработване на по-ефективни стратегии за превенция и контрол на HIV инфекцията в страната.
2. Тези данни биха могли да бъдат използвани за насочване на общественото здравеопазване при планирането на интервенции, насочени към специфични рискови групи и пътища на предаване.

8. Литературна справка

1. Alexiev, I., Beshkov, D., Shankar, A., Hanson, D.L., Paraskevis, D., Georgieva, V., Karamacheva, L., Taskov, H., Varleva, T., Elenkov, I., et al. (2013) Detailed molecular epidemiologic characterization of HIV-1 infection in Bulgaria reveals broad diversity and evolving phylodynamics. PLoS ONE 2013, 8, e59666.
2. Alexiev, I., Shankar, A., Dimitrova, R., Gancheva, A., Kostadinova, A., Teoharov, P., Golkocheva, E., Nikolova, M., Muhtarova, M., Elenkov, I., Stoycheva, M., Nikolova, D., Varleva, T., & Switzer, W. M. (2016). Origin and spread of HIV-1 in persons who inject drugs in Bulgaria. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 46, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.029>
3. Alexiev, I., M Campbell, E., Knyazev, S., Pan, Y., Grigorova, L., Dimitrova, R., Partsuneva, A., Gancheva, A., Kostadinova, A., Seguin-Devaux, C., & M Switzer, W. (2020). Molecular Epidemiology of the HIV-1 Subtype B Sub-Epidemic in Bulgaria. Viruses, 12(4), 441. <https://doi.org/10.3390/v12040441>
4. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> accessed: 15.04.2024
5. L. Grigorova, R. Dimitrova, A. Partsuneva, A. Gancheva, A. Kostadinova, I. Elenkov, N. Yancheva, M. Stoycheva, Ts. Doychinova, L. Pekova, M. Kosmidis and I. Alexiev. Drug resistance mutations and transmission clusters of the HIV-1 CRF01_AE sub-epidemic in Bulgaria Problems of infectious and parasitic diseases, volume 49, number 3/2021.

Благодарности

Изказвам своята благодарност към научния си ръководител доц. Ивайло Алексиев за подкрепата, помощта, полезните съвети и напътствия, както и за възможностите за изява, които ми бяха предоставени.

Благодаря на семейството и приятелите си, които бяха неотлъчно до мен през всички трудности.

Това проучване беше подкрепено от:

- Националният център по заразни и паразитни болести, София, България;
- Министерство на здравеопазването на Република България;
- 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“ и Европейския фонд за регионално развитие.

Публикации и участия свързани с дисертационния труд

Публикации с импакт фактор

1. Molecular Epidemiological Analysis of the Origin and Transmission Dynamics of the HIV-1 CRF01_AE Sub-Epidemic in Bulgaria. Ivailo Alexiev, Ellsworth M. Campbell, Sergey Knyazev, Yi Pan, **Lyubomira Grigorova**, Reneta Dimitrova, Aleksandra Partsuneva, Anna Gancheva, Asya Kostadinova, Carole Seguin-Devaux, Ivaylo Elenkov, Nina Yancheva and William M. Switzer. Viruses 2021, 13, 116. <https://doi.org/10.3390/v13010116>
Impact Factor: 5.048
Quartiles Q1 (2021)
2. Transmitted HIV Drug Resistance in Bulgaria Occurs in Clusters of Individuals from Different Transmission Groups and Various Subtypes (2012–2020). Ivailo Alexiev, Anupama Shankar, Yi Pan, **Lyubomira Grigorova**, Alexandra Partsuneva, Reneta Dimitrova, Anna Gancheva, Asya Kostadinova, Ivaylo Elenkov, Nina Yancheva, Rusina Grozdeva, Dimitar Strashimirov, Mariana Stoycheva, Ivan Baltadzhiev, Tsetsa Doichinova, Lilia Pekova, Minas Kosmidis, Radoslava Emilova, Maria Nikolova and William M. Switzer. Viruses 2023, 15(4), 941; <https://doi.org/10.3390/v15040941>
Impact Factor: 5.818
Quartiles Q1 (2023)

Публикации без импакт фактор

1. DRUG RESISTANCE MUTATIONS AND TRANSMISSION CLUSTERS OF THE HIV-1 CRF01_AE SUB-EPIDEMIC IN BULGARIA **Lyubomira Grigorova**, Reneta Dimitrova, Aleksandra Partsuneva, Anna Gancheva, Asya Kostadinova, Ivaylo Elenkov, Nina Yancheva, Mariyana Stoycheva, Tsetsa Doychinova, Liliya Pekova, Minas Kosmidis and Ivailo Alexiev. Problems of infectious and parasitic diseases, volume 49, number 3/2021.

Участия в научни форуми в България

2020

1. Молекулярно вирусологичен анализ на трансмисионните клъстери на HIV-1 субтип В, CRF01_AE и CRF02_AG в България. И. Алексиев, Р. Димитрова, **Л. Григорова**, А. Парцунова, А. Ганчева, И. Еленков, Н. Янчева, М. Стойчева, Ц. Дойчинова, Л. Пекова, М. Николова. 18 Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк хотел Москва 30.09. – 02.10. 2020 г. - доклад
2. Вертикална трансмисия на HIV-1 в България (предварителен анализ). А. Ганчева, А. Костадинова, Р. Димитрова, А. Парцунова, **Л. Григорова**, И. Еленков, Н. Янчева, М. Стойчева, Ц. Дойчинова, Л. Пекова, М. Николова, И. Алексиев. 18 Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк хотел Москва 30.09. – 02.10. 2020 г. - доклад

2021

3. Мутации, предизвикващи лекарствена резистентност при пациенти инфектирани с HIV-1 CRF01_AE в България. **Л. Григорова**, А. Парцунова, Р. Димитрова, А. Ганчева, А. Костадинова, И. Еленков, Н. Янчева, М. Стойчева, Ц. Дойчинова, Л. Пекова, М. Козмидис, М. Николова, Р. Емилова, И. Алексиев. 19 Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк хотел Москва 14.09. – 16.09.2021 г. - доклад
4. Вертикална трансмисия на HIV-1 от майка на новородено в България (предварителен анализ). А. Ганчева, А. Костадинова, Р. Димитрова, А. Парцунова, **Л. Григорова**, И. Еленков, Н. Янчева, М. Стойчева, Ц. Дойчинова, Л. Пекова, М. Николова, И. Алексиев. 19 Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, Парк хотел Москва 14.09. – 16.09.2021 г. - доклад
5. Лекарствена резистентност при HIV-1 CRF01_AE пациенти в България. **Л. Григорова**, А. Парцунова, Р. Димитрова, А. Ганчева, А. Костадинова, И. Еленков, Н. Янчева, М. Стойчева, Ц. Дойчинова, Л. Пекова, М. Козмидис, М. Николова, Р. Емилова, И. Алексиев. VIII Национална конференция Ефектът на пандемията КОВИД-19 върху ХИВ/СПИН и други инфекциозни заболявания. 16 – 19 СЕПТЕМВРИ 2021 г., Цигов чарк - постер
6. Вирусологичен мониторинг на лицата с HIV/СПИН в България. Ивайло Алексиев, Ренета Димитрова, Александра Парцунова, **Любомира Григорова**, Анна Ганчева, Ася Костадинова, Ивайло Еленков, Нина Янчева, Р. Гроздева, Марияна Стойчева, Цеца Дойчинова, Лилия Пекова, Минас Козмидис, Радослава Емилова и Мария Николова. Пета Национална научна конференция по HIV и коинфекции. 26 и 27 ноември 2021, София, хотел Балкан - постер
7. Трансмисионни клъстери при уязвими групи с HIV-1 субтип В и CRF01_AE в България. **Любомира Григорова**, Александра Парцунова, Ренета Димитрова, Анна Ганчева, Ася Костадинова, Ивайло Еленков, Нина Янчева, Марияна Стойчева, Цеца Дойчинова,

Лилия Пекова, Минас Козмидис и Ивайло Алексиев. Пета Национална научна конференция по HIV и коинфекции. 26 и 27 ноември 2021, София, хотел Балкан - постер

8. Вирусологичен мониторинг на HIV/СПИН при бременни и новородени в България (предварителен анализ). Анна Ганчева, Ася Костадинова, Ренета Димитрова, Александра Парцунова, **Любомира Григорова**, Ивайло Еленков, Нина Янчева, Марияна Стойчева, Цеца Дойчинова, Лилия Пекова, Мария Николова, Ивайло Алексиев. Пета Национална научна конференция по HIV и коинфекции. 26 и 27 ноември 2021, София, хотел Балкан - постер

2022

9. Вертикална трансмисия на HIV-1 при новородени в България (Предварителен анализ). А. Ганчева, А. Костадинова, Р. Димитрова, А. Парцунова, **Л. Григорова**, И. Еленков, Н. Янчева, М. Стойчева, Ц. Дойчинова, Л. Пекова, М. Николова, И. Алексиев. IX Национална конференция HIV/ AIDS в условия на пандемията COVID-19. Екзотични инфекциозни и паразитни болести. 26 – 29 МАЙ 2022 г. Цигов чарк - постер
10. Молекулярно-вирусологичен анализ на трансмисионните клъстери от HIV-1 субтип С в България. **Л. Григорова**, Р. Димитрова, А. Парцунова, А. Ганчева, А. Костадинова, И. Алексиев. IX Национална конференция HIV/ AIDS в условия на пандемията COVID-19. Екзотични инфекциозни и паразитни болести. 26 – 29 МАЙ 2022 г. Цигов чарк - постер
11. Анализ на трансмисионните резистентни мутации и разпространение на субтиповете на HIV-1 в България 2012-2021. И. Алексиев, А. Парцунова, **Л. Григорова**, Р. Димитрова, А. Ганчева, А. Костадинова, И. Еленков, Н. Янчева, Р. Гроздева, М. Стойчева, Ц. Дойчинова, Л. Пекова, М. Козмидис, Р. Емилова, М. Николова. XX юбилеен национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите, Пловдив, 16.09–18.09.2022 г. Аудиторен комплекс, МУ-Пловдив - постер
12. Филогенетични трансмисионни клъстери на HIV-1 субтип В, С и CRF01_AE в България (предварителен анализ). **Л. Григорова**, А. Парцунова, Р. Димитрова, А. Ганчева, А. Костадинова, И. Еленков, Н. Янчева, М. Стойчева, Ц. Дойчинова, Л. Пекова, М. Козмидис, И. Алексиев. XX юбилеен национален конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите, Пловдив, 16.09–18.09.2022 г. Аудиторен комплекс, МУ-Пловдив - доклад
13. Analysis of the transmitted drug resistance and molecular epidemiology of HIV-1 in Bulgaria, challenges, and prospects. Ivaylo Alexiev, Alexandra Partsuneva, **Lyubomira Grigорова**, Reneta Dimitrova, Anna Gancheva, Asya Kostadinova, Ivaylo Elenkov, Nina Yancheva, R. Grozdeva, Mariana Stoycheva, Tsetsa Doichinova, Lilia Pekova, Minas Kosmidis, Radoslava Emilova, Maria Nikolova. XV Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, Koprivshtitsa, Bulgaria, October 5th – 8th, 2022 - постер
14. Значение на трансмисионните клъстери за ускореното разпространение на трансмисионната лекарствена резистентност към HIV-1 в България 2012-2021. Ивайло Алексиев, **Любомира Григорова**, Александра Парцунова, Ренета Димитрова, Анна

Ганчева, Ася Костадинова, Ивайло Еленков, Нина Янчева, Русина Гроздева, Марияна Стойчева, Иван Балтаджиев, Цеца Дойчинова, Лилия Пекова, Минас Козмидис, Радослава Емилова, Мария Николова. Шеста национална научна конференция по HIV и коинфекции, 2 – 3 декември 2022, Астория гранд хотел, София - постер

15. Молекулярно-вирусологичен анализ на трансмисионните клъстери на найразпространените HIV-1 субтиповете България (предварителен анализ) **Любомира Григорова**, Александра Парцунова, Ренета Димитрова, Анна Ганчева, Ася Костадинова, Ивайло Еленков, Нина Янчева, Мариана Стойчева, Иван Балтаджиев, Цеца Дойчинова, Лилия Пекова, Минас Козмидис и Ивайло Алексиев. Шеста национална научна конференция по HIV и коинфекции, 2 – 3 декември 2022, Астория гранд хотел, София - постер
16. Въвеждане и разпространение на разнообразни HIV-1 субтипове в България. Александра Парцунова, Ренета Димитрова, Анна Ганчева, Ася Костадинова, **Любомира Григорова** и Ивайло Алексиев. Шеста национална научна конференция по HIV и коинфекции, 2 – 3 декември 2022, Астория гранд хотел, София - постер

2023

17. Анализ на трансмисионната лекарствена резистентност и филогенетичните клъстери при пациенти с HIV-1 в България, 2012-2021. Ивайло Алексиев, **Любомира Григорова**, Александра Парцунова, Ренета Димитрова, Анна Ганчева, Ася Костадинова, Радослава Емилова и Мария Николова. Семинар „Фундаментални, транслиращи и клинични изследвания в областта на инфекциите и инфекциозната имунология“, Разлог, хотел Катарино, 10.05 – 11.05.2023 г. - постер
18. Трансмисионната лекарствена резистентност на HIV в България се предава посредством клъстери от различни трансмисионни групи и различни субтипове. (2012-2020). Ивайло Алексиев, **Любомира Григорова**, Александра Парцунова, Ренета Димитрова, Анна Ганчева, Ася Костадинова, Ивайло Еленков, Нина Янчева, Русина Гроздева, Димитър Страшимиров, Марияна Стойчева, Иван Балтаджиев, Цеца Дойчинова, Лилия Пекова, Минас Козмидис, Радослава Емилова и Мария Николова. X Национална научна конференция „ХИВ и екзотични паразитни и инфекциозни болести в пост пандемичния период на COVID-19“, 25 – 28 май 2023 г., Цигов чарк - постер

Участия в научни форуми в чужбина

2022

1. Antiretroviral monitoring of people living with HIV/AIDS in Bulgaria, experience from the past and future perspectives. Ivaylo Alexiev, Alexandra Partsuneva, **Lyubomira Grigorova**, Reneta Dimitrova, Anna Gancheva, Asya Kostadinova, Ivaylo Elenkov, Nina Yancheva, R. Grozdeva, Mariana Stoycheva, Tsetsa Doichinova, Lilia Pekova, Minas Kosmidis, Radoslava Emilova and Maria Nikolova. HIV Sibiu Dialogues V, 26-28 May 2022 - доклад

2023

2. Transmitted HIV drug resistance mutations in Bulgaria are mainly identified in transmission clusters among men who have sex with men (Preliminary Analysis 2012-2020). Ivailo Alexiev, **Lyubomira Grigorova**, Alexandra Partsuneva, Reneta Dimitrova, Anna Gancheva, Asya Kostadinova, Ivaylo Elenkov, Nina Yancheva, Rusina Grozdeva, Dimitar Strashimirov, Mariana Stoycheva, Ivan Baltadzhiev, Tsetsa Doichinova, Lilia Pekova, Minas Kosmidis, Radoslava Emilova and Maria Nikolova. 21st European Meeting on HIV & Hepatitis 2023, Rome, Italy, 7-9 June 2023 - постер

Любомира Свиленова Григорова

Молекулярно-вирусологичен анализ на трансмисионните клъстери на въведените и
разпространени HIV-1 субтипове в България