



Сенсибилизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса

Христова Д., Кандова Я., Николов Г.✉, Петрунов Б.

Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария

Актуальность. В Болгарии часто встречается аллергия на плесневые грибы, сенсибилизация к различным аллергенам грибов обнаруживается у многих пациентов с атопией.

Цель данного исследования — установить чувствительность к наиболее распространенным видам плесневых грибов в Болгарии и определить с помощью компонентной диагностики наличие сенсибилизации к Alt a1 — одному из главных аллергенов *Alternaria alternata*.

Материалы и методы. В обследование включен 21 пациент с респираторной аллергией в возрасте 5–40 лет. Сенсибилизация к микстам грибковых аллергенов, содержащих *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, у всех пациентов доказана посредством диагностики *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, все пациенты тестированы с помощью «ImmunoCAP» на наличие аллергенспецифических IgE к отдельным грибковым аллергенам: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* и m6 *Alternaria alternata*. У 10 из обследованных пациентов с повышенным IgE к m6 *Alternaria alternata* проведена компонентная диагностика с помощью Alt a1.

Результаты. Все обследованные пациенты имели повышенный уровень IgE к *Alternaria alternata*. Из них 10 (48%) пациентов проявили чувствительность только к *Alternaria alternata*. У 8 (38%) пациентов выявлена сенсибилизация к *Penicillium notatum*, у 11 (52%) — к *Cladosporium herbarum* и у 10 (48%) — к *Aspergillus fumigatus*; 9 (90%) пациентов с сенсибилизацией к *Alternaria alternata* имели повышенный уровень IgE к Alt a1.

Выводы. *Alternaria alternata* чаще других видов плесневых грибов вызывает сенсибилизацию у пациентов с респираторной аллергией в Болгарии. Компонентная алергодиагностика с использованием Alt a1 — главного аллергена плесени — дает полное доказательство видоспецифической сенсибилизации к *Alternaria alternata*.

Ключевые слова: аллергия на плесневые грибы; аллергия на *Alternaria alternata*; компонентная диагностика с помощью Alt a1.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Христова Д., Кандова Я., Николов Г., Петрунов Б. Сенсибилизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020; 97(2): 119–124.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-119-124>

Поступила 02.03.2020
Принята в печать 20.03.2020

Sensitization to Fungal Allergens in Patients with Respiratory Allergy — Accuracy in Diagnostic Process

Diana Hristova, Yana Kandova, Georgi Nikolov✉, Bogdan Petrunov

National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, 1504, Bulgaria

Introduction. In Bulgaria, mold allergies are common, and sensitization to different fungal species is found in many patients with atopy.

The objective of this study is to explore sensitization to the most widespread mold species in Bulgaria, and to determine the extent of sensitization to Alt a1, a major allergen of *Alternaria alternata*, by using component-resolved diagnosis.

Materials and Methods. 21 patients (14 males and 7 females, age range 5–40 years), with respiratory allergy participated in the study. All patients are sensitized to mix of fungal allergens containing: *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, proved by *in vivo* and *in vitro* methods. All patients

underwent the ImmunoCAP test and were assessed for sIgE to individual fungal allergens: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* and m6 *Alternaria alternata*. The component-resolved diagnosis to Alt a1 was performed for 10 patients with increased sIgE to m6 *Alternaria alternata*.

Results. All studied patients (100%) had elevated sIgE to *Alternaria alternata*. Eight (38%) patients were sensitized to *Penicillium notatum*. 11 (52%) and 10 (48%) patients were sensitized to *Cladosporium herbarum* and to *Aspergillus fumigatus*, respectively. Ten patients (48%) were monosensitized to *Alternaria alternata*. Nine (90%) patients with sensitization to *Alternaria alternata* demonstrated elevated levels of IgE to Alt a1.

Conclusion. *Alternaria alternata* most often causes sensitization in patients with respiratory allergy. The component-resolved diagnosis using Alt a1 is a precision marker to prove species-specific sensitization to *Alternaria alternata*.

Keywords: mold allergy; allergy to *Alternaria alternata*; Alt a1 component-resolved diagnosis.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Hristova D., Kandova Ya., Nikolov G., Petrunov B. Sensitization to fungal allergens in patients with respiratory allergy — accuracy in diagnostic process. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(2): 119–124. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-119-124>

Received 2 March 2020
Accepted 20 March 2020

Введение

Плесневые грибы являются существенным компонентом биоаэрозолей окружающей среды, и многие их аллергены связывают с аллергическими заболеваниями человека, в том числе с аллергическим ринитом, конъюнктивитом, бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным микозом. В этом плане плесени оказывают более значимое воздействие на иммунную систему пациента, чем пыльца или другие бытовые аллергены [1]. Из-за благоприятных климатических условий аллергия на плесень часто встречается в Болгарии, и сенсibilизация к плесневым грибам обнаруживается у многих пациентов с атопией. Основные виды плесневых грибов, которые чаще всего вызывают сенсibilизацию в стране, — это *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus*. Ранее мы показали, что 6% взрослых и детей, тестированных за последние 5 лет в отделе аллергологии, были моносенсibilизированы к плесневым аллергенам [2, 3]. Аллергия на плесень может быть диагностирована при помощи кожно-аллергических проб (прик-тест или интрадермальный тест) с аллергенными экстрактами из плесени или *in vitro* тестами определения в сыворотке крови специфических IgE к плесневым аллергенам. К сожалению, среди плесневых экстрактов аллергенов часто встречается перекрестная реактивность. Это явление уменьшает точность анализа, в связи с чем необходимы ясные алгоритмы прецизионной диагностики аллергии на плесени [4, 5]. Для преодоления ограничений в диагностике на основе натуральных аллергенных экстрактов в последнее время в Европе применяют новый *in vitro* метод молекулярной, или компонентной, диагностики аллергии (CRD), который использует индивидуальные рекомбинантные или нативные аллергенные молекулы. Тесты осуществляются

посредством флуоресцентного иммуноанализа автоматической системой («ImmunoCAP») или на основе мультиплексных микрочиповых методик [6].

Целью данного исследования является изучение сенсibilизации к наиболее распространенным видам плесневых грибов в Болгарии, а также определение посредством CRD степени сенсibilизации к Alt a1 — главному аллергену *Alternaria alternata*.

Материалы и методы

В исследование включен 21 пациент (14 человек мужского пола и 7 — женского, в возрасте 5–40 лет), у которых выявлены симптомы респираторной аллергии. У 7 из них был аллергический ринит, у 9 — бронхиальная астма, а у 5 — бронхиальная астма в сочетании с аллергическим ринитом. У всех пациентов обнаружен положительный кожный тест к групповому фунгальному аллергену Д1 («Vul Bio NCIPD», Болгария), содержащему *Alternaria alternata*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*. В сыворотке крови у всех пациентов выявлен повышенный уровень аллергенспецифических IgE (sIgE) к миксту плесневых аллергенов Mx1 (класс 2–4), содержащему *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* и *Aspergillus fumigatus* («Phadia»).

У пациентов, включенных в исследование, определяли с помощью «ImmunoCAP» наличие sIgE к следующим индивидуальным натуральным плесневым аллергенам: m1 *Penicillium notatum*, m2 *Cladosporium herbarum*, m3 *Aspergillus fumigatus* и m6 *Alternaria alternata* («Phadia»). Исследование проводили согласно инструкции производителя, при этом количество специфического sIgE выражали в KUA/L, где уровень выше 0,35 KUA/L считался повышенным.

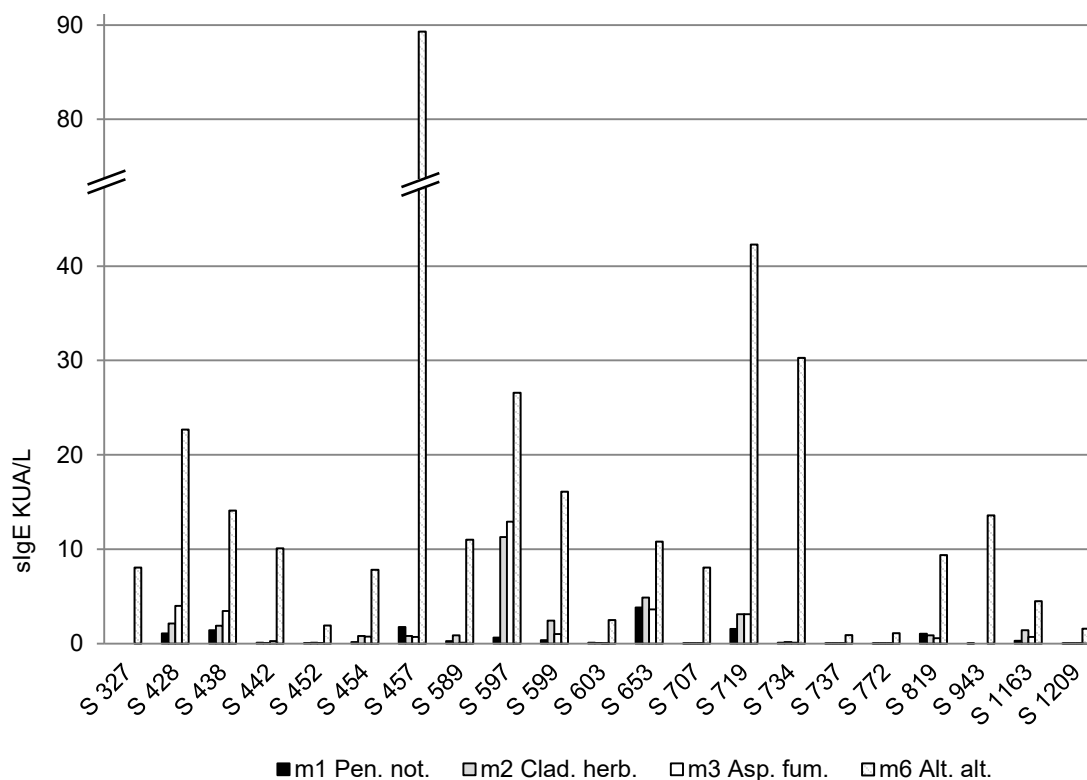


Рис. 1. Определение sIgE к индивидуальным аллергенным экстрактам плесневых грибов.
Fig. 1. Determination of sIgE to individual allergenic mold extracts

В сыворотках 10 пациентов с повышенным sIgE к m6 *Alternaria alternata* (5 — с моносенсибилизацией и 5 — с полисенсибилизацией к другим плесневым аллергенам) посредством «ImmunoCAP» определяли sIgE к m229 Alt a1 («Phadia»).

Результаты обработаны при помощи пакета статистических программ «GraphPad Prism 6.0» («GraphPad Software, Inc.»). Подсчитана средняя величина (*M*) и стандартная ошибка среднего (*SEM*). Тест ранговой корреляции Спирмена использован для выявления связи между двумя количественными показателями — количеством sIgE к m6 *Alternaria alternata* и sIgE к m229 Alt a1. Статистически значимыми приняты значения при $p < 0,05$.

Результаты

Полученные обобщенные уровни sIgE к индивидуальным аллергенным экстрактам исследованных видов плесени представлены на **рис. 1**.

У всех обследованных пациентов выявлен повышенный уровень sIgE к *Alternaria alternata* — в среднем $15,84 \pm 8,52$ KUA/L. Восемь (38%) пациентов оказались сенсибилизированы к *Penicillium notatum* со средним уровнем sIgE $1,46 \pm 0,73$ KUA/L. У 11 (52%) пациентов выявлены также sIgE к *Cladosporium herbarum* и у 10 (48%) — к *Aspergillus fumigatus* в количестве $2,79 \pm 1,83$ и $3,08 \pm 2,31$ KUA/L соответственно.

При анализе данных каждого пациента получены следующие профили сенсибилизации (**таблица**),

Профили сенсибилизации к исследованным плесневым аллергенам у пациентов с респираторной аллергией Sensitization profiles to the studied fungal allergens in patients with respiratory allergy

№	Профили сенсибилизации Sensitization profile				Число пациентов Number of patients	
	Pen. not.	Clad. herb.	Asp. fum.	Alt. alt.	абс. / abs.	%
1	–	–	–	+	10	48
2	+	+	+	+	8	38
3	–	+	+	+	2	9,5
4	–	+	–	+	1	4,5

позволившие разделить пациентов на 2 основные группы:

- 10 (48%) пациентов оказались моносенсibilизированными к *Alternaria alternata*;
- 11 (52%) пациентов были чувствительны к более чем одному виду плесени, при этом 8 (38%) из них имели sIgE к 4 тестируемым плесневым аллергенам.

У 10 пациентов с сенсibilизацией к *Alternaria alternata* была проведена моноконпонентная молекулярная диагностика аллергии на *Alternaria alternata* с использованием рекомбинантного Alt a1 аллергена (rAlt a1). Результаты исследования представлены на рис. 2.

Полученные данные показали, что 9 (90%) пациентов с сенсibilизацией к *Alternaria alternata* имеют повышенный уровень sIgE к rAlt a1. Тест ранговой корреляции Спирмена показал высокую ($r_s = 0,9152$) положительную и статистически значимую корреляцию ($p = 0,0003$) между сывороточным уровнем IgE к m6 *Alternaria alternata* и к rAlt a1 у обследованных пациентов.

Обсуждение

Исследования, проведенные в разных частях мира, показали, что сверхчувствительность к плесени встречается часто, особенно среди индивидов с респираторной аллергией. Точная величина распространения сенсibilизации к плесени неизвестна, цифры варьируют от 3 до 10% общей популяции [7]. Наиболее часто с развитием аллергии связаны 4 рода плесневых грибов: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* и *Aspergillus* [8]. В результате многих исследований установлено, что *Alternaria alternata* является одним из наиболее важных плесневых грибов, вызывающих аллергию в Европе, и до 70% пациентов показывают положительный кожный тест

на *Alternaria alternata*. Кроме того, доказано, что он является фактором риска развития астмы [7–9]. Наше исследование также показало, что большинство пациентов с аллергией к плесени сенсibilизированы преимущественно к *Alternaria alternata*, и у 48% из них выявлена моносенсibilизация. Остальные 52% пациентов были сенсibilизированы более чем к одному виду плесени, а 38% из них имели sIgE ко всем 4 исследованным плесневым аллергенам. Это еще раз подтверждает наблюдение многих исследователей, что пациенты, чувствительные к плесени, скорее всего, сенсibilизированы к нескольким ее видам [3, 4, 8].

Современная постановка диагноза аллергии на плесневые грибы является поэтапным процессом, который включает сбор анамнеза, кожно-аллергическое тестирование, определение общих и аллергенспецифических IgE в сыворотке крови и, если необходимо, проведение провокационных тестов [10]. Для повышения точности диагноза аллергии на плесень все чаще используют метод молекулярной, или компонентной, алергодиагностики с отдельными рекомбинантными или естественными аллергенными молекулами. Alt a1 — это аллергенная молекула *Alternaria alternata*, которую распознают антитела к IgE у 80–90% пациентов с аллергией на *Alternaria* [11]. Это и определяет Alt a1 как мажорный аллерген, к которому в основном сенсibilизированы пациенты. Поскольку молекула Alt a1 уникальна для данного вида плесневого гриба, сенсibilизация к этому аллергену определяется как видоспецифическая для *Alternaria alternata* [12, 13]. Таким образом, наличие сенсibilизации к Alt a1 можно использовать как маркер точности доказательства аллергии на данный вид плесени [14, 15].

Наши результаты моноконпонентной молекулярной диагностики при помощи rAlt a1 показыва-

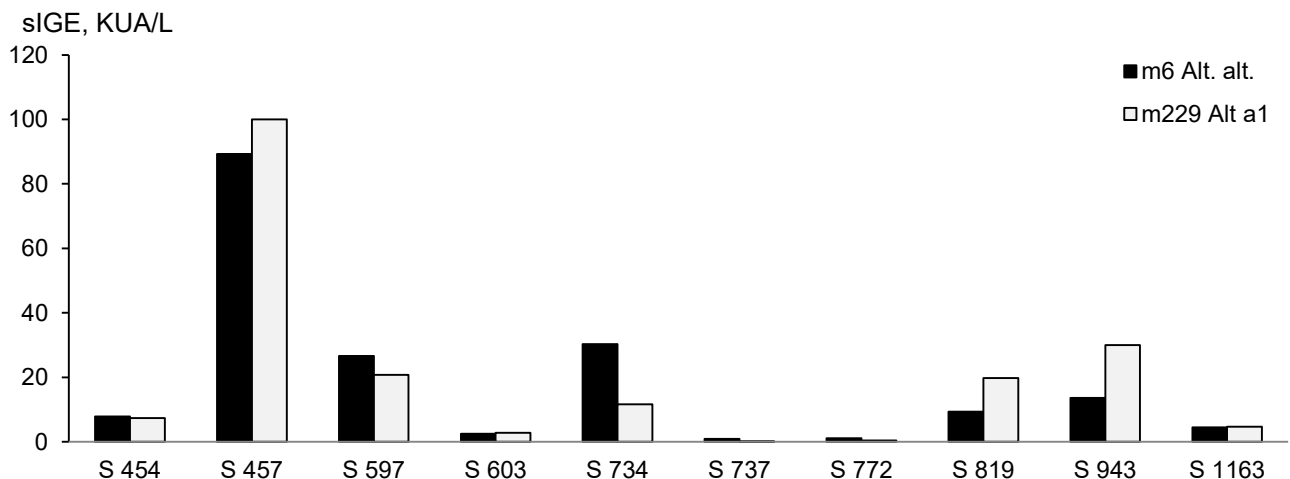


Рис. 2. Сравнение уровней sIgE к натуральному экстракту *Alternaria alternata* (m6) и sIgE к rAlt a1, полученных методом молекулярной диагностики пациентов с респираторной аллергией.

Fig. 2. Comparison of the amounts of sIgE to crude extract of *Alternaria alternata* (m6) and results of CRD with rAlt a 1 in patients with respiratory allergy.

ют, что 90% обследованных пациентов с сенсибилизацией к *Alternaria* имеют повышенный уровень IgE к rAlt a1 с высокой положительной ($r_s = 0,9152$; $p = 0,0003$) корреляцией с сывороточным уровнем IgE к *Alternaria*.

Одно из последних исследований, включающее 80 европейских пациентов, показало, что rAlt a1 может быть использован для диагностики 98% пациентов с аллергией на *Alternaria alternata* и что почти все специфические IgE у этих пациентов направлены против Alt a1 [16]. Такое заключение предполагает, что Alt a1 можно использовать в качестве надежного диагностического маркера видоспецифической сенсибилизации к *Alternaria* и он может быть альтернативой натуральному экстракту *Alternaria* в диагностических *in vitro* панелях.

Естественный аллергенный экстракт *Alternaria alternata* содержит и другие аллергенные молекулы, некоторые из которых тоже могут быть идентифицированы как мажорные аллергены [17]. Например, Alt a2 (альдегиддегидрогеназа) — видоспецифический аллерген и Alt a5 (энолаза) — паналлерген, который находится в некоторых фунгальных аллергенных экстрактах [18]. Перекрестная реактивность *Alternaria alternata* с другими видами плесневых грибов, которые распространяются воздушным путем, подробно описана и может быть обусловлена другими аллергенными молекулами [19]. Есть доказательства, что значительная доля пациентов, чувствительных к *Alternaria alternata*, полисенсибилизирована к более чем одному виду плесневых грибов и может также быть сенсибилизирована к другим источникам аэроаллергенов в окружающей среде: пыльце, клещам или даже пищевым аллергенам [8]. По-видимому, наличие такого высокого процента полисенсибилизации к различным видам плесневых грибов у пациентов, включенных в настоящее исследование, может быть вызвано перекрестной реактивностью.

Заключение

Alternaria alternata чаще всего приводит к сенсибилизации у пациентов с респираторной аллергией. Уровень аллергенспецифических IgE к данному виду плесневого гриба наиболее высокий и наблюдается в большом проценте случаев у пациентов с моносенсибилизацией. Молекулярную компонентную диагностику с помощью rAlt a1 можно использовать как маркер для доказательства видовой сенсибилизации к *Alternaria alternata*. Более того, этот рекомбинантный аллерген может быть альтернативой использованию натурального экстракта *Alternaria* в диагностических *in vitro* панелях. Идентификация и характеристика полного спектра аллергенов *Alternaria* и разработка новых методов, основанных на аллергенных рекомбинантных белках, позволит получать более качественные тесто-

вые решения для улучшения диагностики аллергии на *Alternaria alternata* и другие плесневые грибы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Cramer R., Weichel M., Flückiger S., Glaser A.G., Rhyner C. Fungal allergies: yet unsolved problem. *Chem Immunol. Allergy*. 2006; 91: 121-33.
DOI: <http://doi.org/10.1159/000090276>
2. Nikolov G., Kandova Y., Hristova R., Nedyalkov M., Petrunov B. The role of fungal allergens in respiratory diseases in Bulgaria. In: *Allergy, Asthma & Immunology: From Basic Science to Clinical Application. Proceedings of the V World Asthma and COPD Forum*. New York; 2012: 47-54.
3. Horner W.E., Helbling A., Salvaggio J.E., Lehrer S.B. Fungal Allergens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(2): 161-79.
4. Bush R.K., Portnoy J.M. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107(3 Suppl.): S430-40.
DOI: <http://doi.org/10.1067/mai.2001.113669>
5. Achatz G., Oberkofler H., Lechenauer E., Simon B., Unger A., Kandler D., et al. Molecular characterization of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* allergens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 409: 157-61.
DOI: http://doi.org/10.1007/978-1-4615-5855-2_21
6. Shreffler W.G. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127(4): 843-9.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.02.011>
7. Twaroch T.E., Curin M., Valenta R., Swoboda I. Mold allergens in respiratory allergy: from structure to therapy allergy. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2015; 7(3): 205-20.
DOI: <http://doi.org/10.4168/aaair.2015.7.3.205>
8. Mari A., Schneider P., Wally V., Breitenbach M., Simon-Nobbe B. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clin. Exp. Allergy*. 2003; 33(10): 1429-38.
DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01783.x>
9. Asturias J.A., Ibarrola I., Ferrer A., Andreu C., Lopez-Pascual E., Quiralte J., et al. Diagnosis of *Alternaria alternata* sensitization with natural and recombinant Alt a 1 allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115(6): 1210-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.012>
10. Malling H.J., Dreborg S., Weeke B. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy. III. Diagnosis of *Cladosporium* allergy by means of symptom score, bronchial provocation test, skin prick test, RAST, CRIE and histamine release. *Allergy*. 1986; 41(1): 57-67.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1986.tb00276.x>
11. Yunginger J.W., Jones R.T., Nesheim M.E., Geller M. Studies on *Alternaria* allergen, III. Isolation of a major allergenic fraction (ALT-I). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1980; 66(2): 138-47.
DOI: [http://doi.org/10.1016/0091-6749\(80\)90061-5](http://doi.org/10.1016/0091-6749(80)90061-5)
12. Chruszcz M., Chapman M.D., Osinski T., Solberg R., Demas M., Porebski P.J., et al. *Alternaria alternata* allergen Alt a 1: A unique β -barrel protein dimer found exclusively in fungi. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130(1): 241-7.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.047>
13. Duffort O., Barber D., Polo F. Quantification assay for the major allergen in *Alternaria alternata*, Alt a1. *Alergol. Immunol. Clin.* 2002; 17(3): 162-172.
14. Kustrzeba-Wójcicka I., Siwak E., Terlecki G., Wolańczyk-Mędrała A., Mędrała W. *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014; 47(3): 354-65.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s12016-014-8447-6>
15. Gabriel M.F., Postigo I., Tomaz C.T., Martinez J. *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of

- fungi-induced respiratory allergy. *Environ. Int.* 2016; 89-90: 71-80.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.003>
16. Twaroch T.E., Focke M., Fleischmann K., Balic N., Lupinek C., Blatt K., et al. Carrier-bound Alt a 1 peptides without allergenic activity for vaccination against *Alternaria alternata* allergy. *Clin. Exp. Allergy.* 2012; 42(6): 966-75.
DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.03996.x>
17. Sanchez H., Bush R.K. A review of *Alternaria alternata* sensitivity. *Rev. Iberoam Micol.* 2001; 18(2): 56-9.
18. Simon-Nobbe B., Probst G., Kajava A.V., Oberkofler H., Susani M., Cramer R., et al. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106(5): 887-95.
DOI: <http://doi.org/10.1067/mai.2000.110799>
19. Gupta R., Singh B.P., Sridhara S., Gaur S.N., Kumar R., Chaudhary V.K., et al. Allergenic cross-reactivity of *Curvularia lunata* with other airborne fungal species. *Allergy.* 2002; 57(7): 636-40.
DOI: <http://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.03331.x>

Информация об авторах:

Христова Диана — Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9710-1312>

Кандова Яна — доц., Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2765-7558>

Николов Георгий — доц., отдел иммунологии, Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2949-7834>.
E-mail: labalerg@ncipd.org

Петрунов Богдан — Национальный центр инфекционных и паразитарных болезней, 1504, София, Болгария.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8435-6175>

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Diana Hristova — National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9710-1312>

Yana Kandova — Assoc. prof., National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2765-7558>

Georgi Nikolov — Assoc. Prof., Department of immunology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2949-7834>.
E-mail: labalerg@ncipd.org

Bogdan Petrunov — National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504, Sofia, Bulgaria.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8435-6175>

Contribution: the authors contributed equally to this article.