

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“**

Медицински факултет

Катедра „ Хирургични болести, акушерство и гинекология “

---

**д-р Славена Емилова Стойкова**

**Клинично и прогностично значение на SARS-CoV-2 в  
предния очен сегмент при хоспитализирани пациенти с  
Ковид инфекция**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

професионално направление: 7.1 Медицина

Научна специалност: „Очни болести“

Научен ръководител:

Доц. Дида Казакова, дм

София, 2025

Дисертационният труд е представен на 135 страници и съдържа 52 таблици, 60 фигури, 8 снимки и 2 схеми. Библиографската справка включва 143 заглавия, като пет са на кирилица. Списъкът на авторските публикации и презентации по темата включва 3 статии и 2 доклада.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насрочен за защита от катедрен съвет на катедра “Хирургически болести, акушерство и гинекология” към Медицински факултет на Софийски университет “Св. Климент Охридски”.

Публичната защита на дисертационния труд пред Научното жури ще се състои в Деканата на Медицински Факултет на СУ, ет.2 зала 1 на 17 юни 2025г.

**Научно жури:**

**Председател:**

проф. д-р Любомир Димитров Спасов, дм

**Рецензенти:**

Проф. д-р Христина Николаева Видинова-Захова, дмн

Проф. д-р Радка Младенова Аргирова, дмн

**Членове:**

Полк. доц. д-р Атанас Димитров Калайджиев, дм

Доц. д-р Велислава Илиева Терзиева, дм

Благодаря на колегите за всеотдайността, с която споделихме отговорността и грижата за пациентите в Ковид отделениято на Болница Лозенец, на медицинските специалисти, с които преодоляхме безпрецедентната пандемична обстановка, както на моето семейство за абсолютната подкрепа.

I.	УВОД	6
II.	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	7
2.1.	Същност и принципи на PCR изследването	7
2.2.	Епидемиология и патогенеза на промените в ПОС при пациенти с Ковид инфекция	9
2.3.	Сравнителни проучвания на резултатите при наличие на SARS-CoV-2 в ПОС и корелацията с офталмологични усложнения и с хода на Ковид заболяването	10
a.	Ангажиране на конюнктивата	12
b.	Ангажиране на субконюнктивната тъкан и еписклерата	14
c.	Ангажиране на клепачите	14
III.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	16
IV.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	17
4.1.	Клиничен материал	17
4.2.	Методи на изследването	17
4.2.1.	Оценка на очния статус на пациентите	17
4.2.2.	Субективни очни оплаквания	19
4.2.3.	Обективни офталмологични находки	20
4.2.3.1.	Хиперемия на конюнктивата	21
4.2.3.2.	Патологичен секрет от окото	21
4.2.3.3.	Оток на конюнктивата (хемоза)	21
4.2.3.4.	Багрене на роговиците с флуоресцеин	21
4.2.4.	Набиране на проби за изследване на SARS-CoV-2 в проби от назофаринкса и конюнктивния сак	23
4.2.4.1.	Набиране на проби за изследване на SARS-CoV-2 от назофаринкса за RT-PCR и БАТ	24
4.2.4.2.	Набиране на проби за изследване на SARS-CoV-2 от конюнктивния сак за RT-PCR	25
4.2.4.3.	Бърз антигенен тест за SARS-CoV-2 и изолиране на вирусна РНК	27
4.2.4.4.	Обратно транскрипционна полимеразно-верижна реакция в реално време (Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – RT-PCR)	28
4.2.5.	Компютъртомографско изследване на бял дроб	29
4.3.	Статистически методи	31
4.3.1.	Хи квадрат анализ тест и точен тест на Фишер	31
4.3.2.	Дисперсионен анализ	32
4.3.3.	Обработка на данни	32
V.	СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ	32
5.1.	Едномерни разпределения	32
5.1.1.	Демографски характеристики на пациентите – възраст, пол, придружаващи състояния	32
5.1.2.	Офталмологични показатели	34
5.1.2.1.	Субективни очни оплаквания	34
5.1.2.2.	Обективна офталмологична находка хиперемия на конюнктивите, хемоза, сълзене и патологичен секрет	34
5.1.3.	Други регистрирани променливи	36
5.2.	Двумерни разпределения - наличие на SARS-CoV-2 в очен секрет, доказан посредством rt- PCR спрямо други наблюдавани показатели	38

5.2.1. Променливи, при които няма основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза за липса на статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба	38
5.2.2. Променливи, при които има основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза за липса на статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба	38
5.2.2.1. Хемоза на конюнктивите	38
5.2.2.2. Необходимост от допълнително подаване на кислород непосредствено при постъпването в стационара	40
5.2.2.3. Брой дни на допълнително подаван кислород в стационара	41
5.2.2.4. Приемани антибиотици в стационарни условия	44
5.2.2.5. Брой пациенти на механична вентилация в ОАИЛ по дни	47
5.2.2.6. Брой починали пациенти	48
VI. ОБСЪЖДАНЕ	50
VII. ИЗВОДИ	56
VIII. ПРИНОСИ	57
IX. БИБЛИОГРАФИЯ	57
X. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	65

## СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

**ACE2** Angiotensin-converting enzyme 2

**COVID-19** Корона вирусна болест 2019

**CoVs** –коронавируси

**CRP** С реактивен протеин

**CT** Computer tomography

**ЕСМО-** Extra Corporal Membrane Oxygenation /Екстракорпорална мембранна оксигенация

**HSV** Херпес симплекс вирус

**HCV** Хепатит С вирус

**LDH** Лактатдехидрогеназа

**PCR** Полимеразна верижна реакция

**RPE** Ретинен Пигментен Епител

**RT-PCR** Reverse transcription polymerase chain reaction

**SARS-CoV-2** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

**TMPRSS2** трансмембранна протеаза серин 2

**WBC** бели кръвни клетки

**АБ** антибиотик

**БАТ** Бърз Антигенен Тест

**БТЕ** белодробна тромбемболия

**ДО** дясно око

**ИЗ** История на заболяването

**КОВИД – 19** Корона вирусна болест 2019

**КТ** Компютърна томография

**ЛО** ляво око

**ОАИЛ** Отделение по анестезиология и интензивно лечение ОАИЛ

**ПЛВ** периферни лимфни възли

**ПОС** – преден очен сегмент

**ЧТ** чуждо тяло

## I. УВОД

Корона вирус е разговорното и широко разпространено наименование на Тежък Остър Респираторен Синдром Корона вирус 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 - SARS-CoV-2) (1). Представява щам на вирус от РНК групата причиняващ корона вирусна болест 2019 (COVID-19). Смята се, че има зоонотичен произход и близка генетична сходност с коронавирусите при прилепите, а за междинен естествен резервоар е посочен малайзийският паголин (*Manis javanica*), който е обект на нелегален лов и контрабанда. Предполага се, че именно този животински вид е свързан в прехвърлянето на вируса към хората. Вирусът показва малко генетично разнообразие, което индикира, че преливната инфекция, въвеждаща SARS-CoV-2 към хората, вероятно се е случила в края на 2019 г (2), когато се появяват и първите научно-медицински съобщения за инфекция на пациенти с този вирус (3). Заразяването при хора е докладвано първоначално в гр. Ухан (Wuhan), провинция Хубей (Hubei) Китай. Започва там като епидемичен взрив с множество засегнати от сериозно протичаща пневмония, докладвана от Wu et al. (4). Впоследствие заразата се разпространява във всички провинции на Китай и в повече от 25 други страни в Азия, Европа, Северна Америка и Океания. Разпространението от човек на човек е потвърдено във всички тези регион (5,6,7). Случаите нарастват лавинообразно и по данни на СЗО от първоначално 27 заболели през декември 2019 в град Ухан, те достигат и надхвърлят 3 милиона в световен мащаб към 30 април 2020г. Коронавирусната болест се превръща много бързо в заплаха за общественото здраве и скоро е обявена глобална пандемия (8).

Инфекцията със SARS-CoV-2 обикновено дебютира като заболяване на дихателните пътища, може да се разгърне до тежко полиорганно засягане, често оставя и дълготрайни здравни смущения след преболедуване. Към продромите на заболяването и като придружаващи оплаквания се докладват дразнене в очите и зачервяване, което прави конюнктивитът честа проява на SARS-CoV-2 инфекцията. Предвид настъпващите промени в реологията на кръвта и патологичната хемостаза, има все повече съобщения за засягане на увеята, на ретината и както други невроофтальмологични находки, например аномалии в зеничните реакции, смутен очен мотилитет, оптични неврити (9).

SARS-CoV-2 е заразен и без наличие на респираторни синдроми. Той може да бъде доказан върху очната повърхност и в слъзния филм чрез PCR. Това означава, че са необходими сериозни предпазни мерки както в офталмологичните практики, така и в общомедицинските амбулатории.

В научните среди широко се дискутира не само редуцирането на рисковете от контаминация, но клиничното и прогностично значение на коронавирусните антигени в слъзния филм. Целта е намаляване медицинските рискове за лекуваните и лекуващите ги, осигуряване пълноценна диагностика и по- добро качество на живот на пациентите.

Ковид-19 с неговите системни симптоми и последствия се изучават активно в последните години на пандемия. След успокояването на епидемичната обстановка става възможен по-качествен анализ и обстойна интерпретация на натрупаните материали и данни. Все още не са известни достатъчно подробности относно характеристиката, продължителността и значението на очните прояви при хоспитализирани пациенти с Ковид-19.

## **II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР**

### **2.1. Същност и принципи на PCR изследването**

Полимеразната верижна реакция, известна като PCR, е патентована процедура на експоненциално усилване на ДНК фрагменти. Позната е и под други наименования като *realtime PCR*, обратна транскриптаза PCR, qPCR – количествена PCR. Представлява незаменим и еднозначен метод при диагностика на инфекциозни причинители, генетични клетъчни промени, причиняващи заболявания, ракови клетки и пр., които могат да бъдат пропуснати с други тестове.

PCR тестовете изискват вземане на проба от кръв, тъкан или телесна течност. Пробата съдържа собствена ДНК на организма и вероятна ДНК на очаквания патоген или раково променена клетка. Добавя се ензим, наречен Таq-полимераза, както и специално изработени къси нуклеотидни последователности – т.нар. праймери – които да разпознаят специфични участъци от търсената ДНК, която при използване на специална апаратура и при специфични условия се мултиплицира в множество копия. Този процес се повтаря няколкократно. За около 60 мин се достигат близо 1 млрд репликации, а наличието на патологичната ДНК се засича и индикира от апарата.

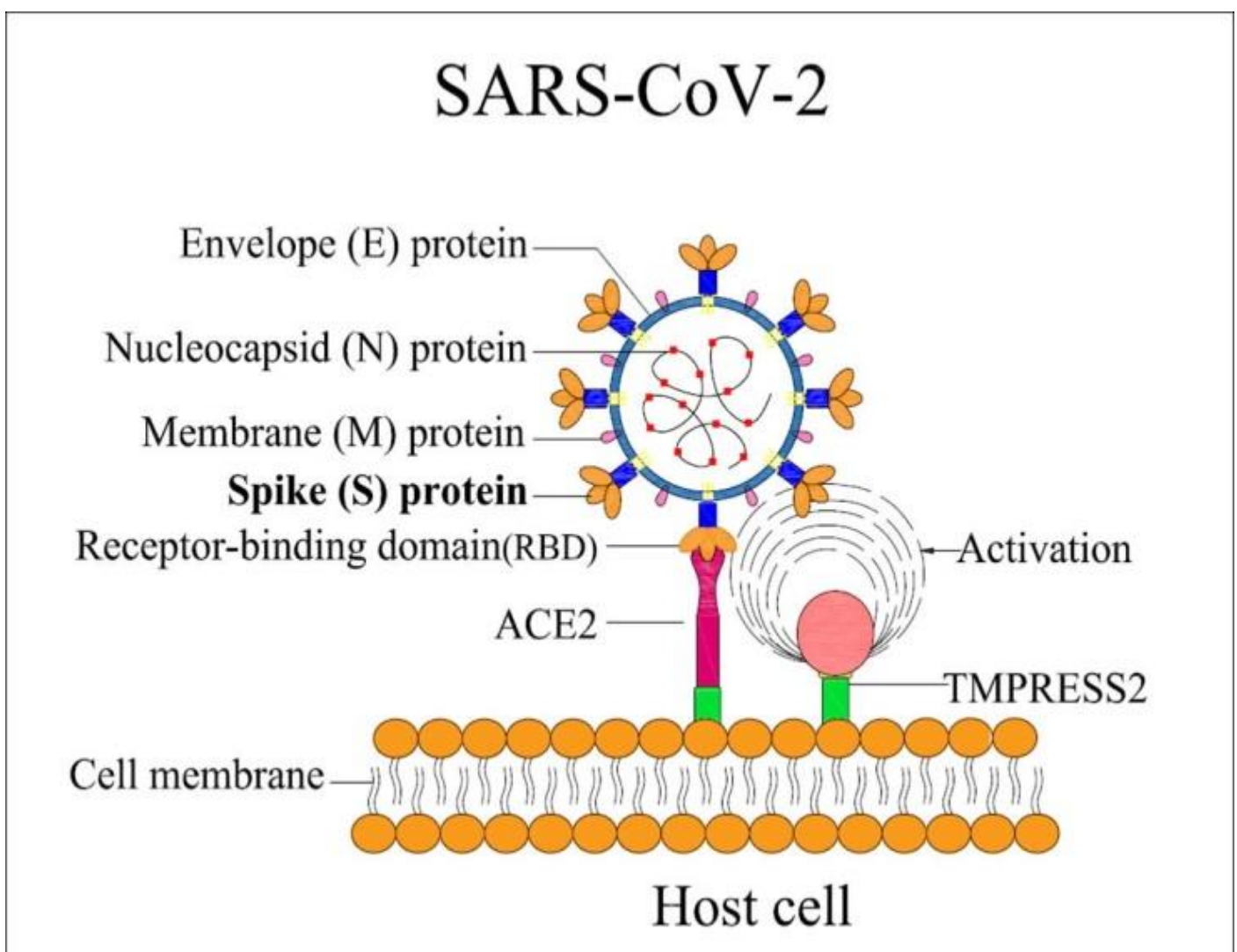
Поради факта, че има изключително нисък праг на чувствителност - регистрира дори една единствена молекула, PCR идеален качествен метод за специфична детекция на редки ДНК последователности. Получаването на умножените ДНК е пропорционално на началния брой таргетни молекули и затова методът може да се ползва като средство за количествен анализ. Прилага се в разнообразни области на науката - биология, биотехнология, клинични изследвания, криминалистика, хранене, археология, антропология и други. Независимо, че съществуват и други технологии за изследване на нуклеинови киселини, PCR методът остава най- широко разпространен (10).

Някои вируси, вкл. SARS-CoV-2, спадат към групата на РНК вирусите. При тях е необходимо преди процеса на копиране, РНК да се конвертира в ДНК. Процесът се нарича обратна транскриптаза PCR (rt-PCR). Чрез т.нар. количествена PCR (qPCR) може да се измери натоварването с патогена на пробата. qPCR може да се извърши едновременно с PCR или rt-PCR.

SARS-CoV-2 представлява едноверижен РНК вирус, чийто геном има дължина около 30 kb и близо 80% сходство с Sars-CoV на нуклеотидно ниво (11). Геномът на

всички познати коронавируси (CoVs) кодира четири основни структурни протеина (Фиг.1):

- (1) спайк (S) протеин, отговаря за прикрепването към рецепторите на приемника
- (2) мембранен (M) протеин, спомага моделирането на вирионните частици и свързването с нуклеокапсида
- (3) обвиващ **envelope** (E) протеин, играе роля при сформирването и освобождаването на частиците
- (4) нуклеокапсиден (N) протеин, улеснява свързването на генома към комплекса репликация- транскрипция, който е необходим за репликацията на генетичния материал (12).



Фигура 1 Схематично изображение на SARS-CoV-2 вирус (13)

Като диагностичен тест за наличие на корона вируси може да се ползва слюнка, но като метод с по-добра достоверност, обичайно се изработва проба от носен секрет.

Работи се със секрет от предната част на носа и ноздрите, също така и от назофаринкса и по-точно под средна носна конха.

## **2.2. Епидемиология и патогенеза на промените в ПОС при пациенти с Ковид инфекция**

Понастоящем се работи с няколко теории относно етиологията и патогенезата на очните симптоми, асоциирани с Ковид инфекция.

Очната повърхност с основание се посочва като потенциален път на проникване на SARS-CoV-2 вируса в организма. Той използва ангиотензин конвертаза 2 - ACE 2 като рецептор за навлизане в клетките като с него се свързва неговия S протеин. Протеазата TMPRSS2 го разцепва, прави възможно сливането на вирусната и клетъчната мембрана и така CoVs навлизат в гостоприемника (14,15,16). Освен в дихателните пътища, в роговицата и конюнктивата също има експресия на ACE2 рецептори, които са подозирани като вероятен механизъм за директна инвазия на вируса и за последвалите очни прояви. Известно е, че навлизането на коронавирусите в клетките се осъществява чрез свързване на специфичния S протеин към клетъчния рецептор и активиране на праймера от протеазите на гостоприемника. SARS-CoV-2 също използва ензим ангиотензин конвертаза ACE2 като рецептор за проникване в клетките. Collin j. et al. установяват едновременна експресия на ACE2 рецептори и протеазата TMPRSS2 в конюнктивния, роговичния и лимбалния епител при възрастни, което причислява тези клетки от очната повърхност към възможните входни врати за инфекцията (17).

ACE2 рецептори са доказани в човешката ретина (18), RPE и хороидеята (19), което обяснява и другите прояви в задния сегмент на окото при пациенти с Ковид - съдови оклузии, витрит, хороидит, оптичен неврит.

Hu et al. докладват положителна очна PCR проба за SARS-CoV-2, комбинирана с човешки херпес вирус тип 1 и тип 6B при пациент с обструкция на нососълзния канал. Дори реконвалесцентни пациенти, без манифестни очни прояви, са подозрителни относно безсимптомно разпространение на инфекцията посредством телесни течности, включително слъза. Респираторният тракт вероятно не е единствен вход за Ковид вируса. От офталмологична гледна точка, при първоначалните съобщения относно епидемиологията, симптомите и лечението на заразен с новия коронавирус 2019-nCoV в Ухан, възможността за предаване чрез очите е била negliжирана и очни проби не са вземани и обработвани (20).

Впоследствие офталмологичната и научна общност започват проучвания относно доказване на наличен на вируса в слъзния секрет. Още през 2003 в статия на Loon et al. е описано пробовземане и PCR тест за SARS-CoV-2 в слъзен секрет на болни със суспектен остър респираторен дистрес синдром. 8% са положителните проби, които в случая биват използвани за потвърждаване на клиничните съмнения за заболяването (21). Още тогава е дискутирана възможността за ранно изолиране и доказване на вирусните нуклеинови киселини в най-ранна фаза на заболяването. Това би дало по-добри шансове за терапия на засегнатите, също и за навременното карантиниране и

прекъсване пътя на разпространението на инфекцията. Идеята за PCR изследване на проби от конюнктивен секрет се дискутира активно като достъпна и лесно изпълнима.

Незащитените очи и непокритите лигавици на носа и устата повишават риска на предаване на SARS-CoV-2. Рискът от заразяване чрез очните повърхности не бива да се пренебрегва. Докладван е клиничен случай на инфектиран медик, носил маска тип N95 без предпазни очила, също така и на офталмолози, инфектирани при рутинни очни прегледи от пациенти без обща симптоматика (22). Пръски, носители на инфекциозни елементи лесно попадат върху конюнктивния епител при непокрити очи. Отдавна е известно, че така се предават други видове респираторни вируси, например птичи грип, (23,24). Високата степен на контагиозност на SARS-CoV-2 обяснява необходимостта и провеждането на множество проучвания, уточняващи молекулните механизми, които улесняват проникването и разпространението на вируса. Към момента обаче възможните пътища на разпространение извън респираторния, остават неизяснени.

### **2.3. Сравнителни проучвания на резултатите при наличие на SARS-CoV-2 в ПОС и корелацията с офталмологични усложнения и с хода на Ковид заболяването**

Ковид-19 и неговите системни симптоми и последствия се изучават активно и имат до известна степен своето обяснение и единен подход на справяне със симптоматиката. Все още не са известни достатъчно подробности относно характеристиката, продължителността и значението на очните прояви при пациенти с доказан Ковид-19.

Sen, Mrittika et al. провеждат подробен обзор по темата за офталмологичните прояви при Ковид пациенти (36). Анализирани са 26 статии, където се описват 120 пациенти с промени в ПОС, корнеална симптоматика и съответна находка. Средна възраст на пациентите е  $45 \pm 15.3$  (24-72, медиана 46.9) год. Времевият промеждутък между COVID-19 симптомите и диагнозата и офталмологичните промени е средно  $8.5$  ( $11.1 \pm 8.8$ , 2–32) дни. Тези данни са представени в Таблица 1.

**Обзор на литературата и на публикациите относно проявите в ПОС и засягане на роговиците при пациенти с Ковид 19**

Проучване	Тип	Локация	Проби очно засягане/ общ брой изследвани	Възраст (години)	Интервал между Проявата на КОВИД 19 симптоматика/диагноза и офталмологичните симптоми	Диагноза
<b>Sindhuja et al. 2020</b>	Ретроспективен крос	Индия	11/127	38.8 медиана	Средно 9,4, при един от началото	Конгестия на конюнктивата, оток на клепачите, сълзене, хиперемия

<b>Nayak et al. 2020</b>	Клиничен случай	Индия	1	65	32		Фоликуларен конюнктивит
<b>Wu et al. 2020b</b>	Ретроспективен сериен	Китай	12/38	67 средна	-		Хемоза на конюнктивата, епифора, хиперемия, секреция
<b>Chen et al. 2020a</b>	Крос анализ	Китай	27/535	44 медиа на	-		Конгестия на конюнктивата
<b>Calinci et al. 2020</b>	Серия клинични случаи	Италия	5	46,8 средна	От началото		Хемоза на конюнктивата, епифора
<b>Chen et al. 2020b</b>	Клиничен случай	Китай	1	30	13		Фоликуларен конюнктивит
<b>Guan et al. 2020</b>	Ретроспективна кохорта	Китай	9/1099	47 медиа на	-		конюнктивит
<b>Colavita et al. 2020</b>	Клиничен случай	Италия	1	65	От началото		Конюнктивит
<b>Daruich et al. 2020</b>	Клиничен случай	Аржентина	1	27	От началото		Конюнктивна хиперемия, оток на клепачите
<b>Khavandi et al. 2020</b>	Клиничен случай	Иран	1	65	От началото		конюнктивит
<b>Salducci et al. 2020</b>	Клиничен случай	Италия	1	72	едновременно		конюнктивит
<b>Zhou et al. 2020 b</b>	Ретроспективна кохорта	Китай	1/67	35,7	От началото		конюнктивит
<b>Xia et al. 2020</b>	Проспективно интервенционално	Китай	1/30	53	3		конюнктивит
<b>Atum et al. 2020</b>	Проспективно интервенционално	Турция	10/40	41,3 средна	-		конюнктивит
<b>Zhang et al. 2020</b>	Крос анализ	Китай	2/72	-	От началото при един		конюнктивит
<b>Lan et al. 2020</b>	Крос анализ	Китай	3/81	-	16		Сухота, хемоза, оток, сърбеж
<b>Karimi et al. 2020</b>	Крос анализ	Иран	2/43	-	-		Усещане за чуждо тяло, фоликуларен конюнктивит
<b>Hong et al. 2020</b>	Крос анализ	Китай	15/56	50 средна	От началото при 6		Зачервяване, сухота, усещане за ЧТ, болка

<b>Seah et al.2020</b>	Проспективна серия случаи	Сингапур	1/17	-	17	Инекция на конюнктивата, хемоза
<b>Zhou et al.2020c</b>	Крос анализ	Китай	8/121	-	-	Дразнене, зачервяване, сълзене, усещане за ЧТ
<b>Goel et al. 2020</b>	Съобщение до редактора	Индия	2	38 средна	От началото	конюнктивит
<b>Cheema et al. 2020</b>	Клиничен случай	Канада	1	29	От началото	Кератоконюнктивит
<b>Guo et al. 2020</b>	Клиничен случай	Китай	1	53	10	Рецидивиращ вирусен кератоконюнктивит

Таблица 1. Обзор на литературата и на публикациите относно проявите в ПОС и засягане на роговиците при пациенти с Ковид 19, изготвен от Sen et al. (25)

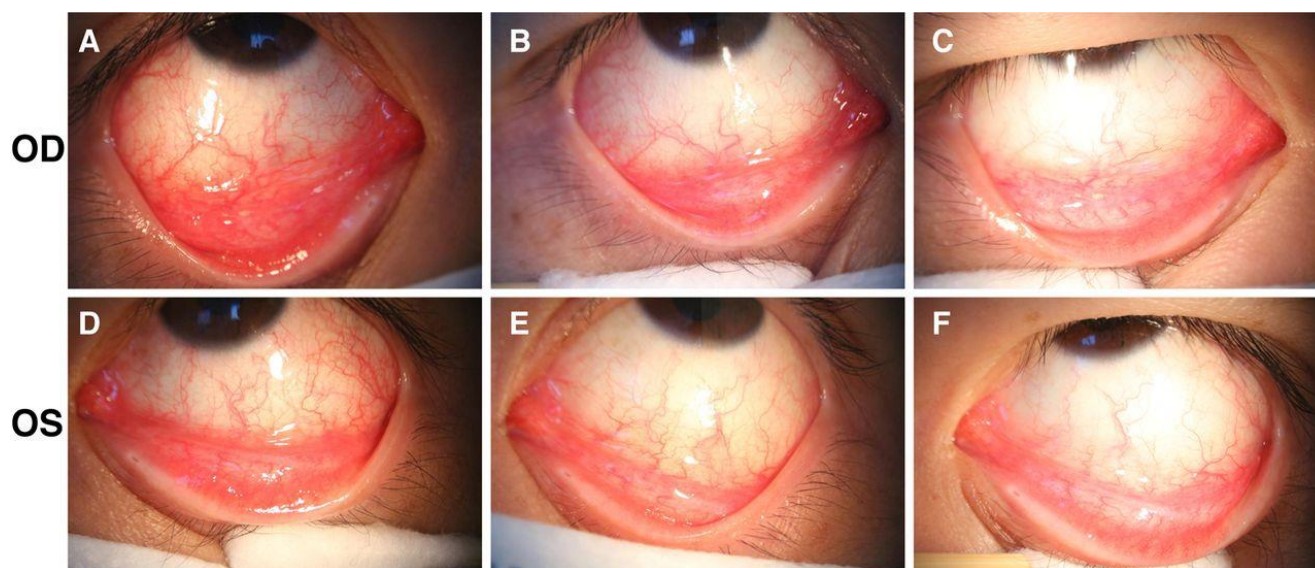
**а. Ангажиране на конюнктивата - фоликуларен, вирусен, хеморагичен и псевдомембранозен конюнктивит**

Най- разпространената находка в очния статус на пациентите с Ковид-19 е засягане на ПОС. Изразява се с конюнктивни промени, които могат да се класифицират като фоликуларен, вирусен, хеморагичен и псевдомембранозен конюнктивит.

Проявите в ПОС може да са остри – възникват до седмица и протрахиранни- след седмица. Морфологично находката е като при фоликуларен конюнктивит, с необилен воднист секрет, хиперемия и поява на лимфни фоликули. Това са подобни на паваж надигнати окръглени образувания по долния и горния клепачен тарз. Протрахираните случаи се отдават на забавения имунен отговор. При тях има по-дифузно разпространение, ангажирана е роговицата и има добра реакция след приложение на стероиди. Случаите на рецидивирали и забавени реакции на ПОС съпътстват по-тежки форми на Ковид заболяване в сравнение с острите конюнктивити (26).

При преглед на голяма серия случаи на пациенти с Ковид инфекция с умерена тежест, Sindhuja et al. докладва конюнктивит при 11 от 127 души (8.66%). Клинично се изразява в зачервяване на едното или на двете очи, а наличието конюнктивната конгестия се свързва и с дихателни проблеми. При четирима души има анамнеза за контакт ръка-око, но това не е прието като потвърден рисков фактор (27). В проучване на Chen et al. при 535 случая на пациенти с Ковид19, се показва, че контактът ръце-око корелира с конюнктивната симптоматика (26). Засягането на ПОС е най-често в междинната фаза на заболяването, като същият автор описва двустранен остър фоликуларен конюнктивит при пациент на 13тия ден от инфекцията (Сн.1). При него тогава се установява и SARS-CoV-2 антиген в конюнктивна PCR проба. Субективно

очните му оплаквания започват на 15тия ден и изчезват 5 дни след това. PCR тестът от сълзата се задържа положителен и на 17 ти ден като се негативира на 19ти ден.



Снимка 1. Биомикроскопско изследване на ПОС (28)

На 13 ден от заболяването (А и D) се вижда умерена конюнктивна инекция и фоликули в долен форникс. Не се установяват увеличени ПЛВ. На 17 ден (В и Е) и на 19 ден (С и F) се установява затихване на симптоматиката след локална терапия с *ribavirin* като очни капки (28).

Naayak et al. описват развитие на фоликуларен конюнктивит 4 седмици след тежка Ковид инфекция. Тъй като посевките от конюнктивния сак са отрицателни за бактериални култури и за гъбички, се подозира отделяне на SAR-CoV-2 частици от конюнктивата дори след негативиране на пробите от назофаринкса (29).

Вирусните конюнктивити протичат като кератоконюнктивити, при тях има засягане и на роговицата. Това от своя страна допълва симптоматиката с оплаквания от светлострашност, болка, епифора, замъглено зрение. При липса на подозирана Ковид инфекция и клиника за такава, находката напълно се покрива клинично както с херпесен, така и с епидемичен кератоконюнктивит и често се започва терапия за такива. Това показва, че находката в ПОС може да бъде единствена при носители на SARS-CoV-2 вирус (30).

Guo et al. описват пациент в Китай със средно тежка Ковид симптоматика и инфекция на ЛО, развила се 10 дни след заболяването. От конюнктивата чрез PCR е доказана SARS-CoV-2 вирусна РНК и отсъствие на аденовирус и HSV. Изследването е повторено неколkokратно, роговицата се описва като гладка, лъскава и прозрачна. След лечение с локален левофлоксацин и хиалуронова киселина, пациентът се подобрява за около седмица, а пет дни след това проявява двустранни корнеални дефекти в периферията, които се багрят с флуоресцеин. Поради доказаня SAR-CoV-2 антиген в конюнктивна проба, се счита, че първоначалният епизод на конюнктивита в ЛО се

дължи на локална инвазия на вируса и съответно възпаление. Последвалят рецидив, който е двустранен, вероятно е резултат от цитокинова вълна като автоимунен отговор, медиран от вируса (26).

Navel et al. докладват клиничен случай на пациент с тежък Ковид, лекуван в интензивно отделение, при който се проявява хеморагичен и псевдомембранозен конюнктивит 19 дни след системните симптоми (31).

#### **б. Ангажиране на конюнктивата на субконюнктивната тъкан и еписклерата**

Повечето случаи на еписклерит са идиопатични и най-често самоограничаващи се. Едва при около 30% се подозира връзка с вирусни инфекции, включително HSV, HCV, ебола и вероятно SARS-CoV-2 (32).

Otaif et al. описва млад мъж с оплаквания от усещане за ЧТ повече в ЛО, при преглед установена конгестия на конюнктивата и на склерата повече назално както е обичайно при вирусни инфекции на очите. Три дни след офталмологичната, се разгръща и обща Ковид симптоматика. При този пациент дебюта на заболяването е с еписклерит (33).

#### **с. Ангажиране на клепачите**

Описват се промени във вида на изходните отвърстия на Мейбомиевите жлези, хиперемия и телеангиектазии по миглените ръбове и отоци. Блефаритът категорично корелира с продължителността на Ковид заболяването. Може да се разгръне и като късна проява и е много вероятно да протича по-затегнато при хора с предиспозиция и променена предна очна повърхност. Meduri et al. описва находка при 30 от проучените пациенти (46).

Обобщено находката в ПОС и докладваните симптоми и оплаквания, както и тяхната честота на проявление, са представени в Таблица 2. Проявените в ПОС промени при Ковид пациенти варират широко от 0.81% до 34.5% ( 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45).

Оплаквания и симптоми	Честота
Сухота	6,9-37%
Болка	10,3-31,2%
Секрет	6,9-29,6%
Зачервяване	10,8-24,1%
Сълзене	9,7-22,2%
Усещане за ЧТ	6-18,5%
Фотофобия	2,6-16,1%
Дразнене	9,6-15,7%
Замъглено зрение	4,8-12,8%
Парене	8,4%
Хиперемия на мигления рѳб	34,5%
Залепване на миглите	24,1%
Промени в мейбомиевите жлези	20,7%
Фоликуларен конюнктивит	7,7-8,%
Хемоза	3,4
Еписклерит	2,2%

Таблица 2. Очни прояви в предния сегмент и клепачите при пациенти с Ковид 19-  
Източник: Sen et al (36)

Основен проблем при анализиране на данните, е неунифицираната методика за събиране на данните и за извършването на клиничен очен преглед, проведен в различни стадии на заболяването (27). При повече от половината публикации, симптомите в ПОС предхождат заболяването от Ковид. Има и такива, при които те са единствената му проява и PCR тестването е извършено по друг повод, например скрининг по повод посещение на рискови дестинации (46).

Aggarwal et al прави обзор и мета-анализ на 16 проучвания, при 6.9% от пациентите с тежка пневмония има симптоматика в ПОС, докато при средните и по-леки форми те са 4,13% (47). Други съпътстващи фактори, при които честотата на очни прояви е по-голяма са висок фебрилитет, напреднала възраст, високо съотношение Neu/Lymph и високи стойности на острофазови белтъци в кръвната картина (48). Wu et al съобщават за повече очни промени в ПОС при пациенти с високи стойности на левкоцитите, лактатдеhidрогеназата, CRP и прокалцитонина (35). Според много автори находките в конюнктивата корелират с тежестта на заболяването, а не с неговата продължителност. Като неуточнени остават случаи на много тежко болни с Ковид, лекувани в Интензивен сектор. При над 60% от тях има хемоза, болка в очите, конгестия на конюнктивите, но поради бъбречна недостатъчност, кардиопулмонални усложнения и ниска сатурация, наблюдаваните промени в ПОС е възможно да не са свързани единствено с Ковид-19 инфекцията (34).

В България Ц. Димитров публикува данни за регистрирани очни прояви при 1022 хоспитализирани пациенти с Ковид инфекция. Те са лекувани в УПМБАЛ „Св.

Йоан Кръстител“ София за периода 04.2020–07.2021 г и са представени данни за тяхната сатурация, нужда от кислородна суплементация, нуждата от преминаване към интензивно лечение и леталитета сред групата проучени. Разгледана е честотата на белодробни, сърдечни, гастроинтестинални, неврологични клинични оплаквания. От хоспитализираните 4,8% развиват блефарит, 5,01% са с конюнктивна конгестия, 9,8% с кератоконюнктивит, регистрирани са още еписклерит, обострен увеит, както и случаи на пареза на ЧМН VI и неврогенна птоза. При някои пациенти е потвърдено наличието на SARS-CoV-2 чрез RT-PCR в конюнктивна проба (49).

Идеята за вирусологично изследване на слъзен секрет за SARS-CoV-2 изхожда от вече утвърденото доказване чрез PCR на други нозеологични единици като например аденовирусни и херпесни вируси.

В литературата има данни за сравнителна оценка на назофарингеални и слъзни секрети за SARS-CoV-2 на болни с Ковид 19, лекувани в стационарни условия (50, 51) в интензивно отделение (52), както и студии с не едномоментно набиране на пробите (53, 54).

Azzolini et al. установяват наличие на вирусна РНК по очната повърхност на голяма част от изследвана кохорта пациенти с КОВИД. Някои от тях имат негативен назофарингеален и позитивен очен резултат и затова се обсъжда по-масово въвеждане на конюнктивното изследване като по-малко натоварващо за пациентите (55).

### **III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Базиращи на описанията в научната литература офталмологични особености при пациенти с COVID-19 и в съответствие на набрания собствен опит, е поставена за ЦЕЛ:

**Да се изследва връзката между наличието на SARS-CoV-2 в предния очен сегмент при възрастни пациенти с Ковид инфекция с клиничното протичане на заболяването и офталмологичната находка.**

За постигане планираната цел, са дефинирани следните **ЗАДАЧИ**:

1. Да се установи наличието на SARS-CoV-2 в предния очен сегмент при пациенти с Ковид инфекция и корелацията му с доказан антиген от назофаринкса.
2. Да се сравни находката в ПОС на две групи пациенти: с положителен и отрицателен PCR в слъзния филм
3. Да се изследва връзката между наличието на SARS-CoV-2 в предния очен сегмент и тежестта на офталмологичната находка
4. Да се установи връзка между наличието на SARS-CoV-2 в предния очен сегмент и тежестта на клиничното протичане на инфекцията, в т.ч., кислородозависимост, някои лабораторни показатели, степен на белодробно засягане регистрирано посредством КТ изследване и др.

## **IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **4.1. Клиничен материал**

- В проучването са включени 50 пациенти, на възраст над 18 години хоспитализирани в отделение за неинтензивно лечение на КОВИД болни в МБАЛ Лозенец – София.
- Болните са лекувани в МБАЛ Лозенец в периода септември 2021- декември 2021г
- Всички включени пациенти са с положителен бърз антигенен тест от назофаринкса за SARS-CoV-2 преди да бъде извършено PCR изследването
- Пробите за rt-PCR анализ са взети от един и същи специалист - офталмолог при спазване на определен алгоритъм.
- Офталмологът извършва клинична оценка на очния статус на болните преди набиране на материалите.
- Пробите са изследвани на 6 транша – пациенти номер 1-5; 6-16; 17-23; 24-26; 27-36; 37-50.
- Едновременно са взети и анализирани проби от назофаринкса и от конюнктивния сак на всеки пациент
- Изследвани са 100 очи на 50 пациенти
- Пациентите са разпределени в две основни групи:
  1. група I пациенти с доказано чрез PCR наличие антиген на SARS-CoV-2 вирус в слъзния филм
  2. група II пациенти с доказана чрез PCR липса на антиген на SARS-CoV-2 вирус в слъзния филм

### **4.2. Методи на изследването**

#### **4.2.1. Оценка на очния статус на пациентите**

При всички включени 50 пациенти е снета обстойна очна анамнеза. Обичайните оплаквания са различна степен дискомфорт, сълзене, парене, зачервяване. Само при четирима пациенти са установени придружаващи очни състояния и е изисквана допълнителна документация в т.ч. епикризи, амбулаторни листове от очни прегледи и др. Установените минали и придружаващи очни състояния са без активна клинична значимост към настоящия момент - един с диабетна ретинопатия непролиферативен стадий, един с амиодаронова кератопатия и двама след двустранна операция за катаракта с имплантирани вътреочни лещи.

#### **Офталмологично изследване на предния очен сегмент с фокално осветление при леглото на болния и класифициране на находката**

Очният статус е снет от специалист-офталмолог при леглото на болния без помощта на биомикроскоп. Находката е документирана според предварително приети критерии и пренесена в таблица.

Относно проследяваните пациенти се взе решение показателят зрителна острота да не се взема под внимание поради невъзможност за провеждане на стандартното изследване и нееднаквите условия на извършване на теста при евентуалното използване на смарт устройства – покриване на екраните на устройствата с предпазно фолио, използване на дезинфектанти, невъзможност да се предложи корекция и пр. Анамнестично също липсват данни за промени в зрителната острота сред изследваните 50 човека.

Очният статус на лежащо-болните с положителен БАТ и PCR за SARS-CoV-2 е снет в стационара с помощта на фокално осветление, бинокулярни увеличителни очила (Сн.2), офталмоскоп Heine BETA 200 S с кобалтово-син филтър и еднократни стерилни флуоресцинови тест ленти Fluoro Touch.

Огледът на ПОС при леглото на болния се осъществява с помощта на бинокулярни лупи Zeiss Optics LC, прикрепени към персоналните диоптрични очила на изследвания. Представяват еднокомпонентна леща, проектирана с фиксиран бинокулярен ъгъл, оптимален за диоптричната им сила. Тяхната височина и наклон може да се регулира според положението на пациента. Така екзаминаторът си осигурява идеално работно разстояние на триизмерно стерео изследване с незначителна зрителна умора и достатъчно широко зрително поле.



Снимка 2. Очила с бинокулярна увеличителна приставка от + 4 диоптъра

#### 4.2.2. Субективни очни оплаквания

Според Американската Академия по Офталмология, очният дискомфорт е общо понятие за възникнали нежелани усещания в очите (56). То включва широк спектър симптоми, като например:

- Усещане за чуждо тяло- чувство за пясък в очите, усещане за обърнати мигли, дразнене при мигане;
- Усещане за парене - парене, дразнене, болка, сухота;
- Алергични симптоми – сърбеж
- Болкови симптоми – тъпа или остра пробощаща болка, тежест, пулсиране, болка при движение на булба, изострена чувствителност, напрежение
- Променена чувствителност- фотофобия, комфорт при затворени клепачи, умора, усещане за парене
- Абнормна секреция- сълзене, патологичен вискозитет на сълзите, епифора
- Разни- зачервяване, нужда от примигване, щипане,

Съществуват различни дискусии и скали за оценка на очните оплаквания на пациентите, създадени съобразно подлежащата патология (59, 60). По ODAS – Ocular Discomfort Analog Scale се оценяват 7 показателя с точки от 0 до 10 с общ скор 0 до 70 (58). При пациенти с COVID-19 е необходимо адаптиране на различни методики и скали. Комплексният характер на офталмологичната находка и характеристиките на придружаващите симптоми - фебрилитет, хипоксия, прием на множество медикаменти, налагат прилагане на опростена и същевременно точна за интерпретация класификация.

Очните оплаквания са оценени чрез директно запитване на пациентите от офталмолога. Под внимание се вземат персоналните усещания на пациентите, касаещи очите. Субективният очен дискомфорт се дели на 5 степени- липсващ, лек, среден и умерен и изразен. Възприетата при регистрирането на оплакванията скала е показана в Таблица 3, адаптирана по Liu, R. F. et al. (57).

	Тежест на оплакванията	Характеристика
<b>Степен 0</b>	Липсват	Няма симптоматика
<b>Степен 1</b>	Леки	Леки оплаквания, пациентите имат незначителен дискомфорт в очите
<b>Степен 2</b>	Средни	Средно проявени оплаквания, пациентите имат поносим дискомфорт в очите
<b>Степен 3</b>	Умерени	Умерени оплаквания, пациентите понасят, но с усилие дискомфорта в очите
<b>Степен 5</b>	Тежки	Изразени оплаквания, пациентите много трудно и мъчително понасят дискомфорта в очите

Таблица 3. Степенуване на субективните очни оплаквания на изследваните болни

### 4.2.3. Обективни офталмологични находки

Промените в ПОС са описвани според скалата **JENVIS** (6), без да се използва пълното ѝ съдържание. Тя е създадена първоначално за нуждите на контактната корекция и усложненията, свързани с напасване на лещи. Оказва се, че тази скала дава възможност за ясно и опростено представяне на находките в ПОС и тяхното стандартизирано документиране. Налична като ламинирано копие в размер А4 и подходящо за влажна дезинфекция без да се поврежда, класификационната таблица се ползва при леглото на болния за непосредствена регистрация на наличните очни промени. Възприети са промени, които са наложени от факта, че снемането на статуса е при леглото на болния, а не в кабинет със специализирана апаратура – биомикроскоп с увеличения и филтри. Адаптираните скали са представени на схема 1.

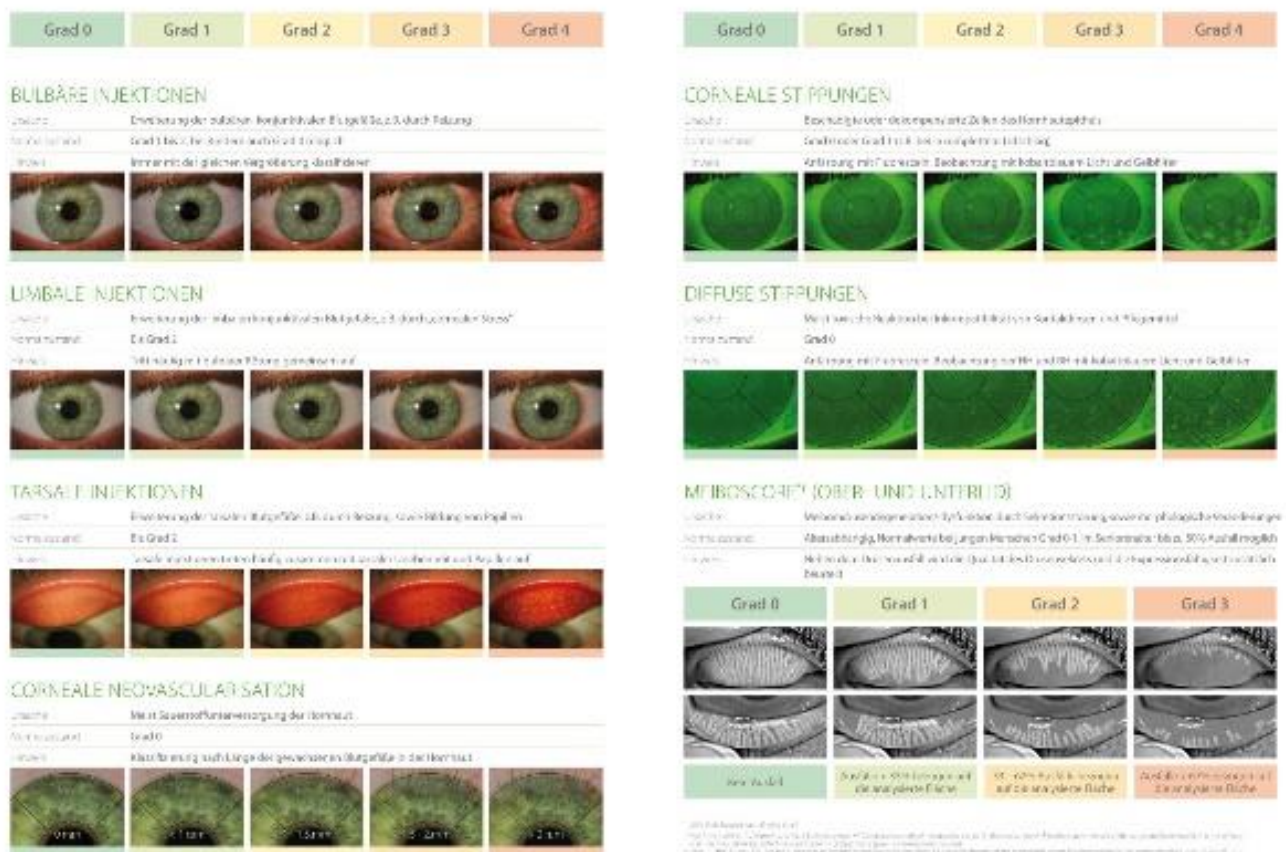


Схема 1. JENVIS Grading Scale, източник *Klassifikation von Spaltlampenbefunden 2014, W. Sickenberger (61)*

На Таблица 4 са показани степените на регистрираните обективно от офталмолога хиперемия, хемоза и патологичен секрет.

	Тежест	Характеристика
<b>Хиперемия</b>	Степен 0	Липсваща или съвсем дискретна находка
<b>Хемоза</b>	Степен 1	Лека до средно проявена клинична находка
<b>Патологичен секрет</b>	Степен 2	Изразена до тежко изявена клинична находка

Таблица 4. Степенуване на обективната офталмологична находка при изследваните болни

#### 4.2.3.1. Хиперемия на конюнктивата

Хиперемията представлява неспецифична реакция на конюнктивните съдове, които увеличават калибъра си и стават по-лесно видими. Най-честа причина е локална възпалителна реакция, но при хоспитализирани пациенти с COVID-19 трябва да се имат предвид и други причини. Такива могат да бъдат локално дразнене и сухота в очите поради допълнително подаване на кислород с назална канюла или маска, затруднен венозен отток поради силна задушваща кашлица, задух или повръщане, повишено артериално налягане, лекарствени взаимодействия и др. За оценка на степента на инекция има редица предложени класификации, често свързани със заснемане и анализ на образи (62, 63, 64, 65).

Избрана е скала със стойности от 0 до 2, съответно от липсваща през най-лека към най-тежка степен. Степен 0 обединява клас 0 и 1, Степен 1 обединява клас 2 и 3, Степен 2 съответства на клас 4 от приложените съответно диагностични образи по JENVIS. По този начин оценката на находката и нейното отклонение от нормата може да бъде извършена бързо и еднозначно (Табл.4).

#### 4.2.3.2. Патологичен секрет от окото

При пациентите с вирусно засягане, най-често се касае за засилено сълзене, отделяният секрет е прозрачен и воднист. Може да доведе до усещане за замъгляване на зрението, рядко предизвиква слепване на клепачите.

Наличието на абнормна секреция се стадира от 0- липсваща, 1- налична и 2- изразена.

#### 4.2.3.3. Оток на конюнктивата (хемоза)

Отокът на конюнктивата е известен като хемоза и представлява задържане на трансудат или ексудат под външната обвивка на окото. Конюнктивата изглежда задебелена и желатинозно променена поради повишената пропускливост на засегнатите от вирусната инфекция капиляри. Хемозата се класифицира в три степени: 0- липсваща, 1- лека и 2- изразена.

#### 4.2.3.4. Багрене на роговиците с флуоресцеин

Флуоресцинът е органично багрило с трициклична структура, слабо разтворимо в алкохол и вода, използва се като трейсър при различни изследвания. Има жълто-оранжев цвят, осветен с късовълнови лъчи от видимия спектър- син цвят, абсорбира фотони и енергия, изпада във възбудено състояние и отдава светлина с по-малка дължина на вълната и по-ниска енергия като започва да свети в зелено. Интактните епителни клетки на роговицата и конюнктивата не задържат багрилото. Багрят се участъците с компрометирана епителна цялост и това улеснява тяхното откриване и проследяване.

Поради това флуоресциновият тест се използва за откриване на дефекти по очната повърхност – роговични дефекти и чужди тела, но може да се използва за изследване на слъзния филм, както и за визуализиране на патологични гънки и едем на конюнктивата (67). Много характерни за вирусните инфекции, засягащи очите, са повърхностни точковидни дефекти на роговицата, багрещи се с флуоресцеин (68). Вероятна причина за това са исхемия или реакция срещу токсини, невротропност на вируса и др.

Използвани са фабрично произведени тест-лентички Fluoro Touch, напоени с флуоресцеин (Сн.3). Те намират широко приложение в офталмологията като диагностично средство при изследване на слъзния филм, напасване на контактни лещи, апланационна тонометрия и др. Единият им край е импрегниран с 1г натриева сол на багрилото флуоресцеин, който се допира за няколко секунди в темпоралния край на долния форникс. Това е последната при прегледа. Извършва се непременно след вземането на материал за PCR от окото. Причината е избягване на контаминация и компрометиране на останалите очни тестове.

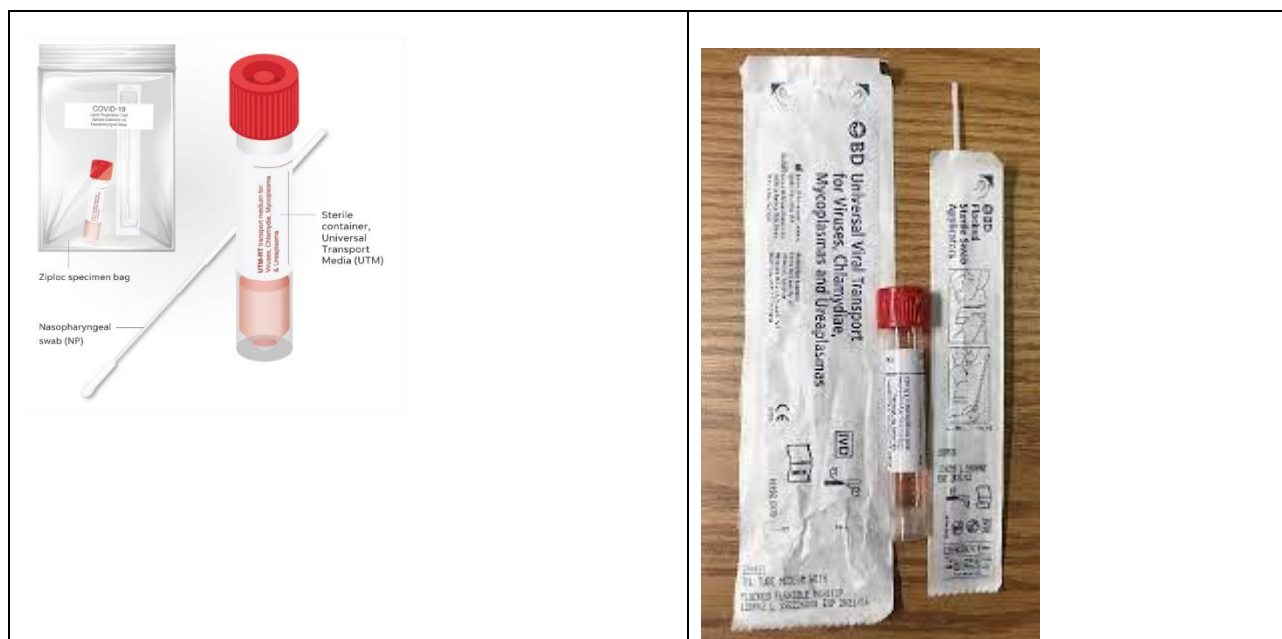


Снимка 3. Диагностични флуоресцинови стерилни ленти Fluoro Touch, Madhu Instruments, Индия

За оценка по JENVIS Grading Scale се използват стойности от 0 до 4, съответно от липсваща през най-лека към най-тежка увреда.

#### 4.2.4. Набиране на проби за изследване на SARS-CoV-2 в проби от назофаринкса и конюнктивния сак

Множество сравнения и проучвания дават предпочитание за набиране на ДНК и РНК материал като се ползват накрайници тип четка (69), с каквито се работи и в Лабораторията по Клинична Микробиология и вирусология на Болница Лозенец (снимка 4).



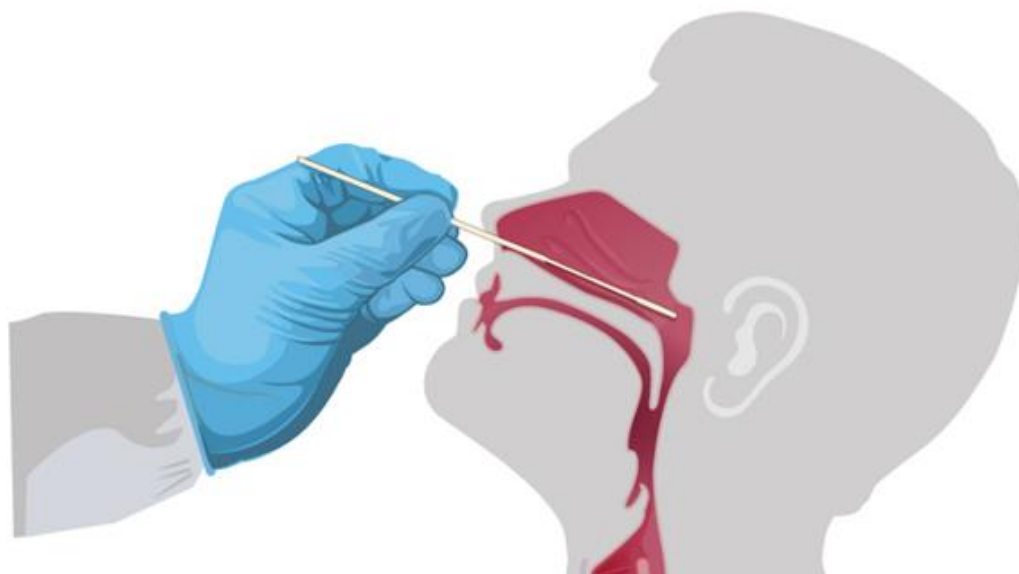
Снимка 4. Кит за пробонабиране и среда, използвани за изследване на назофарингеален и конюнктивен секрет (69)

Правилното вземане на пробите е изключително важно за надеждността на резултатите. Използват се техники и прийоми, утвърдени в българската и международна практика (70) (Фиг. 2)

При всички пациенти е направено от един и същи лекар, последователно и едновременно от носоглътката и от конюнктивния сак след инструктаж и обучение при квалифицирани лаборанти с профил микробиология и имунология. Преди вземането на пробите, те са етикетирани с информация за пациента. Транспортните среди за назофарингеалния и за конюнктивния секрет се опаковат в херметично затварящ се прозрачен плик и се съхраняват в хладилник при температура 4-8 ° до 12 часа. Изпращат се за изследване придружени с хартиена бланка в два идентични екземпляра, съдържащи необходимата информация за пациента. След сравняване на данните, те се прикрепят към външната опаковка.

Пробовземането започва с набиране на материала от назофаринкса по класически утвърден подход (71) и следва вземане материал от конюнктивния сак.

Лекарят е с пълно предпазно облекло, включващо специален гащеризон с качулка, ръкавици, маска тип N95, лицев шлем.



Фигура 2. Вземане на назофарингеален секрет

Източник: Center for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health & Human Services , адаптирано по М.Малчева (70)

## Събиране на пациентски проби за вирусологични изследвания

### 4.1.4.1. Набиране на проби за изследване на SARS-CoV-2 от назофаринкса за **rt-PCR** и **БАТ**

1. Пациентът се инструктира да повдигне брада и да се облегне в стабилна опора;
2. Главата на пациента се навежда леко назад по възможност под ъгъл около 70°, за по-лесен достъп на носните входове;
3. Пациентът се инструктира да затвори клепачи за намаляване дискомфорта от процедурата и да се избегне обилно съзрване и триене на очите;
4. Стерилен тампон от кит STANDARDTM Q COVID-19 Ag Test (SD BIOSENSOR, Inc., Korea) се въвежда в ноздрата на пациента на дълбочина еквивалентна на разстоянието от ноздрата до външния ушен отвор като се държи само в крайната горна част;
5. Започва се от дясната ноздра като тампонът се вкарва внимателно успоредно на небцето и хоризонтално по отношение главата на пациента покрай назалния септум. Навлиза се над долната част на носния вход до носоглътката докато се усети съпротивление;
6. Тампонът се завърта 3-4 пъти по назофарингеалната повърхност за 10-15 секунди да бъдат абсорбирани секретите, след което се изважда от носната кухина;
7. Внимателно се изважда и процедурата се повтаря от лявата страна.

8. Тампонът се поставя в мека епруветка с 600 µl транспортна среда за rtPCR проба или екстракционен буфер за БАТ, които са предоставени от производителя и се завърта най-малко пет пъти с едновременно притискане на епруветката;
9. Тампонът се изважда от епруветката с притискане на стените ѝ за максимално отцеждане на течността;
10. Върхът на тампона остава потопен в течността, а горният му край се пречупва;
11. Епруветката се затваря плътно с прилежащата капачка и след обозначаване с идентификационен номер и инициали на пациента, се изпраща във вирусологичната лаборатория.

#### **4.1.4.2. Набиране на проби за изследване на SARS-CoV-2 от конюнктивния сак за rt-PCR (Снимка 5- А и В)**

1. Започва се от ДО като се придърпва и задържа долния клепач и се излага долния форникс и тарз;
2. Отваря се стерилният тампон за очната проба от кит Biosomma® и като се държи само в крайната горна част, се поставя във вътрешния клепачен ъгъл в областта на карункулата за 4-5 сек;
3. Тампонът се придвижва бавно върху изложената конюнктива на долния клепач с въртеливи движения за около 5 сек и се задържа са 4-5 сек в темпоралния клепачен ъгъл;
4. Тампонът се поставя в предварително подготвена 1.5 ml епруветка с транспортна среда от кит Biosomma® в обем от 600 µl, като се отчупва дръжката, а върхът на тампона остава в епруветката;
5. Процедурата се повтаря аналогично и в ЛО;
6. Тампонът се изважда и върхът му се потапя в подготвената 1.5 ml епруветка с транспортна среда от кит Biosomma® в обем от 600 µl, като се отрязва дръжката, а главата на тампона остава в епруветката;
7. Двата тампона са поставяни в една епруветка със среда;
8. Епруветката внимателно се затваря с прилежащата ѝ капачка и след обозначаване с идентификационен номер и инициали на пациента, се изпраща към вирусологичната лаборатория.



Снимка 5.

*А Пробонабирането започва в долния форникс медиално в областта на карункулата*

*В След преминаване по цялата дължина на долния тарз с въртеливи движения, завършва в темпоралния клепачен ъгъл*

Пробонабирането от очен секрет има някои особености, които са съобразени при извършването изследване.

Пациентите са задължително с поставена маска, покриваща носа и устата. По този начин се избягва възможно замърсяване на пробата от издишания въздух и пръски носен секрет или слюнка. Вземането на секрет за PCR изследване от конюнктивния сак става след това от назофаринкса. Не се прилага локална анестезия и се осигурява поне 2 ч след последно поставяне на каквито и да било очни капки. За вземане на пробата се използва различен вид стик от този за назофаринкса, а именно такъв с къси власинки. Връхчетата от този специфичен тип осигуряват абсорбиране на очния секрет и причиняват минимален дискомфорт и дразнене на болните. Производителят COPAN, Brescia, Italy, представяйки своя продукт FLOQSwabs предоставя детайлни материали по въпроса.

В епруветката са подготвени по 600 µl буферен разтвор, предоставен от производителя на кита, тъй като екстракцията се извършва от 400 µl. Работи се с по-малко от стандартния обем на транспортна среда, за да се постигне по-висока концентрация на вируса и осигури покриването на апаратните контроли по стандарт.

Проверяват се надписите на епруветките с проби от назофарингеален и конюнктивен секрет, опаковат се в херметично затворена транспортна торбичка и придружени с бланка с информация за пациента, се изпращат за анализ.

Съхранението на пробите преди лабораторна обработка е било максимално 4 ч в хладилник при температура 4-8 °С.

Едва след вземане материал от конюнктивния сак, може да бъде завършен очния преглед при леглото на болния с оценка на повърхността на ПОС посредством ползване на багрило флуоресцеин, както е описана по-горе.

#### **4.2.4.3. Бърз антигенен тест за SARS-CoV-2**

Бързият тест за доказване на SARS-CoV-2 антиген е извършван само в проби от назофарингеален секрет с търговски кит STANDARD™ Q COVID-19 Ag Test (SD BIOSENSOR, Inc., Korea). Едва след позитивирането му, пациентите са включвани в групата на проучваните болни.

**Принцип:** Върху нитроцелулозната мембрана на тестовия стрип, зоната на тестовата линия е покрита с миши моноклонални анти-SARS-CoV-2 антитела, а зоната на контролната линия – с миши моноклонални анти-пилешки IgY антитела. При извършването на теста, ако SARS-CoV-2 антиген присъства в изследваната проба, той взаимодейства с миши моноклонални анти-SARS-CoV-2 антитела, конюгирани с цветни частици, формирайки антиген-антитяло цветен комплекс. Този комплекс мигрира по мембраната чрез капилярно действие до достигане на тестовата линия, където се улавя от мишите моноклонални анти-SARS-CoV-2 антитела. В този случай тестовата линия става видима в прозореца на стрипа. Наситеността на цветната тестова линия може да варира в зависимост от количеството SARS-CoV-2 антиген, наличен в пробата. Ако такъв липсва, не се появява никакво оцветяване в тестовата линия. Контролната линия служи за контрол на процедурата и винаги се появява, ако тестовата процедура е изпълнена правилно и реагентите на контролната линия работят.

#### **Изолиране на вирусна РНК**

Изолирането на вирусна РНК беше извършвано с помощта на търговски кит QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) и автоматизирана система за екстракция QIA Symphony SP (QIAGEN GmbH, Germany) в следните стъпки:

1. Епруветките с транспортна среда, в които бяха поставени тампоните с пациентски проби бяха вортексирани на максимална скорост в продължение на 10 sec. на апарат PeqTwist (Peqlab Biotechnologie GmbH).
2. С помощта на автоматична пипета със стерилни филтърни връхчета, 400 µl от средата бяха прехвърляни в нови стерилни епруветки от 2 ml.
3. Пробите бяха инкубирани на 65°C за 10 min на термоблок Thriller (Peqlab Biotechnologie GmbH).
4. Епруветките бяха отваряни и подреждани в държача на апарата QIA Symphony SP, където предварително бяха заредени необходимите консумативи (типчета, касета с реактиви, реакционни касети, нови 2 ml епруветки и carrier RNA).

5. Чрез touch screen екрана на апарата бяха въвеждани идентификационните номера на пробите, след което беше стартирана автоматизираната екстракция.
6. След приключване на работата на апарата и подадена звукова сигнализация, епруветките с готови елуати (изолирани НК) се изваждаха и затваряха с прилежащите им капачки.

#### **4.2.4.4. Обратно транскрипционна полимеразно-верижна реакция в реално време (Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction –rt-PCR)**

Real-time RT-PCR беше прилаган за доказване на SARS-CoV-2 вирусна РНК в пациентски проби и беше извършван с търговски кит LiliF™ COVID-19 Multi Real-time RT-PCR Kit (iNtRON Biotechnology, Korea) в апарат Rotor Gene Q 5plex (QIAGEN GmbH, Germany).

Доказване на SARS-CoV-2 вирусна РНК беше извършено чрез кита LiliF™ COVID-19 Multi Real-time RT-PCR Kit с анализиране на реакцията по три вирусни гена – RdRP (RNA-Dependent RNA Polymerase), N (Nucleocapsid) и E (Envelop). Анализът включва също вътрешна екстракционна контрола (човешки RNaseP ген), положителна и отрицателна контроли, включени в кита. Реакциите бяха извършвани в обем 20 µl, като миксът за всяка проба съдържаше по

- 10 µl 2X RT-PCR Mix;
- 5 µl COVID Multi Detection solution;
- 5 µl РНК.

Пробите бяха накапвани чрез автоматизирана система QIAgility (QIAGEN GmbH, Germany). Беше прилаган следният протокол за амплификация, според инструкциите на кита: обратна транскрипция и Taq активация (50°C за 30 min. и 95°C за 10 min.), последвани от 40 цикъла с 94°C за 15 sec. и 58°C за 60 sec. Отчитането на PCR-продуктите за всяка проба беше осъществено посредством регистрираната от апарата флуоресценция в четирите канала (съответни на четирите таргетни последователности – RdRP, N, E и RNaseP) и интерпретирано както следва:

- Ct value ≤ 35: Позитивен резултат;
- Ct value >35 or N/A: Негативен резултат;
- Ct value на RNase P (вътрешна контрола) >35: Невалиден резултат – (за повторна екстракция и повторно тестване).

Сходен модел на работа и методика за сравнителен анализ на проби от очен секрет при болни с COVID-19 е прилагани от други автори. (110, 111, 112).

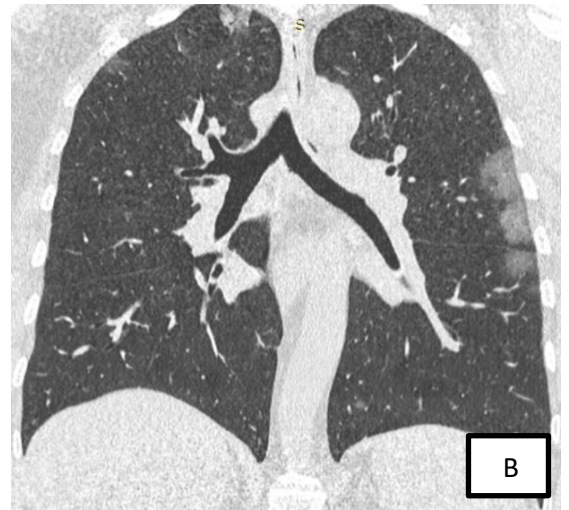
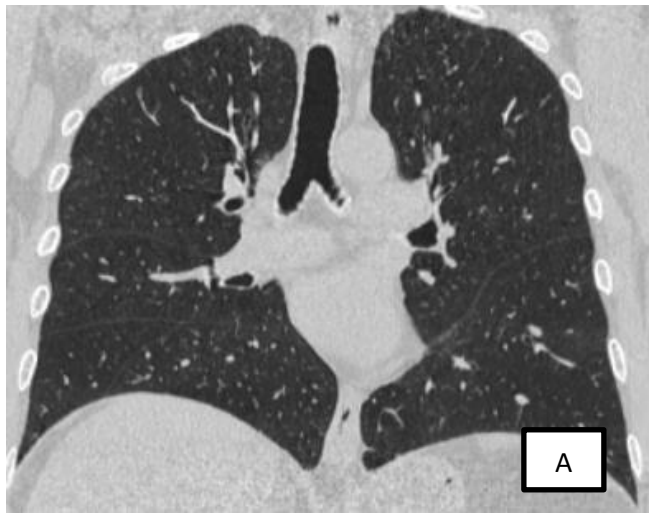
#### 4.2.5. Компютъртомографско изследване на бял дроб

КТ изследването на гръден кош е ключов метод за обективно изследване, стадиране и проследяване на пациенти с белодробна патология, особено при такава с интерстициално ангажиране. Пациентите с COVID-19 имат засягане на белия дроб, което е възможно бързо да се усложни до развитие на сериозна дихателна недостатъчност, налагаща подаване на допълнителен кислород, прием в сектор за интензивни грижи и спешна необходимост от механично обдишване за запазване на живота. КТ дава възможност за количествена оценка на обективната белодробна находка, проследяване, сравняване и прогнозиране развитието на засягането.

В настоящия анализ е приложена скорова система, предложена от Датското рентгенологично дружество (75) и въведена от Пан и съавтори (76). Сзабо и съавт. в свое сравнително проучване не се установяват съществена разлика в клиничното представяне на споменатите оценъчни системи (77). Те достигат до извода, че скорът на Пан и съавтори показва максимално точни резултати. Тази оценъчна система беше предпочетена поради нейната прегледност, удобство за приложение и сравнителна еднозначност

Компютъртомографското изследване на гръден кош е осъществено в Отделението по Образна диагностика на МБАЛ Лозенец като е използван Philips Healthcare CT Brilliance. Това е съвременен апарат за сканиране с нискодозово лъчево натоварване. Пациентите са в максимален инспириум с възможно задържане на дишането, поставени по гръб в легнало положение и декубитална позиция. Тораксът е обхванат от белодробния връх до костодиафрагмалите ъгли. КТ срезът е с дебелина 3 мм, допълнително реконструиран на 0,9мм. Останалите параметри на рентгеновата тръба са 120 kV, 78 mAs, ротационно време 0,5s, pitch 1.0. Подобна методика на изследване е прилагана и от други автори, като използваните от нас параметри следват препоръките в международната литература ( 78, 79, 80, 81).

Посредством визуална оценка на КТ образите на белия дроб бива определяна тежестта на заболяването на пациентите. На Снимка 6 -А,В,С,Д са показани примери на образи от КТ изследвания, извършени в МБАЛ „Лозенец“, съответстващи на липсващо, леко, умерено и тежко пулмонално ангажиране на COVID-19 пациенти.



Снимка 6. КТ изображения на белодробния паренхим с А- липсващо, В- леко, С- умерено, D- тежко засягане от COVID-19 асоциирана интерстициална пневмония.

КТ изображенията показват изменения в белодробния паренхим от 0 до 100%. Крайният резултат е съобразен с анатомичната структура на двата бели дроба, които имат три лоба вдясно и два вляво. За максимално обективен краен резултат е въведено разделно оценяване на всеки от петте анатомични лоба на двата бели дроба. Неравномерното засягане на всеки от 5те лоба изисква индивидуална процентна оценка на всеки от тях. За всеки лоб при всеки отделен пациент е направена визуална оценка на засягането на паренхима от Ковид-19 под формата на пневмония както следва: < 5% засягане; 5%-25% засягане; 26%-49% засягане; 50%-75% засягане и > 75% засягане на белодробния паренхим на съответния лоб. Общият СТ резултат е сумата от индивидуалните лобарни резултати и може да варира от 0 (без участие) до 25 (максимално засягане), когато и петте дяла показват повече от 75% засягане. Според това точкуване от съответства на липса на Ковид-19 засягане на белодробния паренхим. В тези случаи обикновено са касае за Ковид-19 индуцирана белодробна

тромбоемболия във връзка с коагулационните нарушения, които предизвиква от SARS-CoV-2. От 1 до 9т. включително се смята за лека форма на пневмония, 10-19т. съответства на умерено тежка пневмония, а от 20 до 25т. се отнася към тежка пневмония (Табл. 5).

КТ скор на белодробно засягане	Ангажиране на белодробния паренхим	Тежест на пневмонията при COVID-19
<b>0</b>	липсва	липсва
<b>1-9</b>	5%-25%	лека
<b>10-19</b>	26%-49%	умерена
<b>20-25</b>	>50%	тежка

Таблица 5. КТ скор на белодробно засягане, паренхимно ангажиране на петте белодробни лоба и тежест на COVID-19 пневмония, адаптирана по Ravan Kumar M. и съавт. (82)

Клиничната тежест на протичане на COVID-19 определено е в зависимост от степента на белодробното засягане на заболелите. Ето защо приетата в Отделението по образна диагностика скала за КТ оценка съответства на настъпилите увреждания и ги степенува количествено. Разчитането на резултата от КТ изследванията са извършени независимо от двама специалисти по образна диагностика – единият с продължителен дългогодишен опит, а другият- с не толкова голям стаж. Не се установява статистически значима разлика между изчислените стойности на КТ скората, изчислен от според двамата лекари рентгенолози ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3. Статистически методи

##### 4.3.1. Хи квадрат анализ тест (Chi-square test) и точен тест на Фишер (Fisher's exact test).

В настоящото изследване част от изследваните са между променливи, които се намират на номиналната и ординалната полупоредена скала. Двете скали са слаби скали, като на тях са разположени променливи, които са неметрирани или категорийни. Според Калоянов Т. и Петров В. номиналната скала позволява само броеве на единиците за всяко значение на признака и изчисляване на относителни дялове. При ординалната скала има подредба и много често значенията на признаците представляват категории, подредени във възходящ или низходящ ред и между тях може да се установи разлика, степен в дадено качество или свойство на единиците (83).

Хи-квадрат анализите са провеждани при риск за грешка 5% дали е налице статистически значима връзка. Двете скали са слаби скали и изследването на тяхната корелационна зависимост се осъществява чрез Хи-квадрат анализ, като в случая, когато едната променлива е на номинална скала, а другата на ординатна

полуподредена скала е най-подходящо да се изследва чрез ранговия корелационен коефициент на Кендал. Изследването преминава през проверката на статистически хипотези:

1 етап. Дефиниране на хипотезите:

H<sub>0</sub>: Между зависимата променлива и независимата няма закономерна взаимозависимост.

H<sub>1</sub>: Налице е статистически значима зависимост между зависимата променлива и независимата.

2 етап. Определяне на риска за грешка от първи род:  $\alpha=0.05$

3 етап. Определяне на статистическия метод за проверка: Хи – квадрат критерии (рангов коефициент на корелация на Кендал).

**4.3.2. Дисперсионен анализ** – При необходимост от изследване на връзка, при която едната – факторната променлива е на слаба скала, а резултативната променлива е на силна скала е препоръчително използването на дисперсионен анализ. В основата на дисперсионният анализ е принципът на разлагане на общата девиация на У съставящите я компоненти (84). Проверката на статистическа хипотеза за установяване на статистически значима връзка се осъществява с помощта на F-критерия (или т.нар. тест на Фишер).

1. **етап.** Дефиниране на хипотезите:

H<sub>0</sub>: Между зависимата променлива и независимата няма закономерна взаимозависимост.

H<sub>1</sub>: Налице е статистически значима зависимост между зависимата променлива и независимата променливи.

2. **етап.** Определяне на риска за грешка от първи род:  $\alpha=0.05$

3. **етап.** Определяне на статистическия метод за проверка: F-критерий

### **4.3.3. Обработка на данни**

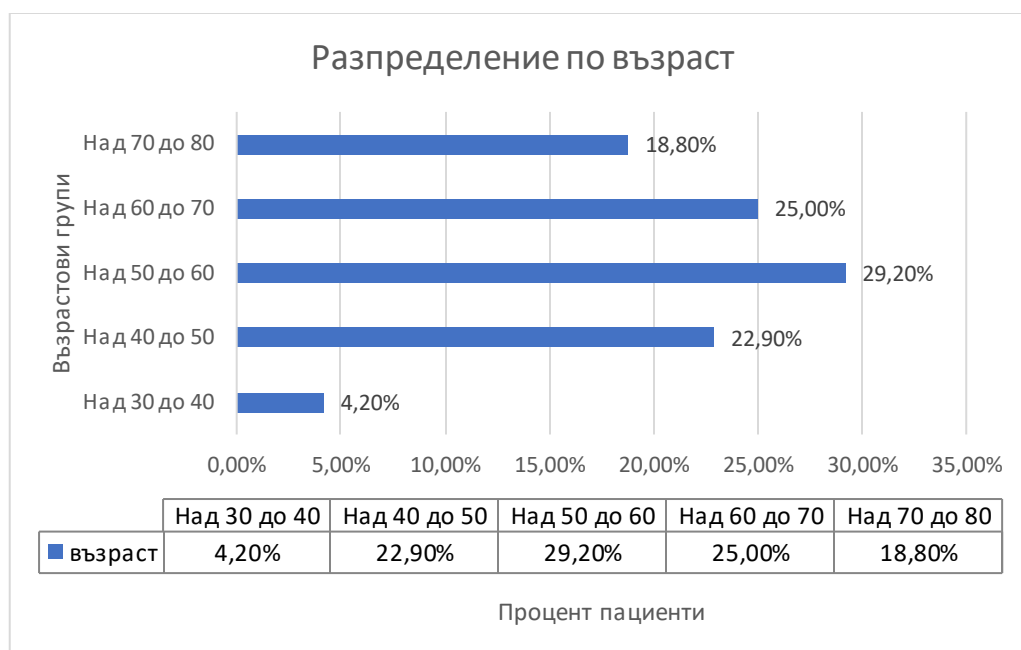
Събраната в настоящата разработка информация е годна за статистическа обработка и достатъчна за извеждане на статистически значими изводи и препоръки. За целта е използван програмен продукт MS Excel и е приложен статистическият софтуер IBM SPSS, версия 22.

## **V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ**

### **5.1. Едномерни разпределения**

#### **5.1.1. Демографски характеристики на пациентите**

##### **5.1.1.1. Разпределение по възраст**



*Фигура 3. Разпределение по възраст*

В изследваната съвкупност най-голям е дялът на пациентите над 50 до 60 годишна възраст - 29,20%, втора по големина е групата на пациентите над 60 до 70 годишна възраст - 25%. Най-малък е дялът на пациентите от възрастова група над 30 до 40 годишна възраст - 4,20%. Разликата между средната група и всички останали е осезаема, т.е. разликата между група над 30 до 40 годишни и следващата по големина, а именно над 70 до 80 годишни е 14,6 процентни пункта (Фиг. 3). Минималната възраст на регистриран пациент е 31 години, а максималната - 84 години. Разпределението има размах 53 години. Средната възраст на пациентите е 59,7. Медианата на статистическия ред е 57 години, като най-често срещаната възраст, известна като статистическа мода е 47 години.

#### 5.1.1.2. Разпределение по пол

В изследването участват общо 50 пациенти. Според едномерното разпределение по пол 54% от тях са мъже, а 46% жени (Фиг. 4). Преобладаващи са мъжете в сравнение с жените като разликата между двата пола не е голяма.

#### 5.1.1.3. Придружаващи състояния

От изследваната съвкупност 48% нямат придружаващи заболявания. 52% от изследваните пациенти имат придружаващи заболявания от разнообразен характер и с различна по тежест проява, като някои от болните са полиморбидни. Най-често регистрирани са артериална хипертония, захарен диабет, бронхиална астма, ритъмни нарушения на сърдечната дейност. Двама пациенти са след чернодробна трансплантация, едни с хронична бъбречна недостатъчност на хемодиализа, един с карцином на бял дроб и на бъбрек, един с болест на Паркинсон и един с епилепсия (Табл. 6).

Придружаващи заболявания при изследваните болни с COVID-19	Брой пациенти	Процент от всички
Няма	24	48%
Има	26	52%
Общо	50	100%

Таблица 5. Наличие на придружаващи заболявания

## 5.1.2. Офталмологични показатели

### 5.1.2.1. Субективни очни оплаквания



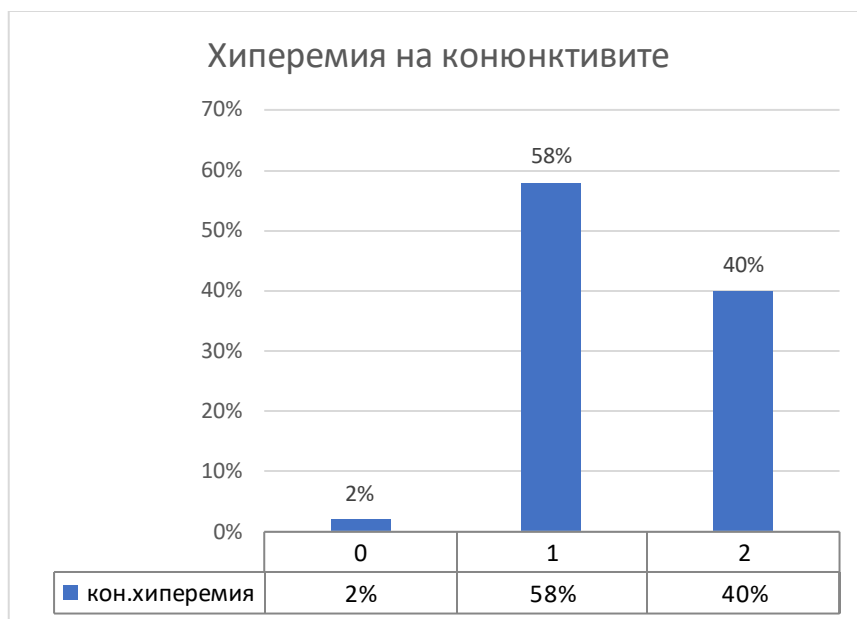
Фигура 4. Субективни очни оплаквания

Най-често срещаните оплаквания на болните, касаещи очите са дразнене, дискомфорт, парене, болка, усещане за чуждо тяло. Субективната очна симптоматика се класифицира от пациентите по изявата си в четири групи - липсваща, лека, средна, умерена и тежка. В настоящата статистическа съвкупност се наблюдава най-голям дял на пациентите с леки очни симптоми, а именно 46% от изследваните. Със средни и умерени очни симптоми са, съответно, 22% и 28% от пациентите. Най-малки са дяловете при пациентите с тежки симптоми 2% и на тези пациенти, при които липсват очни симптоми, също 2% (Фиг. ).

### 5.1.2.2. Обективна офталмологична находка

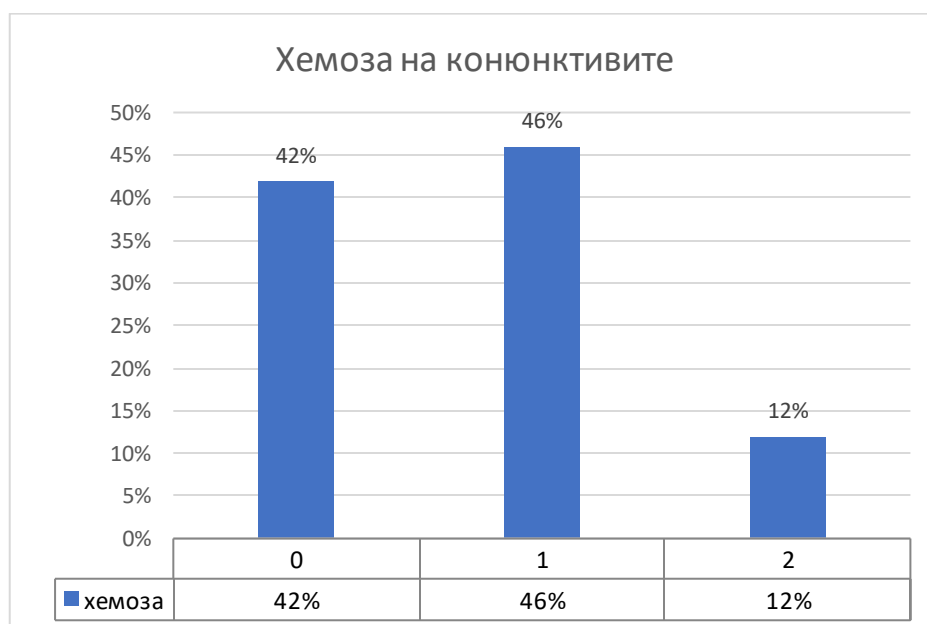
При прегледа на ПОС се следи за отклонения по отношение на следните признаци – хиперемия и хемоза на конюнктивата, сълзене и отделяне на патологичен секрет и евентуално багрене на роговицата е с флуоресцеин.

При нито един болен не се регистрира оцветяване на роговицата.



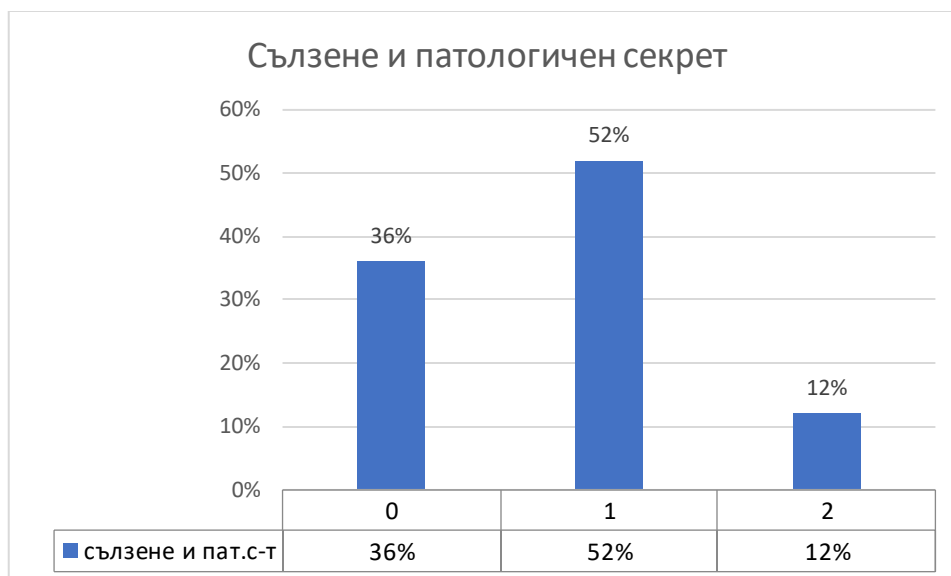
*Фигура 5. Хиперемия на конюнктивите*

Според хиперемията на конюнктивата, изследваните лица се делят на три групи- липсваща (0), лекостепенна (1) и значителна (2). Най-голям е процентният дял на пациентите с хиперемия степен 1, това са 58% от изследваните статистически единици. 40% са пациентите с хиперемия степен 2 и с най-малък процентен дял са тези със степен 0, а само 2% от изследваните пациенти (Фиг 5).



*Фигура 6. Хемоза на конюнктивите*

Според отока на конюнктивата, известен като хемоза, изследваните лица се делят в три групи- липсваща (0), лекостепенна (1) и значителна (2). В съвкупността на изследваните пациенти най-голям е процентният дял на пациентите със степен 1 или умерена хемоза 46%. 42% са тези със степен 0 – значително изразена и най-малко са пациентите със степен 2 - липсваща, а именно 12% (Фиг 6).



Фигура 7. Сълзене и патологичен секрет

Според повишеното отделяне на очен секрет и патологично сълзене, т.нар. епифора изследваните лица се делят в три групи- липсващо (0), лекостепенно (1) и значително (2). При изследваните пациенти най-голям е процентът- 52% на пациентите със степен 1 – завишено отделяне на секрет в лека степен. 36% са пациентите със степен 0 или без увеличено сълзене и без секрети от очите. Най- малък 12% е процентният дял на пациентите със степен 2 или значителна епифора и отделяне секрети от очите (Фиг. 7).

### 5.1.3. Други регистрирани променливи

Останалите регистрирани променливи на изследваните болни с Ковид -19 и техните обобщени статистически характеристики са представени в Таблица 7.

Регистрирана променлива	Средна аритметична	Медиана	Мода	Размах	Мин. стойност	Макс. стойност
Телесна температура при хоспитализация	38,19	38	38	4	36,60	40,80
Брой дни с телесна температура под 38 градуса	2,14	2	1	4	1	5
Брой дни с телесна температура над 38 градуса	1,58	1	1	4	1	5
Максимално регистрирана телесна температура	38,48	38,50	38	4	37	41

<b>Максимално регистрирани стойности на CRP</b>	94,02	75	0	365	0	365
<b>Дни болничен престой</b>	15,28	12,50	9	44	5	49
<b>Брой дни, пролежани от пациентите, приети в ОАИЛ</b>	13,33	15	15	11	7	18
<b>Прием на антибиотична терапия преди хоспитализация</b>	0,94	1	0	5	0	5
<b>Прилагани на антибиотици в стационарни условия</b>	2,36	2	2	8	0	8
<b>Регистрирана SpO<sub>2</sub> при постъпването в стационара</b>	89.63	94.50	96	65	33	98
<b>Регистрирана най-ниска SpO<sub>2</sub> при постъпването в стационара</b>	88.36	89	89	14	74	94
<b>Максимално допълнително подаване на O<sub>2</sub> /min</b>	7	7	2	13	2	15
<b>Брой дни на допълнително подаване на O<sub>2</sub></b>	10.52	11	11	25	1	26
<b>Регистриран КТ скор на белодробно засягане</b>	12.92	15	9	23	2	25
<b>Продължителност на неинвазивна вентилация по дни в ОАИЛ</b>	1,18	0	0	18	0	18
<b>Продължителност на механична вентилация по дни в ОАИЛ</b>	0,24	0	0	7	0	7

Таблица 6. Регистрирани променливи на изследваните болни с Ковид -19 и техните обобщени статистически характеристики

## **5.2. Двумерни разпределения - наличие на SARS-CoV-2 в очен секрет, доказан посредством rt-PCR спрямо други наблюдавани показатели**

- 5.2.1. Променливи, при които няма основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза за липса на статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба, при риск за грешка от първи род 5%

Резултатите от разпределението и проведения анализ за проверка за статистически значима връзка между резултатите от очния PCR тест и изследваните променливи показана, не се намира статистически значима зависимост между положителния PCR от очен секрет и :

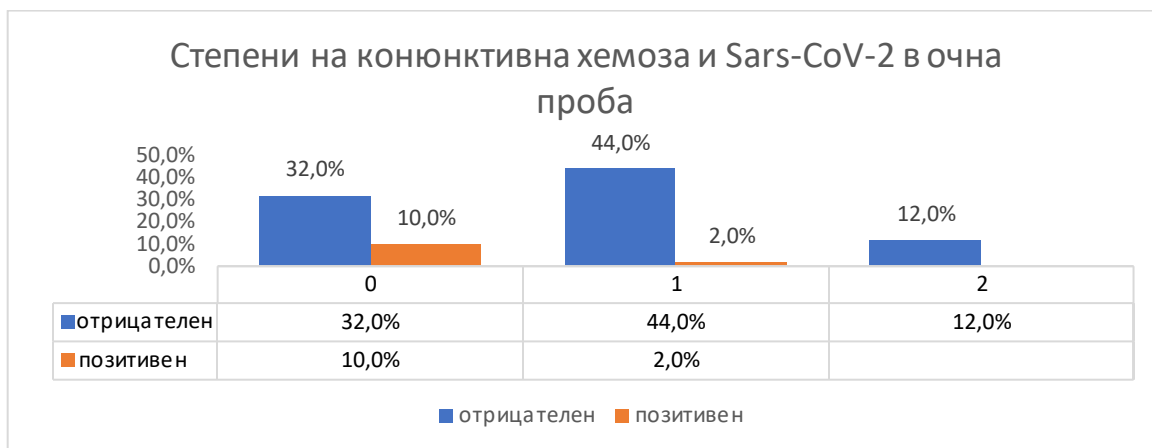
1. Възрастта на пациентите
2. Пола на пациентите
3. Наличието на придружаващи заболявания
4. Субективни очни оплаквания
5. Конюнктивна хиперемия
6. Патологичен секрет и съзене от очите
7. Регистрирана телесна температура
8. Брой дни в стационара с фебрилитет под 38°
9. Брой дни в стационара с фебрилитет над 38°
10. Най-висока регистрирана телесна температура в стационара
11. Максимални стойности на CRP
12. Брой дни пролежани в стационар
13. Брой пролежани дни в ОАИЛ
14. Приемани антибиотици в амбулаторни условия
15. Приемани антибиотици в стационарни условия
16. Прием на специализирана противовирусна терапия в стационарни условия
17. Кислородна сатурация SpO<sub>2</sub> при постъпване в стационара
18. Най-ниско ниво на кислородна сатурация SpO<sub>2</sub> на пациентите в стационара
19. Максимално допълнително подаване на кислород в стационара
20. КТ score на белодробно засягане
21. Дни неинвазивна вентилация в ОАИЛ

- 5.2.2. Променливи, при които има основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза за липса на статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба, при риск за грешка от първи род 5%

Резултатите от разпределението и проведения анализ за проверка за статистически значима връзка между резултатите от очния PCR тест и изследваните променливи показана, че се намира статистически значима зависимост между положителния PCR от очен секрет и :

### **5.2.2.1 Хемоза на конюнктивите**

Делът на пациентите с отрицателен резултат от очен PCR тест е 88% от всички изследвани статистически единици, като най-много 44% са пациентите със степен на хемоза 1, със степен на хемоза 0 са 32% от всички изследвани и тези със степен 2 са 12%. Делът на пациентите с положителен резултат от PCR теста е 12%, като тук пациентите са само в 2 групи: такива с хемоза степен 0 и такива с хемоза степен 1, съответно 10% и 2% (Фиг. 8).



Фигура 8. Степени на конюнктивна хемоза и SARS-CoV-2 в очна проба

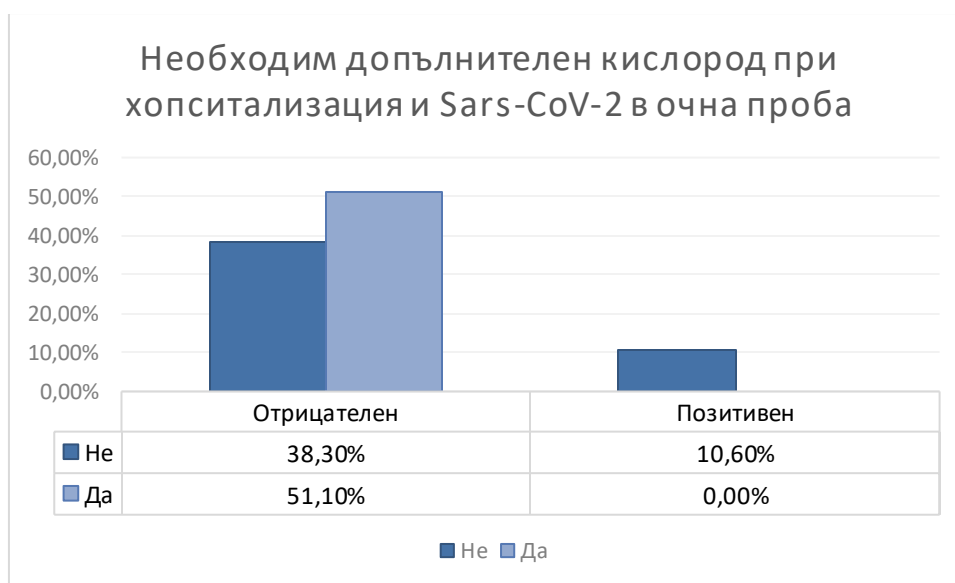
Степени на конюнктивна хемоза и SARS-CoV-2 в очна проба							
			PCR очи		Общо	Kendall's tau-c	P-value
			отрицателен	позитивен			
Хемоза	0	Брой пациенти	16	5	21	-0,208	0,027
		Липсва	% от всички	32,0%	10,0%		
	1	Брой пациенти	22	1	23		
		Лека	% от всички	44,0%	2,0%		
	2	Брой пациенти	6	0	6		
		Изразена	% от всички	12,0%	0,0%		
Общо			Брой пациенти	44	6	50	
			% от всички	88,0%	12,0%	100,0%	

Таблица 7. Степени на конюнктивна хемоза и SARS-CoV-2 в очна проба, резултати от изследване на връзка

В Таблица 8 са представени резултатите от изследването на връзките между резултатите от PCR тест от очен секрет и хемоза. Изследването на връзката е осъществено чрез Хи-квадрат анализ, чрез ранговия корелационен коефициент на Кендал. Двете променливи са на слаби скали като PCR тест е на номиналната скала, а хемоза е на ординалната. Налице е неравенството  $\text{Sig}=0.027 < \alpha=0.05$ . **Има статистически значима зависимост между PCR теста от очен секрет и конюнктивната хемоза ( $P=0.027$ ).**

#### 5.2.2.2. Необходимост от допълнително подаване на кислород непосредствено при постъпването в стационара

На Фигура 9 е представено разпределението между необходимостта от подаване на допълнителен кислород при хоспитализация и PCR от очна проба. Най-голям е процентният дял на пациентите, при които PCR тестът от очна проба е отрицателен. От тях 50% са имали необходимост от кислород още при постъпването, а 38% не са били кислородозависими. Най-ниски са дяловете на групата от пациенти с позитивен резултат 12% от PCR тест и няма пациенти, които да са имали нужда от кислород при хоспитализацията си, а тези които са нямали нужда са 12% от всички изследвани.



Фигура 9. Необходимост от допълнително подаване на кислород непосредствено при постъпването в стационара

	PCR очи		Общо	Хи-квадрат	P-value
	Отрицателен	Позитивен			
Не	38,0%	12,0%	50,0%	6,857	0,11
Да	50,0%	0,0%	50,0%		
Общо	88,0%	12,0%	100,0%		

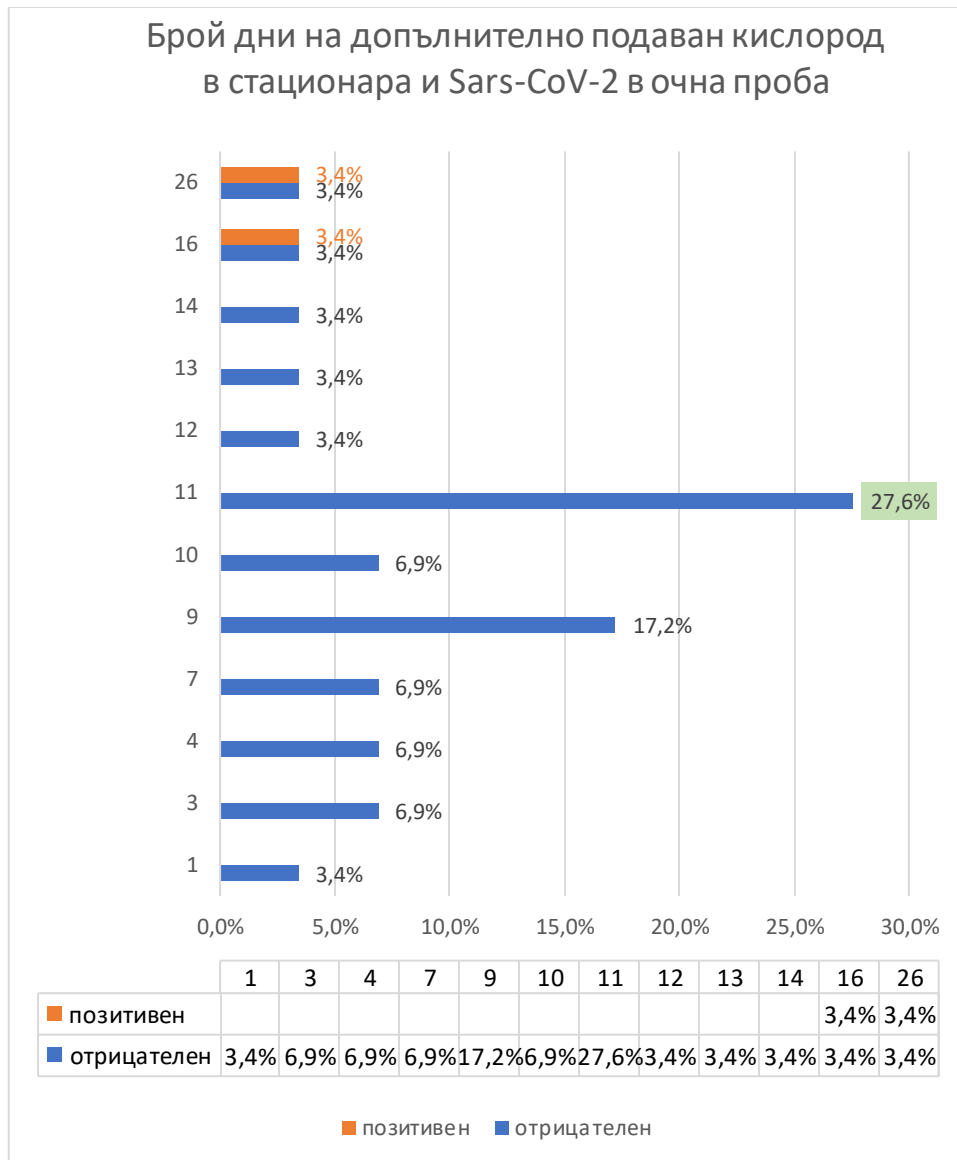
Таблица 8. Резултати от връзка между необходимостта от подаване на допълнителен кислород при хоспитализация и PCR от очна проба

В Таблица 9 са представени резултатите от изследването на връзките между резултатите от очния PCR и нуждата от допълнителен кислород още при самата хоспитализация. Изследването на връзката е осъществено чрез Хи-квадрат анализ, чрез критерия на Пирсън. Двете променливи са на слаби скали и по точно на номиналната скала. Налице е неравенството  $Sig=0.011 < \alpha=0.05$ . По данни от настоящата извадка има основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза за сметка на алтернативната, следователно **е налице статистически значима зависимост между очния PCR тест и необходимостта от кислород при хоспитализиране.**

#### 5.2.2.3. Брой дни на допълнително подаван кислород в стационара

На фигура 11 е представено разпределението на броя дни на допълнителен кислород и резултатите от PCR теста от очен секрет. Пациентите с позитивен резултат от теста са регистрирани при 16 и 26 дни на подаване на допълнителен кислород с 3,4% от пациентите и в двете групи.

Пациентите с отрицателен резултат от теста са най-много 27,6% от изследваните пациенти с при 11 дни допълнително подаване на кислород.



Фигура 10. Брой дни на допълнително подаван кислород в стационара и SARS-CoV-2 в очна проба  $x =$  Дял на пациентите в %  $y =$  Дни допълнително подаван  $O_2$  в  $l/min$

Брой дни на допълнително подаван кислород в стационара и SARS-CoV-2 в очна проба			PCR очи		Общо	Kruskal-Wallis Test / Chi-Square	P-value
			отрицателен	позитивен			
Брой дни на допълнителен кислород	1	Брой пациенти	1	0	1	4,759	0,029

		% от всички	3,4%	0,0%	3,4%		
	3	Брой пацен ти	2	0	2		
		% от всички	6,9%	0,0%	6,9%		
	4	Брой пацен ти	2	0	2		
		% от всички	6,9%	0,0%	6,9%		
	7	Брой пацен ти	2	0	2		
		% от всички	6,9%	0,0%	6,9%		
	9	Брой пацен ти	5	0	5		
		% от всички	17,2%	0,0%	17,2%		
	10	Брой пацен ти	2	0	2		
		% от всички	6,9%	0,0%	6,9%		
	11	Брой пацен ти	8	0	8		
		% от всички	27,6%	0,0%	27,6%		
	12	Брой пацен ти	1	0	1		
		% от всички	3,4%	0,0%	3,4%		
	13	Брой пацен ти	1	0	1		
		% от всички	3,4%	0,0%	3,4%		

	14	Брой пациенти	1	0	1
		% от всички	3,4%	0,0%	3,4%
	16	Брой пациенти	1	1	2
		% от всички	3,4%	3,4%	6,9%
	26	Брой пациенти	1	1	2
		% от всички	3,4%	3,4%	6,9%
Средна			9,47	21,00	
Стандартно отклонение / SD			4,81	7,07	
Общо		Брой пациенти	27	2	29
		% от всички	93,1%	6,9%	100,0%

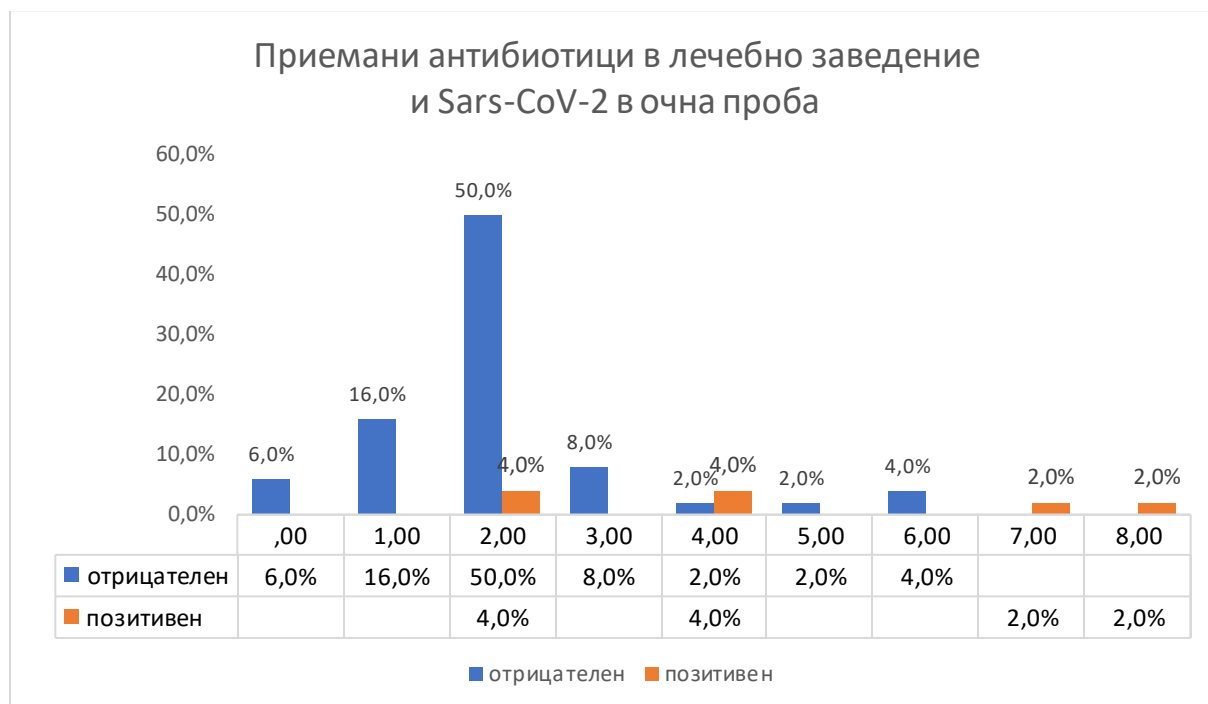
Таблица 9. Брой дни на допълнително подаван кислород в стационара и SARS-CoV-2 в очна проба, резултати от изследване на връзка

В Таблица 10 са представени резултатите от проведения дисперсионен анализ за проверка за статистически значима връзка между Брой дни на допълнителен кислород и PCR от очна проба. Поради това, че при една от двете групи отрицателен и позитивен PCR очи е установено, че разпределението не е нормално, е използван непараметричен метод чрез критерия на Кръскал-Уолис. Равнището на значимост Sig. е  $0,029 < 0,05 = \alpha$ , следователно има основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза в полза на алтернативната, която гласи, че **Броят дни на допълнителен кислород има статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба.**

#### 5.2.2.4. Приемани антибиотици в стационарни условия

По време на лечението в болнично заведение по показания и като част от системната терапия, на пациентите са прилагани антибиотични препарати, които са различни по брой и като групи медикаменти. Проучено е разпределението на броя използвани антибиотици и PCR теста от очен секрет. 4% от пациентите с позитивен резултат са приемали 2 броя антибиотика, 4% от тях са приемали 4 броя антибиотика, 2% са приемали 7 броя и 2% са приемали 8 броя антибиотика. Пациентите с отрицателен резултат или не са приемали антибиотици, или техният брой достига най-

много 6 броя, като от тях най-голям е дялът на тези приели 2 антибиотика, а именно 50 % (Фиг. 13).



Фигура 11. Приемани антибиотици в лечебно заведение и SARS-CoV-2 в очна проба;

$x =$  Брой антибиотици, прилагани в стационара;  $y =$  Дял на пациентите

Приемани антибиотици в лечебно заведение и SARS-CoV-2 в очна проба							
		PCR очи		Общо	Kruskal-Wallis Test / Chi-Square	P-value	
		отрицателен	положителен				
Брой АБ, прилагани по време на лечението в болница	0,0	Брой пациент и	3	0	7,507	0,006	
		% от всички	6,0%	0,0%			
	1,0	Брой пациент и	8	0			
		% от всички	16,0%	0,0%			

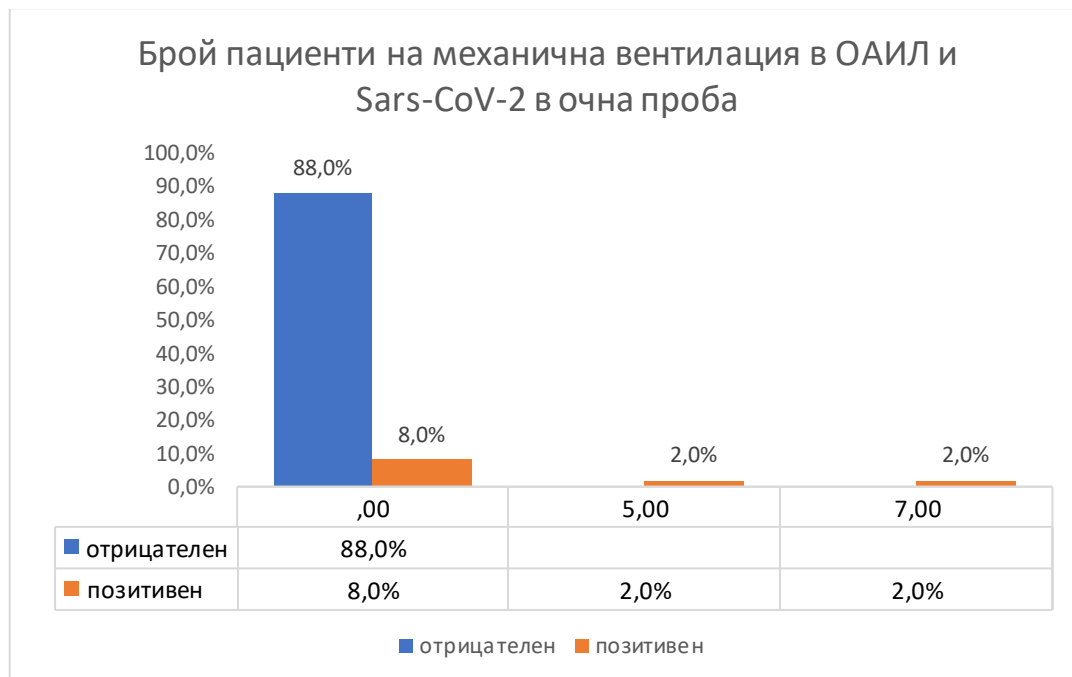
2,0	Брой пациент и	25	2	27
	% от всички	50,0%	4,0%	54,0%
3,0	Брой пациент и	4	0	4
	% от всички	8,0%	0,0%	8,0%
4,0	Брой пациент и	1	2	3
	% от всички	2,0%	4,0%	6,0%
5,0	Брой пациент и	1	0	1
	% от всички	2,0%	0,0%	2,0%
6,0	Брой пациент и	2	0	2
	% от всички	4,0%	0,0%	4,0%
7,0	Брой пациент и	0	1	1
	% от всички	0,0%	2,0%	2,0%
8,0	Брой пациент и	0	1	1
	% от всички	0,0%	2,0%	2,0%
Средна		2,07	4,50	
Стандартно отклонение / SD		1,26	2,51	
Общо	Брой пациент и	44	6	50
	% от всички	88,0%	12,0%	100,0%

Таблица 10. Приемани антибиотици в лечебно заведение и SARS-CoV-2 в очна проба, резултати от изследване на връзка

В Таблица 11 са представени резултатите от проведения дисперсионен анализ за проверка за статистически значима връзка между броя антибиотици, прилагани по време на лечението в болница и PCR от очен секрет. Поради това, че при една от двете групи отрицателен и позитивен PCR очи е установено, че разпределението не е нормално, е използван непараметричен метод чрез критерия на Кръскал-Уолис. Равнището на значимост Sig. е  $0,006 < 0,05 = \alpha$ , следователно има основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза в полза на алтернативната, която гласи, че **Броят антибиотици, прилагани по време на лечението в болница има статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба.**

#### 5.2.2.5. Брой пациенти на механична вентилация в ОАИЛ по дни

На фигура 14 е представено разпределението на пациентите, при които се е наложило преминаване към механична вентилация и PCR теста от очен секрет. Пациентите с положителен резултат са разпределени в 3 групи – такива, които не са били подложени на механична вентилация - 8% от изследваните, такива, които са били на механична вентилация в рамките на 5 дни - 2% от изследваните и такива, които са били интубирани за 7 дни - 2% от изследваните. Пациентите с отрицателен резултат за SARS-CoV-2 от очната проба не са били подлагани на механична вентилация за нито един ден.



Фигура 12. Брой пациенти на механична вентилация в ОАИЛ и SARS-CoV-2 в очна проба  $x =$  Дни механична вентилация  $y =$  Дял на пациентите в %

Брой пациенти на механична вентилация в ОАИЛ и SARS-CoV-2 в очна проба							
			PCR очи		Общо	Kruskal-Wallis Test / Chi-Square	P-value
			отрицателен	позитивен			
Механична вентилация ОАИЛ	,00	Брой пациенти	44	4	48	14,966	0,000
		% от всички	88,0%	8,0%	96,0%		
	5,00	Брой пациенти	0	1	1		
		% от всички	0,0%	2,0%	2,0%		
	7,00	Брой пациенти	0	1	1		
		% от всички	0,0%	2,0%	2,0%		
Средна			0,00	2,00			
Стандартно отклонение / SD			0,00	3,16			

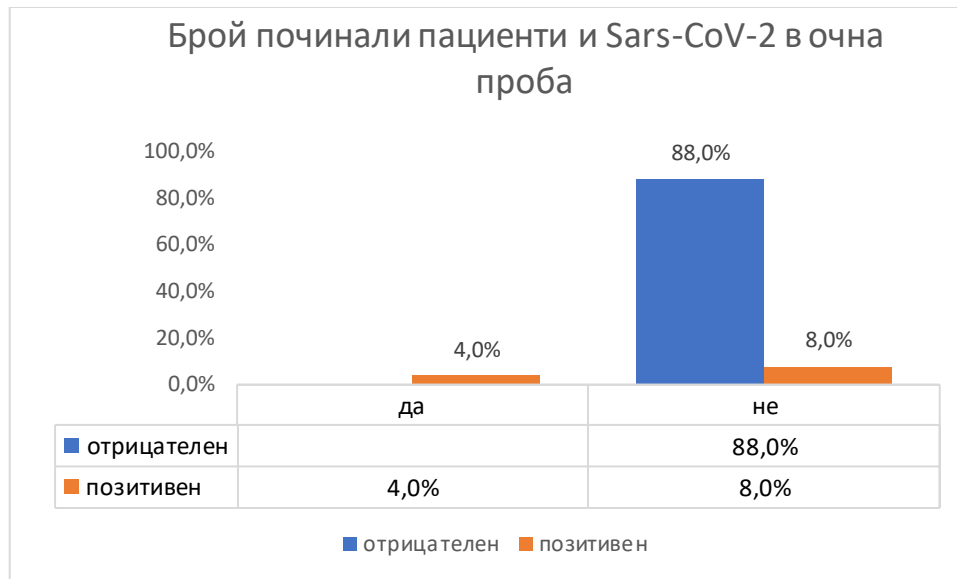
Таблица 11.. Брой пациенти на механична вентилация в ОАИЛ и SARS-CoV-2 в очна проба, резултати от изследване на връзки

В Таблица 12 са представени резултатите от проведения дисперсионен анализ за проверка за статистически значима връзка между проведената механична вентилация ОАИЛ и PCR на очна проба. Поради това, че при една от двете групи отрицателен и позитивен PCR очи е установено, че разпределението не е нормално, е използван непараметричен метод чрез критерия на Кръскал-Уолис. Равнището на значимост Sig. е  $0,000 < 0,05 = \alpha$ , следователно има основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза в полза на алтернативната, която гласи, че **преминаването към механична вентилация в ОАИЛ има статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба.**

#### 5.2.2.6. Брой починали пациенти

На фигура 15 е представено разпределението на пациентите, при които е настъпил летален изход и PCR теста от очен секрет. Пациентите с позитивен резултат са разпределени в двете групи – починали и оздравели. В групата на пациентите с летален изход те са 4% от изследваните, а в групата на възстановилите се - 8%. Като в групата на пациентите с летален изход има разпределени единствено пациенти с позитивен резултат от теста от очен секрет.

Пациентите с отрицателен резултат от теста са регистрирани единствено в групата на пациентите без летален изход.



Фигура 13. Брой починали пациенти и SARS-CoV-2 в очна проба:

$x =$  Регистриран летален изход;  $y =$  Дял на пациентите в %

<b>Брой починали пациенти и SARS-CoV-2 в очна проба</b>						Chi- квадрат	P- value
		PCR очи		Общо			
<b>Летален изход</b>	да	Брой пациенти	0	2	2	15,278	0,000
		% от всички	0,0%	4,0%	4,0%		
	не	Брой пациенти	44	4	48		
		% от всички	88,0%	8,0%	96,0%		
<b>Общо</b>	Брой пациенти	44	6	50			
	% от всички	88,0%	12,0%	100,0%			

Таблица 12. Брой починали пациенти и SARS-CoV-2 в очна проба, резултати от изследване на връзки

В Таблица 13 са представени резултатите от изследването на връзките между резултатите от очния PCR тест и настъпването на летален изход. Изследването на връзката е осъществено чрез Хи-квадрат анализ, чрез критерия на Пирсън. Двете променливи са на слаби скали и по точно на номиналната скала. Налице е неравенството  $\text{Sig}=0.000 < \alpha=0.05$ . По данни от настоящата извадка има основание да бъде отхвърлена нулевата хипотеза за сметка на алтернативната, следователно **налице статистически значима зависимост между PCR тест от очен секрет и настъпването на летален изход.**

Обобщено показателите, изчислени при анализа на статистически значимите връзки са представени в Таблица 14.

Резултати от изследване на статистическа връзка между SARS-CoV-2 в очна проба и	Kruskal-Wallis Test / Chi-Square	Kendall's tau-c	P-value
Хемоза на конюнктивата		-0,208	0,027
Приемани антибиотици в лечебно заведение	7,507	-	0,006
Необходимост от подаване на допълнителен кислород при хоспитализация	6,857	-	0,011
Брой дни на допълнително подаван кислород в стационара	4,759	-	0,029
Брой пациенти на механична вентилация в ОАИЛ	1,966	-	0,000
Брой починали пациенти	15,278	-	0,000

Таблица 13. Резултати от изследване на статистическа връзка между SARS-CoV-2 в очна проба и някои променливи

## VI. ОБСЪЖДАНЕ

Към момента на започване на проучването през 2021г, глобалната пандемия от КОВИД-19 беше в разгара си. Усилията на водещи учени от различни направления, в т.ч. медицински, биологични, имуно-химични, фармацевтични и пр. бяха насочени към проучване на SARS-CoV-2 - особеностите на неговото предаване, клинично протичане, потенциални усложнения и възможностите за тяхното прогнозиране и предотвратяване. В България също бяха въведени мерки с високо ниво на препоръчителност при контакт и работа с болни или подозрителни за КОВИД-19.

Поради наблюденията за офталмологично ангажиране без конкретни данни за проследяване и документиране на изследванията, необходимостта от набиране на клинична информация беше особено актуална.

Rt-PCR тестът за SARS-CoV-2 в очен секрет е отрицателен при 88% от изследваните пациенти и е позитивен при 12%. Това корелира с резултатите от

литературата, където положителните проби отчитат основно между 7,5% и 24% (39, 72, 85, 86), според други анализи дори 3,5% (58). В настоящото проучване доказаните положителни очни PCR проби са процентно значително по-малко в сравнение с резултатите от назофарингеалните такива, което съответства на известните до момента данни (73).

При двумерното разпределение на променливите пол и положителен PCR очен тест се вижда, че позитивните пациенти са разпределени по равно между мъже и жени, по 6% за всяка от двете групи. При пациентите с отрицателен резултат по-голям дял имат мъжете 48% в сравнение с жените 40%.

Възрастта няма статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба, но по-голям е процентът на положителните очни проби при пациенти между 60 и 70 г.в.

#### 1. Офталмологична находка при болни с положителен SARS-CoV-2 от очен PCR тест

Изследването в УМБАЛ Лозенец относно очните оплаквания на пациентите показва сходни резултати с публикуван мета анализ през 2021г от Nasiri et all. (87), където честотата на симптомите е около 11%. Субективна очна симптоматика имат 12% от позитивните пациенти, като тя е най-вече лека - в 10%. Негативните пациенти имат очни оплаквания в 88% от случаите като се те също са класифицирани предимно в леката степен - в 36%. На практика всички изследвани - и с положителна, и с отрицателна конюнктивна проба за SARS-CoV-2, имат субективни очни оплаквания. Те са проявени в различна степен при 98% от лицата.

Резултатите потвърждават научните публикации, че пациенти без конюнктивит или манифестни очни симптоми имат налична вирусна РНК по очната повърхност и незащитеният контакт със слъзна течност крие обоснован риск от заразяване с COVID-19. (74, 88, 89).

Рискът от очно предаване на болестта трябва да се има предвид дори и при липса на офталмологични прояви. Медицинският персонал трябва да взема мерки при контакт с диагностицирани или съмнителни за COVID-19 пациенти за да избегне собственото си заразяване и да ограничи трансмисивността.

От обективните офталмологични показатели са регистрирани находките в ПОС – хиперемия и хемоза на конюнктивите, патологична секреция и повърхностни дефекти на роговиците, багреци се с флуоресцеин. Тези параметри са достъпни за оценка при леглото на болния с портативни средства без специализирана апаратура. Целта е недопускане излишната контаминация на пространства извън определените за пациенти с Ковид и избягване на потенциални рискови контакти със здрави офталмологични пациенти и медицински персонал. Багрене на роговиците не се установи при нито един болен. Хиперемията на конюнктивата се установява при всички пациенти с незначителна процентна разлика, хемоза има при 2% от

позитивните и при 64% от негативните пациенти, докато засилена секреция от конюнктивата е регистрирана приблизително по равно - съответно при 50% от позитивните и 58% от негативните изследвани. Обобщено хиперемия имат 12%, патологичен секрет - 6% и хемоза 2% от позитивните пациенти и е налице статистически значима зависимост между позитивния PCR тест от очен секрет и хемозата с  $p=0,027$ , при риск за грешка от първи род 5%.

При пациенти с COVID-19 офталмологичните симптоми и оплаквания не са задължително обвързани с резултата от конюнктивната PCR проба. Както е описано в други публикации, положителен SARS-CoV-2 тест от очен секрет има и при пациенти без локална находка (90). За контрол на разпространяването на вируса и овладяване на пандемията е важно прилагане на иновативни и ефективни планове за организация на работата на очните специалисти, въвеждане и спазване на подходящи противоепидемични мерки и правила.

## 2. Прилагана терапия

Събрани са данни за домашното лечение на пациентите преди постъпването в стационара. Обичайно е провеждана симптоматична терапия с антипиретици, муколитици и антиагреганти. В някои по-тежки случаи са приемани КС и АБ, които са до 5 различни вида или средно 0,94.

В стационара предписаните антибиотици са максимално 8 на брой, средно 2,36. При пациентите с положителен SARS-CoV-2 rt-PCR очен тест има статистически значима връзка с този показател  $p=0,006$ . Специализирана противовирусна терапия са получили 20% от негативните и 4% от позитивните в очен PCR, тук не е налице статистически значима зависимост.

## 3. Клинични и лабораторни показатели

Един от класическите маркери за инфекция и възпалителен процес е повишаването на телесната температура. Патологични са стойностите над 37 градуса. Максимално регистрираната температура е 41 градуса. Не се установи статистически значима разлика между пациенти с позитивен и негативен резултат от очния секрет и най-високата телесна температура, както и в продължителността на поддържане на фебрилитета над 38 градуса.

Основен лабораторен маркер за възпалителна активност е С-реактивния протеин с референтни граници в лабораторията на УМБАЛ „Лозенец“ 0-5 mg/l. Максималната регистрирана стойност е 365 mg/l, а средната - 94,02 mg/l. Най-високо отчетените стойности на CRP нямат статистически значима връзка с положителния резултат от PCR.

## 4. Белодробно засягане

Основно показание за постъпване за лечение в болница при Ковид -19 е възпалението на белодробния паренхим – интерстициална вирусна пневмония. От

всички изследвани болни само двама са без COVID -19 асоциирана пневмония. Те са развили пулмонални тромбемболични усложнения като следствие на компрометираната от вируса хемокоагулация. Разпределени са по равно в групите с положителен и отрицателен за SARS-CoV-2 очен секрет с дял по 2%. Оценка на тежестта на белодробно ангажиране се прави от специалисти по образна диагностика. За динамично проследяване в МБАЛ „Лозенец“ е възприета точкова скала на компютъртомографските изображения – КТ скор в 5 групи. Не съществува статистически значима връзка между SARS-CoV-2 в очен секрет и променливите пневмония и КТ скор групи.

#### 5. Кислородна сатурация SpO<sub>2</sub> и допълнително подаван кислород

Кислородната сатурация SpO<sub>2</sub> отразява насищането на кръвта с кислород и е показател пряко свързан с дихателната недостатъчност. Измерва се неинвазивно с пулсоксиметрия обичайно на дисталната фаланга на втори или четвърти пръст на ръката. Острото и трайното задържане под 94% е пряк риск за окислителните процеси в организма и застрашава функционирането на нервната система.

Най-ниско регистрираното ниво на кислородна сатурация при постъпването е 33% с размах 67 процентни пункта и средна стойност 90,59%. Няма статистически значима връзка с резултата от PCR в очна проба и минималната стойност на SpO<sub>2</sub> в стационара.

От допълнителен кислород при хоспитализация са се нуждаели 50% от всички пациенти. Налице е статистически значима зависимост между положителните пациенти от очен PCR и нуждата от подаване на кислород в момента на постъпване **p=0,011**. При постъпване болните, които не са с необходимост от кислородна суплементация имат статистически значима по- висока честота на положителен очен PCR тест.

Най-ниско регистрираното ниво на кислородна сатурация в стационара е 74% с размах 20 процентни пункта и средна стойност 88,36%. Няма статистически значима връзка с резултата от PCR очна проба и минималната стойност на SpO<sub>2</sub> в стационара.

За 29 пациенти е регистрирана информация за броя дни, които са прекарвали на допълнителен кислород, като максималният брой дни е 26, а минималният- 1 ден. Най-много 27,6% са били 11 дни на допълнителен кислород, най-малко 3,4% съответно по 1, 12, 13 и 14 дни на допълнителен кислород. Броят дни на допълнителен кислород има статистически значима връзка с положителния ПСР резултат от очна проба **p=0,029**.

#### 6. Параметри, свързани с пролежаване в Отделение за Анестезиология и Интензивно Лечение - ОАИЛ

При някои болни COVID-19 протича като генерализирана и тежка обща инфекция. Задълбочаването на дихателната недостатъчност и нестабилните хемодинамични показатели са причина за привеждане на част от пациентите в отделение за интензивни

грижи. Максималният брой дни в ОАИЛ е 25, а минималният- 1 ден или средно 1,32 дни. Няма статистически значима връзка с резултата от PCR взет от очна проба.

Когато не е възможно поддържане на оптимална сатурация, се налага подаване на все по- големи обеми кислород над 30 l/min. Такива пациенти се подлагат на неинвазивна вентилация с непрекъснато положително налягане на дихателните пътища СРАР. Ако хипоксията не се овладее, се преминава към механична вентилация и ендотрахеално подаване кислород с възможност за максимална фракция до 100%. Неинвазивната вентилация в ОАИЛ няма статистически значима връзка с резултата от PCR очна проба  $p=0,729$ . Механичната вентилация в ОАИЛ има статистически значима връзка с резултата от PCR очна проба  **$p=0,000$** .

Починалите пациенти с КОВИД са 2-ма, единствено с позитивен резултат от теста от очен секрет или 4% от изследваните. Пациентите с отрицателен резултат от очния тест са регистрирани единствено в групата на пациентите без летален изход – 88%. Налице статистически значима зависимост между PCR очен секрет и показателя Летален изход  **$p=0,000$** .

Схема 2 обобщава нагледно получените дотук резултати:

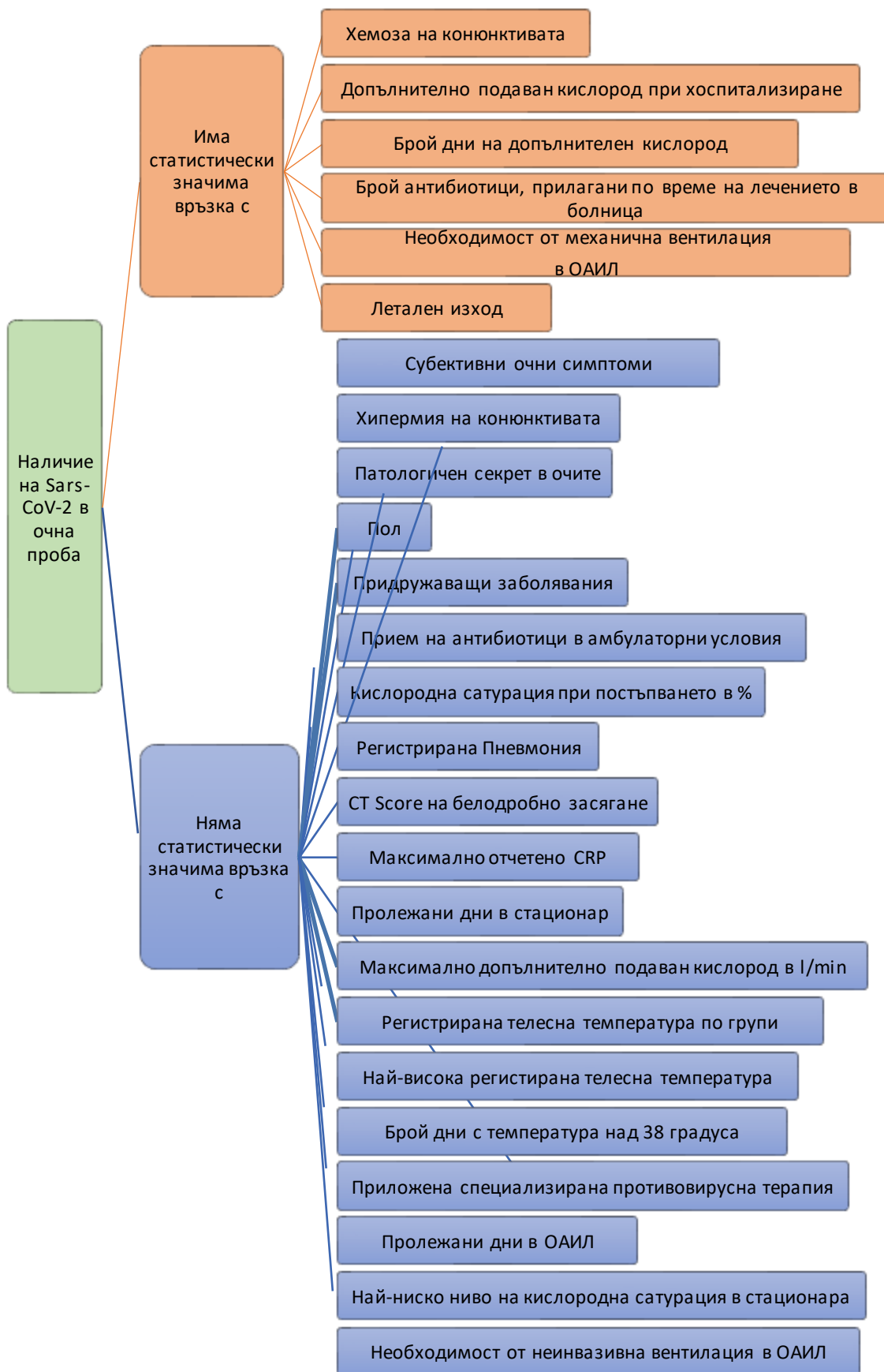


Схема 2. Обобщени резултати за получени статистически връзки

## VII. ИЗВОДИ

Получените резултати и тяхното обсъждане позволяват извеждането на следните изводи:

1. Изследването на конюнктивни проби посредством *rt* PCR е научно базиран метод за изолиране на SARS-CoV-2 от очната повърхност и доказва отделянето на вируса в слъзния филм на хора с установен COVID-19.
2. Изследването на SARS-CoV-2 в конюнктивна проба чрез *rt*-PCR е с много по-ниска достоверност за първично доказване на вирусоносителство в сравнение с пробата от назофаринкса, едва при 12% от изследваните.
3. От пациентите с доказан SARS-CoV-2 в конюнктивна проба, в най-голям процент са разпределени във възрастовата група 60-70 год.
4. Тежестта на клиничната находка в предния очен сегмент и субективните оплаквания не показват връзка с наличието на SARS-CoV-2 в конюнктивна проба, доказана чрез *rt*-PCR.
5. Очните специалисти трябва да работят внимателно и с предпазни средства не само при контакт с доказани COVID случаи, а също при пациенти с несъмнителни очни симптоми.
6. Пациенти, които правят впечатление за кислородонезвисими и нямат нужда от суплементация с кислород при първоначалното си постъпване в стационара, имат статистически значим по-голям процент позитивен SARS-CoV-2 в очния секрет.
7. При болни с позитивен *rt*-PCR тест за SARS-CoV-2 от очен секрет се доказва необходимост от прилагане на множество антибиотични препарати за клинично повлияване на възпалителния процес.
8. Пациентите с позитивен *rt*-PCR тест за SARS-CoV-2 от очен секрет поддържат оптимално SpO<sub>2</sub> като получават допълнителен кислород с назална канюла или маска за по-продължителен период време.
9. Рискът от трайно десатуриране и преминаване към механична вентилация в ОАИЛ е повишен при доказан SARS-CoV-2 в очна проба.
10. При пациентите с позитивен *rt*-PCR тест за SARS-CoV-2 от очен секрет има статистически значима по- висока честота от настъпване на летален изход.

## VIII. ПРИНОСИ

1. За пръв път у нас е проведено проучване, което систематично анализира слъзния секрет на болни с COVID-19 за наличието на SARS-CoV-2 и прави съпоставка с проявената клинична и офталмологична находка.
2. Потвърждава се очният контакт като вероятен път на разпространение на SARS-CoV-2 инфекцията.
3. Потвърждава се ангажирането на очната повърхност при пациенти с коронавирусно заболяване без това да има значима връзка с доказване на вирусния антиген в очна проба.
4. Потвърждава се нуждата от разработване на програма за превенция на риска за заразяване и разпространение на инфекцията COVID-19 при работа на очните специалисти.
5. Изследването и доказването на SARS-CoV-2 в слъзен секрет като рисков фактор за затегнато протичане на COVID-19 дава възможност за навременно решение за интензифициране на терапията и активно наблюдение на болните с COVID-19.
6. Представените резултати могат да се използват при изработването на критерии за оценяване риска от прогресиране на заболяването COVID-19 и при създаването на нови диагностично -терапевтични подходи като увеличи шанса за по- бързо възстановяване на пациентите.

## IX. БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Gorbalenya, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S. et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- (2) Benvenuto D, Giovanetti M, Ciccozzi A, Spoto S, Angeletti S, Ciccozzi M. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. *J Med Virol*. 2020 Apr;92(4):455–459. doi: 10.1002/jmv.25688. Epub 2020 Feb 7. PMID: 31994738; PMCID: PMC7166400.
- (3) <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>
- (4) Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- (5) Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P., Bretzel, G., Froeschl, G., Wallrauch, C., Zimmer, T., Thiel, V., Janke, C., Guggemos, W., Seilmaier, M., Drost, C., Vollmar, P., Zwirgmaier, K., Zange, S., Wölfel, R., & Hoelscher, M. (2020). Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *The New England journal of medicine*, 382(10), 970–971. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001468>
- (6) Wang, C., Horby, P. W., Hayden, F. G., & Gao, G. F. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 470–473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9)
- (7) Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, Spitters C, Ericson K, Wilkerson S, Tural A, Diaz G, Cohn A, Fox L, Patel A, Gerber SI, Kim L, Tong S, Lu X, Lindstrom S, Pallansch MA, Weldon WC, Biggs HM, Uyeki TM, Pillai SK; Washington State 2019-nCoV Case Investigation Team. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med*. 2020 Mar 5;382(10):929-936. doi: 10.1056/NEJMoa2001191. Epub 2020 Jan 31. PMID: 32004427; PMCID: PMC7092802.
- (8) World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 101 <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200430-sitrep-101-covid-19.pdf> v.101 (30 April 2020).
- (9) Oskar A., Zdravkov Y., Hristova R. et al., Ocular manifestations in COVID-19: clinical case reports and a literature review, *BULGARIAN REVIEW OF OPHTHALMOLOGY*, 2021, Vol.65, No 2
- (10) Wages J. M., Jr. (2005). POLYMERASE CHAIN REACTION. *Encyclopedia of Analytical Science*, 243–250. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1>
- (11) Zhang, Y. Z., & Holmes, E. C. (2020). A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell*, 181(2), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>
- (12) Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*, 92(4), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>

- (13) Velusamy P, Kiruba K, Su CH, Arun V, Anbu P, Gopinath SCB, Vaseeharan B. SARS-CoV-2 spike protein: Site-specific breakpoints for the development of COVID-19 vaccines. *J King Saud Univ Sci.* 2021 Dec;33(8):101648. doi: 10.1016/j.jksus.2021.101648. Epub 2021 Oct 19. PMID: 34690467; PMCID: PMC8523302
- (14) Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6485), 1444–1448. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
- (15) Qiu, Y., Zhao, Y. B., Wang, Q., Li, J. Y., Zhou, Z. J., Liao, C. H., & Ge, X. Y. (2020). Predicting the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) utilizing capability as the receptor of SARS-CoV-2. *Microbes and infection*, 22(4-5), 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.03.003>
- (16) Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- (17) Collin, J., Queen, R., Zerti, D., Dorgau, B., Georgiou, M., Djidrovski, I., Hussain, R., Coxhead, J. M., Joseph, A., Rooney, P., Lisgo, S., Figueiredo, F., Armstrong, L., & Lako, M. (2021). Co-expression of SARS-CoV-2 entry genes in the superficial adult human conjunctival, limbal and corneal epithelium suggests an additional route of entry via the ocular surface. *The ocular surface*, 19, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2020.05.013>
- (18) Senanayake, P.d, Drazba, J., Shadrach, K., Milsted, A., Rungger-Brandle, E., Nishiyama, K., Miura, S., Karnik, S., Sears, J. E., & Hollyfield, J. G. (2007). Angiotensin II and its receptor subtypes in the human retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(7), 3301–3311. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1024>
- (19) Yan Sun LL, Pan X, Jing M. Mechanism of the action between the SARS-CoV S240 protein and the ACE2 receptor in eyes. *J Virol* 2006; 6:783–6
- (20) Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- (21) Loon, S. C., Teoh, S. C., Oon, L. L., Se-Thoe, S. Y., Ling, A. E., Leo, Y. S., & Leong, H. N. (2004). The severe acute respiratory syndrome coronavirus in tears. *The British journal of ophthalmology*, 88(7), 861–863. <https://doi.org/10.1136/bjo.2003.035931>
- (22) Lu, C. W., Liu, X. F., & Jia, Z. F. (2020). 2019-nCoV transmission through the ocular surface must not be ignored. *Lancet (London, England)*, 395(10224), e39. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30313-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30313-5)
- (23) Olofsson S, Kumlin U, Dimock K, Arnberg N. Avian influenza and sialic acid receptors: more than meets the eye? *Lancet Infect Dis.* 2005; 5:184–188.) (Belser JA, Rota PA, Tumpey TM. Ocular tropism of respiratory viruses. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013; 77:144–156

- (24) Belser, J. A., Rota, P. A., & Tumpey, T. M. (2013). Ocular tropism of respiratory viruses. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 77(1), 144–156. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00058-12>
- (25) Sen, M., Honavar, S. G., Sharma, N., & Sachdev, M. S. (2021). COVID-19 and Eye: A Review of Ophthalmic Manifestations of COVID-19. *Indian journal of ophthalmology*, 69(3), 488–509. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_297\\_21](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_297_21)
- (26) Guo, D., Xia, J., Wang, Y., Zhang, X., Shen, Y., & Tong, J. P. (2020). Relapsing viral keratoconjunctivitis in COVID-19: a case report. *Virology journal*, 17(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01370-6>
- (27) Sindhuja, K., Lomi, N., Asif, M. I., & Tandon, R. (2020). Clinical profile and prevalence of conjunctivitis in mild COVID-19 patients in a tertiary care COVID-19 hospital: A retrospective cross-sectional study. *Indian journal of ophthalmology*, 68(8), 1546–1550. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_1319\\_20](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_1319_20)
- (28) Chen L, Liu M, Zhang Z, Qiao K, Huang T, Chen M, et al Ocular manifestations of a hospitalised patient with confirmed 2019 novel coronavirus disease *Br J Ophthalmol*. 2020; 104:748–51
- (29) Nayak B, Poddar C, Panigrahi MK, Tripathy S, Mishra B. Late manifestation of follicular conjunctivitis in ventilated patient following COVID-19 positive severe pneumonia *Indian J Ophthalmol*. 2020; 68:1675–7
- (30) Scalinci SZ, Battagliola ET. Conjunctivitis can be the only presenting sign and symptom of COVID-19 IDCases. 2020;20: e00774
- (31) Navel V, Chiambaretta F, Dutheil F. Haemorrhagic conjunctivitis with pseudomembranous related to SARS-CoV-2 *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2020;19:100735
- (32) Mangana CM, Kargacin AB, Barraquer RI. Episcleritis as an ocular manifestation in a patient with COVID-19 *Acta Ophthalmol*. 2020 doi: 10.1111/aos.14484
- (33) Otaif W, Al Somali AI, Al Habash A. Episcleritis as a possible presenting sign of the novel coronavirus disease: A case report? *Am J Ophthalmol Case Rep*. 2020; 20:100917 doi: 10.1016/j.ajoc.2020.100917
- (34) Meduri A, Oliverio GW, Mancuso G, Giuffrida A, Guarneri C, Rullo EV, et al Ocular surface manifestation of COVID-19 and tear film analysis *Sci Rep*. 2020;10:1–7.
- (35) Wu P, Duan F, Luo C, Liu Q, Qu X, Liang L, et al Characteristics of ocular findings of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Hubei Province, China *JAMA Ophthalmol*. 2020; 138:575–8 b
- (36) Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China *N Engl J Med*. 2020;382:1708–20
- (37) Zhou Y, Zeng Y, Tong Y, Chen C. Ophthalmologic evidence against the interpersonal transmission of 2019 novel coronavirus through conjunctiva *MedRxiv*. 2020 doi: 10.1101/2020.02.11.20021956 b
- (38) Xia J, Tong J, Liu M, Shen Y, Guo D. Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection *J Med Virol*. 2020; 92:589–94

- (39) Atum M, Boz AA, Çakir B, Karabay O, Köroglu M, Ögütlü A, et al Evaluation of conjunctival swab PCR results in patients with SARS-CoV-2 infection *Ocul Immunol Inflamm.* 2020; 28:745–8
- (40) Zhang X, Chen X, Chen L, Deng C, Zou X, Liu W, et al The evidence of SARS-CoV-2 infection on ocular surface *Ocul Surf.* 2020; 18:360–2
- (41) Lan QQ, Zeng SM, Liao X, Xu F, Qi H, Li M. Screening for novel coronavirus related conjunctivitis among the patients with corona virus disease-19 [Zehua yan ke za zhi] *Chin J Ophthalmol.* 2020;56: E009
- (42) Karimi S, Arabi A, Shahraki T, Safi S. Detection of severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 in the tears of patients with Coronavirus disease 2019 *Eye.* 2020; 34:1220–3
- (43) Hong N, Yu W, Xia J, Shen Y, Yap M, Han W. Evaluation of ocular symptoms and tropism of SARS-CoV-2 in patients confirmed with COVID-19 *Acta Ophthalmol.* 2020;98: e649–55
- (44) Seah IY, Anderson DE, Kang AE, Wang L, Rao P, Young BE, et al Assessing viral shedding and infectivity of tears in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients *Ophthalmology.* 2020; 127:977–9
- (45) Zhou Y, Duan C, Zeng Y, Tong Y, Nie Y, Yang Y, et al Ocular findings and proportion with conjunctival SARS-COV-2 in COVID-19 patients *Ophthalmology.* 2020; 127:982–3 c
- (46) Cheema M et al (2020) Cheema M, Aghazadeh H, Nazarali S, Ting A, Hodges J, McFarlane A, et al Keratoconjunctivitis as the initial medical presentation of the novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) *Can J Ophthalmol.* 2020;55: e125–9
- (47) Aggarwal K, Agarwal A, Jaiswal N, Dahiya N, Ahuja A, Mahajan S, et al Ocular surface manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis *PLoS One.* 2020;15:e0241661
- (48) Ceran BB, Ozates S. Ocular manifestations of coronavirus disease 2019 *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2020; 258:1959–63
- (49) Dimitrov Tsv., Kirkova R. Our experience in Covid-19. *BULGARIAN REVIEW OF OPHTHALMOLOGY*, 2022, Vol.66, No 1
- (50) Ozturk, M., Kumova, D., Alacam, S., Erdogan, H., & Onder, F. (2023). Detection of coronavirus in tear samples of hospitalized patients with COVID-19. *International ophthalmology*, 43(2), 451–462. <https://doi.org/10.1007/s10792-022-02442-y>
- (51) Nayak, R., Bhat, S., R Kamath, A., Chandak, A., & Khare, K. (2022). Detection of SARS-CoV-2 in conjunctival secretion and tears in patients with COVID-19 in a tertiary care centre, South India. *F1000Research*, 11, 1059. <https://doi.org/10.12688/f1000research.123556.2>
- (52) Arora, R., Goel, R., Saxena, S., Manchanda, V., Ahmad, M., Gupta, G., Chhabra, M., Kumar, S., Nguyen, T. M. N., Payden, P., & Saxena, K. (2021). Comparative Evaluation of Tears and Nasopharyngeal Swab for SARS-CoV-2 in COVID-19 Dedicated Intensive Care Unit Patients. *Ocular immunology and inflammation*, 29(4), 690–696. <https://doi.org/10.1080/09273948.2021.1903938>
- (53) Singh, K., Pattebahadur, R., Shete, V., Bang, P., Mishra, M., & Gade, N. (2023). The Characteristics of Ocular Findings and the Presence of SARS-CoV-2 in

- the Tears of Coronavirus Disease 2019 Patients. *Cureus*, 15(9), e44589.  
<https://doi.org/10.7759/cureus.44589>
- (54) Bansal, R., Bora, I., Kanta, P., Singh, M. P., Angrup, A., Suri, V., Mohindra, R., Jaswal, S., Meena, S. C., Bhalla, A., Malhotra, P., Gupta, V., & Ray, P. (2024). Cycle threshold values of SARS-CoV-2 RNA in conjunctival swabs and nasopharyngeal secretions: a comparative study from a tertiary care center in India. *International ophthalmology*, 44(1), 29. <https://doi.org/10.1007/s10792-024-02976-3>
- (55) Azzolini, C., Donati, S., Premi, E., Baj, A., Siracusa, C., Genoni, A., Grossi, P. A., Azzi, L., Sessa, F., Dentali, F., Severgnini, P., Minoja, G., Cabrini, L., Chiaravalli, M., Veronesi, G., Carcano, G., Maffioli, L. S., & Tagliabue, A. (2021). SARS-CoV-2 on Ocular Surfaces in a Cohort of Patients With COVID-19 From the Lombardy Region, Italy. *JAMA ophthalmology*, 139(9), 956–963.  
<https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2020.5464>
- (56) Brad H. Feldman, M.D., Adeela M. Alizai, MD, Eric Weinlander, MD, Maria A. Woodward, MD, Benjamin Buckner, MD, Vandana Reddy, MD, Seyed-Farzad Mohammadi, MD MPH FICO, Amy Lin, MD  
[https://eyewiki.aao.org/Ocular\\_Discomfort](https://eyewiki.aao.org/Ocular_Discomfort) accessed March 20, 2022)
- (57) Liu, R. F., Wu, X. X., Wang, X., Gao, J., Zhou, J., & Zhao, Q. (2017). Efficacy of olopatadine hydrochloride 0.1%, emedastine difumarate 0.05%, and loteprednol etabonate 0.5% for Chinese children with seasonal allergic conjunctivitis: a randomized vehicle-controlled study. *International forum of allergy & rhinology*, 7(4), 393–398. <https://doi.org/10.1002/alar.21882>
- (58) Kang, J. W., Chun, Y. S., & Moon, N. J. (2021). A comparison of accommodation and ocular discomfort change according to display size of smart devices. *BMC ophthalmology*, 21(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01789-z>
- (59) Qazi Y, Hurwitz S, Khan S, Jurkunas UV, Dana R, Hamrah P. Validity and reliability of a novel ocular pain assessment survey (OPAS) in quantifying and monitoring corneal and ocular surface pain. *Ophthalmology*. 2016;123(7):1458–68.
- (60) Mehra, D., Cohen, N.K. & Galor, A. Ocular Surface Pain: A Narrative Review. *Ophthalmol Ther* 9, 1–21 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40123-020-00263-9>
- (61) Sickenberger W. (2014). *Klassifikation von Spaltlampenbefunden: Ein praxisnahes Handbuch nicht nur für Kontaktlinsenanpasser*. 4th ed. Heidelberg: DOZ-Verlag
- (62) Bailey IL Bullimore MA Raasch TW Taylor HR. Clinical grading and the effects of scaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991; 32: 422–432. [PubMed]
- (63) Chong E Simpson T Fonn D. The repeatability of discrete and continuous anterior segment grading scales. *Optom Vis Sci*. 2000; 77: 244–251. [CrossRef] [PubMed]
- (64) Schulze MM Hutchings N Simpson TL. Grading bulbar redness using cross-calibrated clinical grading scales. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52: 5812–5817. [CrossRef] [PubMed]
- (65) Mandell RB. Slit lamp classification system. *J Am Optom Assoc*. 1987; 58: 198–201. [PubMed]
- (66) In Ki Park, Yeoun Sook Chun, Kwang Gi Kim, Hee Kyung Yang, Jeong-Min Hwang; *New Clinical Grading Scales and Objective Measurement for Conjunctival*

- Injection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013;54(8):5249-5257.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.12-10678>.
- (67) Pothan, A. G., & Parmar, M. (2023). Fluorescein. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- (68) Burrow, M. K., & Patel, B. C. (2023). Keratoconjunctivitis. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- (69) Panpradist, N., Toley, B. J., Zhang, X., Byrnes, S., Buser, J. R., Englund, J. A., & Lutz, B. R. (2014). Swab sample transfer for point-of-care diagnostics: characterization of swab types and manual agitation methods. *PloS one*, 9(9), e105786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105786>
- (70) Малчева М. Молекулярни методи за проучване на серотиповата принадлежност на *Streptococcus pneumoniae*, колонизиращи назофаринкса при деца, дисертационен труд, НЦЗПБ София, 2020
- (71) Zedtwitz-Liebenstein, K. Correctly performed nasal swabs. *Infection* 49, 763–764 (2021). <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01607-8>
- (72) Arora, R., Goel, R., Kumar, S., Chhabra, M., Saxena, S., Manchanda, V., & Pumma, P. (2021). Evaluation of SARS-CoV-2 in Tears of Patients with Moderate to Severe COVID-19. *Ophthalmology*, 128(4), 494–503
- (73) Kimpel, J., Rössler, A., Bante, D., Borena, W., von Laer, D., Zehetner, C., Rauchegger, T., Seiwald, S., & Falkensammer, B. (2024). Detection of infectious SARS-CoV-2 in ocular samples is linked to viral load in the nasopharynx. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 14, 1332157. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1332157>
- (74) Kaya, H., Çalışkan, A., Okul, M., Sarı, T., & Akbudak, İ. H. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in the tears and conjunctival secretions of Coronavirus disease 2019 patients. *Journal of infection in developing countries*, 14(9), 977–981. <https://doi.org/10.3855/jidc.13224>
- (75) <https://radiologyassistant.nl/chest/covid-19/covid19-imaging-findings>
- (76) Pan F, Ye T, Sun P, Gui S, Liang B, Li L, et al.. Time course of lung changes at chest CT during recovery from coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Radiology*. (2020) 295:715–21. doi: 10.1148/radiol.2020200370, PMID:
- (77) Szabó M, Kardos Z, Kostyál L, Tamáska P, Oláh C, Csánky E, Szekanecz Z. The importance of chest CT severity score and lung CT patterns in risk assessment in COVID-19-associated pneumonia: a comparative study. *Front Med (Lausanne)*. 2023 May 17; 10:1125530. doi: 10.3389/fmed.2023.1125530. PMID: 37265487; PMCID: PMC10229788.
- (78) Yang R, Li X, Liu H, Zhen Y, Zhang X, Xiong Q et al (2020) Chest CT severity score: an imaging tool for assessing severe COVID-19. *Radiol Cardiothorac Imaging* 2(2): e200047
- (79) Han, X., Chen, L., Fan, Y., Alwalid, O., Jia, X., Zheng, Y., Liu, J., Li, Y., Cao, Y., Gu, J., Liu, J., Zheng, C., Ye, Q., & Shi, H. (2023). Longitudinal Assessment of Chest CT Findings and Pulmonary Function after COVID-19 Infection. *Radiology*, 307(2), e222888. <https://doi.org/10.1148/radiol.222888>
- (80) Azadbakht, J., Khoramian, D., Lajevardi, Z. S., Elikaii, F., Aflatoonian, A. H., Farhood, B., Najafi, M., & Bagheri, H. (2021). A review on chest CT scanning parameters implemented in COVID-19 patients: bringing low-dose CT protocols into

- play. *The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, 52(1), 13.  
<https://doi.org/10.1186/s43055-020-00400-1>
- (81) Yuan M, Yin W, Tao Z, Tan W, Hu Y. Association of radiologic findings with mortality of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *PLoS One*. (2020) 15:e0230548. doi: 10.1371/journal.pone.0230548
- (82) Pavan Kumar, M.; Revathi, G.; Supraja, K.; Sechana, K. - Study of demographic analysis, clinical characteristics, diagnosis, management, and complications in COVID-19 patients - *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*; 14(12):64-68, 2021
- (83) Калянов, Т., Петров, В. (2019). Статистика. Издателски комплекс - УНСС.
- (84) Съйкова, И., Стойкова-Къналиева, А., Съйкова, С. (2002). Статистическо изследване на зависимости. Университетско издателство "СТОПАНСТВО".
- (85) Bansal, R., Bora, I., Kanta, P., Singh, M. P., Angrup, A., Suri, V., Mohindra, R., Jaswal, S., Meena, S. C., Bhalla, A., Malhotra, P., Gupta, V., & Ray, P. (2024). Cycle threshold values of SARS-CoV-2 RNA in conjunctival swabs and nasopharyngeal secretions: a comparative study from a tertiary care center in India. *International ophthalmology*, 44(1), 29. <https://doi.org/10.1007/s10792-024-02976-3>
- (86) Vesely, P., Novakova, E., Stubna, M. et al. Coronavirus disease (COVID-19) and conjunctival sac swab findings. *J Ophthal Inflamm Infect* 12, 8 (2022).  
<https://doi.org/10.1186/s12348-022-00285-3>
- (87) Nasiri N, Sharifi H, Bazrafshan A, Noori A, Karamouzian M, Sharifi A (2021) Ocular manifestations of COVID-19: a systematic review and Meta-analysis. *J Ophthalmic Vis Res* 16(1):103–112. <https://doi.org/10.18502/jovr.v16i1.8256>
- (88) Singh, K., Pattebahadur, R., Shete, V., Bang, P., Mishra, M., & Gade, N. (2023). The Characteristics of Ocular Findings and the Presence of SARS-CoV-2 in the Tears of Coronavirus Disease 2019 Patients. *Cureus*, 15(9), e44589.  
<https://doi.org/10.7759/cureus.44589>
- (89) Karimi, S., Arabi, A., Shahraki, T., & Safi, S. (2020). Detection of severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 in the tears of patients with Coronavirus disease 2019. *Eye (London, England)*, 34(7), 1220–1223.  
<https://doi.org/10.1038/s41433-020-0965-2>
- (90) Susiyanti, M., Daniel, H., Faridah, D., Devona, D. A., Pramitha, P., Bela, B., Haryanto, B., Barliana, J. D., Estu, D., Victor, A. A., Putri, N. D., Candra, J., Sutandi, N., & Sitorus, R. S. (2023). Incidence and clinical characteristic of ocular surface manifestation: an evaluation of conjunctival swab results in Corona Virus 2019 (COVID-19) patients in Jakarta, Indonesia. *Journal of ophthalmic inflammation and infection*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12348-023-00343-4>

## Х. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ ПЕРИОДИЧНИ ИЗДАНИЯ

1. Офталмологични аспекти при пациенти с COVID-19, Сл.Стойкова, М. Секуловски; сп. Медикал Магазин бр 113/ 06 2023г ISSN 1314-9709
2. Sars-CoV-2 в конюнктивен секрет на болни с COVID-19, Сл. Стойкова, Д. Казакова, сп. Съвременни медицински проблеми бр 3/ 2023 ISSN 2367-4776
3. Relation of Amiodarone Level with Total Protein Level in Blood Plasma of Covid-19 Hospitalized Patients with Ventricular Heart Arrhythmia; Slavena Stoykova, Wladislav Tashkov 225-229; ISSN 2522-9400 European Modern Studies Journal Vol 7 No 1; DOI: [https://doi.org/10.59573/emsj.7\(1\).2023.20](https://doi.org/10.59573/emsj.7(1).2023.20)

### ДОКЛАДИ В КОНФЕРЕНЦИИ

1. SARS-Cov-2 in the Ocular Surface of COVID-19 Patients; Stoykova S., Terzieva V., Trifonova A., Petrova E.; Abstractband DOG 2023 Ophthalmologie 120( Suppl 2), 71-253(2023) <https://doi.org/10.1007/s00347-023-01901-w>; Доклад в постерна сесия на Немското Офталмологично дружество, Конгрес с международно участие Берлин 28.09-01.10.2023 г.
2. Славена Стойкова, КЛИНИЧЕН ОПИТ ПРИ ПАЦИЕНТИ С COVID-19 И ОФТАЛМОЛОГИЧНО АНГАЖИРАНЕ 43rd International Scientific Conference Knowledge in Practice , Bansko 15/12-17/12 2023; Секционен доклад