

УДК: 619:636.3]:616.98:579.881.13/497.7)

ПРИМЕНА НА КЛАСИЧНИТЕ И ИМУНОЕНЗИМАТСКИТЕ СЕРОЛОШКИ МЕТОДИ ЗА ДИЈАГНОСТИКА И КОНТРОЛА НА Q-ТРЕСКАТА КАЈ ОВЦИТЕ И КОЗИТЕ ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Дине Митров¹, Иванчо Налетоски¹, Синиша Ацевски¹, Игор Џацовски¹,
Крсте Стојановски¹, Искра Цветковиќ²

¹Капедра за здравствена заштита на фармски животни,
Факултет за Ветеринарна медицина - Скопје

²Капедра за микробиологија и имунологија,
Факултет за Ветеринарна медицина - Скопје
e-mail: mitrov@fvm.ukim.edu.mk

АБСТРАКТ

Целта на овој труд беше да се воведат современи методи за дијагностика на Q-треската кај овците и козите во Република Македонија. За таа цел, испитани се со РВК-а и i_ELISA 2.098 проби од овци и кози. Исто така, цел на овој труд беше и одредување на преваленцијата на болеста по епизоотиолошки подрачја како и одредување на мерки за контрола на Q-треската во Република Македонија. Понатаму, одредување на сензитивноста и специфичноста на секоја од користените методи, се со цел да се одреди методата која би се користела за рутинска дијагностика на болеста во Република Македонија.

Како резултат на испитувањата докажано е дека Q-треската е присутна кај овците и козите, а спрема добиените резултати, кои укажуваат на раширеноста по целата територија на Република Македонија, има карактер на ензоотска и ендемска болест.

Кај овците и козите преваленцијата изнесува 14.06%, од испитаните 2.098 проби, позитивни се 295 проби.

Преваленцијата по епизоотиолошки подрачја се движи од 0.0%-32.26%. Врз основа на овие податоци направена е епизоотиолошка карта за раширеноста на Q-треската кај овците и козите по епизоотиолошки подрачја.

Најдобра метода, која покажува највисока сензитивност (во однос на РВК-а 92.1%) и специфичност (во однос на РВК-а 95.8%) во дијагностиката на Q-треската во наши услови е индиректната имуноензимска метода (i_ELISA-серум).

Резултатите укажуваат дека i_ELISA-серум треба да биде метода на избор за рутински и масовни (скрининг) дијагностички испитувања во контрола на Q-треската.

Постои можност за користење на i_ELISA-серум/млеко за дијагностика како на поединечни мостри (конфирматорен тест), така и за дијагностика преку збирни серум (до 10 проби) и млеко (до 100 проби) мостри (скрининг тест).

Бидејќи болеста е раширена на целата територија на нашата земја, препорачливо е за нејзина контрола да се преземат мерки за сузбивање, и тоа комбинирана примена на општи (уништување на крлежите, подобрување на хигиената) и специфични мерки (вакцинација).

Клучни зборови: Q-треска, РВК, ELISA, овци, кози, серум, млеко

ВОВЕД

Q-треската е болест од која заболуваат и животните и луѓето (зооноза). Кај домашните животни (говеда, овци, кози и др.) може да предизвика абортус и атипич-

на бронхопневмонија, но сепак најчесто се јавува во латентна (инапарентна) форма, без симптоми. Кај луѓето се манифестира со општа септикемија, симптоми слични на инфлуенцата, често со атипична пневмонија, ендокардитис и грануломатозен хепатитис.

Бидејќи животните не ја манифестираат болеста со видливи клинички знаци, инфицираните животни претставуваат перманентен извор на зараза за човекот.

Оваа зооноза е опишана (1937) во Австралија, од страна на Derrick кој меѓу првите открил дека Q-треската претставува нова инфективна болест. Во текот на 1935 година авторот ги испитувал настанатите фебрилни состојби кај работниците во една кланица во Бризбејн, Австралија. После тоа ги објавил деталните клинички наоди за 9 случаи на болеста која ја нарекол Q-треска (Q од question – прашање – да би означил нешто непознато). Авторот го изолирал причинителот на оваа болест од крвта и урината, а покасно го пасирал на заморчиња. Австралиските научници Burnet и Freeman (1937) ги откриле и опишале основните особини на предизвикувачот на болеста, кој е идентификуван како рикеција, а Derrick (1939) причинителот го нарекол *Rickettsia burnetii* во чест на микробиологот Burnet. Споменатите истражувачи откриле дека извор на инфекција биле овците. Истата болест е опишана од страна на Davis и Cox (1938) во САД. Тие го изолирале причинителот на болеста од крлежот - *Dermacentor andersoni*. Подоцна, во чест на познатите истражувачи Cox и Burnet, предизвикувачот на болеста добил име *Coxiella burnetii*. Болеста во 1940 година е наречена Q-треска или Квинслендска треска, по името на провинцијата Квинсленд (Австралија) (1).

Денес, Q-треската е распространета во повеќе од 80 земји на сите континенти. Не е дијагностицирана во Белгија, Данска, на Исланд и Нов Зеланд, а во земјите од Африка е малку проучувана.

Во сите земји каде што Q-треската е дијагностицирана кај луѓето, болеста била

утврдена и кај говедата, овците, козите, копитарите, камилите, свињите, кучињата, мачките и птиците. При појавата на болеста кај луѓето постојано е востановувана врска со заболените животни или животните кои ја преболеле заразата. Разбирливо е поврзувањето на ова заболување кај луѓето со постоењето на инфекција кај животните.

Предизвикувач на Q-треската е рикеција, *Coxiella burnetii*, од родот *Coxiella*, од фамилијата *Rickettsiaceae*, строго интрацелуларен, мал микроорганизам (0.2-0.4 μm дебелина и 0.4-1 μm должина. *Coxiella burnetii* класифицирана е во фамилијата *Rickettsiaceae*, но не и во родот *Rickettsia*. Бидејќи не е вистинска рикеција, таа е сврстана во родот *Coxiella* како единствен вид (1). Најновите истражувања, со користење на молекуларни техники, покажуваат дека *Coxiella burnetii* филогенетски е различна од другите членови од фамилијата *Rickettsiaceae*.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

Како материјал за работа во овој труд користени се крвни серуми од овци и кози селектирани по слободен избор. Истите се доставени од страна на локалните ветеринарни друштва по годишната Наредба за испитување на болестите кои се сузбиваат по Законот за ветеринарно здравство. На тој начин обезбедени се проби од скоро сите региони во републиката, односно спрема територијалната поделба. Па така, како материјал за изработка на оваа дисертација издвоени се 1.883 серуми од овци и 215 серуми од кози чувани индивидуално и на фарма. Млеко пробите се земени од

серопозитивни и серонегативни овци и крави од одделни говедарски фарми каде што болеста беше серолошки регистрирана.

Крвните проби по доставувањето во лабораторија, центрифугирани се 5 минути на 2.500 ротации во минута. По центрифугирањето само бистрите и без хемолиза серуми префрлани се во претходно обележани со единствен идентификационен број епруветки. Така спремените серуми, чувани се до работа во замрзнувач на -20°C.

Млечните проби се земани на самата фарма, односно во трлото, по претходно бришење на вимето и самите папили со вата натопена во 76% алкохол. По земањето, млекото е конзервирано со финална концентрација на 0.1% натриум азид (NaN₃) - 1 капка на 3 ml млеко. До работа истите се чувани во замрзнувач на -20°C.

Во овој труд како методи за работа користени се РВК-а и и_ЕЛИСА.

Реакција на врзување на комплемента - РВК-а, микро метода

Постојат повеќе варијанти и модификации за изведување на РВК-а реакцијата. Но, за испитување на серумите, односно за наод на специфични антитела против причинителот на Q-треската, најчесто користена е т.н. ладна метода на РВК-а по Колмер. Во конкретниов случај користена е микрометода на РВК-а, која ги има истите карактеристики и перформанси како и макрометодата, со тоа што се користи 10 пати помала количина на реагенси (антиген, серум, комплемент и др.).

Принципот на тестот се состои во реакцијата на антителата и антигенот во присуство на комплемент, при што се формираат

мираат имуни комплекси антиген-антитело-комплемент, во кои настанува лиза на антигенот. Реакцијата се состои од две фази. Во првата фаза настанува реакција на антигенот со антителата од серумот и комплементот. Во втората фаза се додава хемолитичен систем, кој ја чини реакцијата видлива.

Индиректна имуно ензимска ELISA - и_ELISA

Во овој труд користен е комерцијален CHEKIT® - Q-FEVER ELISA кит, набавен од фирмата Dr.Bommeli AG, Берн, Швајцарија.

Микротитарските плочи се нанесени со адсорбиран инактивиран антиген *Coxiella burnetii*. Разредените серуми се нанесуваат заедно со контролите во дупчињата од микротитарската плоча. Антителата специфични за *Coxiella burnetii* се врзуваат за антигенот и формираат антиген-антитело комплекс на површината од дупчињата на микротитарската плоча. Неврзаниот материјал се отстранува со перење на плочата. Во следната фаза се додава моноклонско анти-антитело (конјугат) обележано со пероксидаза кое се врзува за антитело-антиген комплексот. Неврзаниот конјугат се отстранува со миеење и се додава хромоген (супстрат). Интензитетот на бојата која се развива (мерена на 405 nm) е директно пропорционален со количината на присутните специфични антитела против *Coxiella burnetii* во серумот и млекото кои се испитуваат. Дијагностичката проценка на добиените резултати се одредува со компарирање на оптичката густина (optical density-OD) на пробите (серум-млеко) со оптичката густина на позитивните контроли на серум и млеко.

Резултатите се читаат со спектрофотометар на бранова должина од 405 nm. Во моментот кога разликата во вредноста на оптичката густина (Optical density-OD) помеѓу негативната и позитивната контрола е поголема или еднаква на 0.3, нормално се случува за време од 10-30 минути по додавањето на хромогенот, реакцијата може да се стопира со додавање на 50 µl CHEKIT®-Q-FEVER-Stopping solution. Растворот за стопирање се додава по истиот редослед и брзина како што е додаден и хромогенот.

По стопирањето на реакцијата, плочата се чита и се пристапува кон интерпретација на резултатите.

Резултатите се прикажуваат како процент на позитивност (PP value %) во однос на позитивната контрола. Процентот на позитивност се пресметува по следната формула:

$$\text{ПП} = \frac{\text{OD}_{\text{проби}} - \text{OD}_{\text{нег}}}{\text{OD}_{\text{поз}} - \text{OD}_{\text{нег}}} \times 100$$

Пробите со процент на позитивност под 30% се прогласуваат со негативен резултат, пробите помеѓу 30-40% се сметаат за сомнителни и потребно е да се ретестираат. Пробите со процент на позитивност над 40% се прогласуваат како позитивни.

Статистичка обработка на добиените резултати

Ниедна од користените методи не е декларирана како стандардна метода во “Прирачникот за стандардни дијагностички тестови и вакцини” -OIE, Париз (32). Затоа, за одредување на сензитивноста и специфичноста на користените методи, ко-

ристена е една од методите како стандард, а одредувана е специфичноста и сензитивноста на другата користена метода, односно одредувана е сензитивноста и специфичноста на методите со компарирање на резултатите по принципот секоја со секоја метода, при ниво на поверливост од 95%.

РЕЗУЛТАТИ

По завршените испитувања, резултатите се сумирани, а позитивен статус им е доделен на серум пробите кои покажуваат 100% отсуство на хемолиза во разрежување на серумите 1:10 и повеќе во реакцијата на врзување на комплементот (РВК-а), како и серум и млеко пробите со процент на позитивност над 40% во реакцијата на индиректна имуноензимна метода (i_ELISA).

За да се потврдат прелиминарните сознанија дека Q-треската е присутна кај овците и козите во Република Македонија, испитани се 1.883 овци и 215 кози. Збирните резултати од испитувањето се прикажани во табелата 1.

Со анализа на резултатите прикажани во табелата 1 и графиконот 1, може да се заклучи дека од вкупно испитаните 2.098 проби, серопозитивно реагираат 295 (14.06%) проби. Серопреваленцијата е највисока во Берово (32.26%) и Радовиш (31.37%). Додека не се регистрирани антитела кај грлата кои потекнуваат од епизоотиолошките подрачја: Крива Паланка, Македонски Брод, Ресен и Тетово.

Од резултатите прикажани во табелата 2, се гледа дека од детектираните 295 позитивни проби, 243 (82.37%) на РВК-а и на i_ELISA, додека кај 12 (4.07%) проби најдени се антитела во серумот само со РВК-а, односно кај 40 (13.56%) само со i_ELISA.

Тоа значи, најдобро е да се применуваат двете методи за дијагностика. Ако биде применета само една метода РВК-а или *i*_ELISA, остануваат недетектирани 4.07%, односно 13.56% од серопозитивните грла.

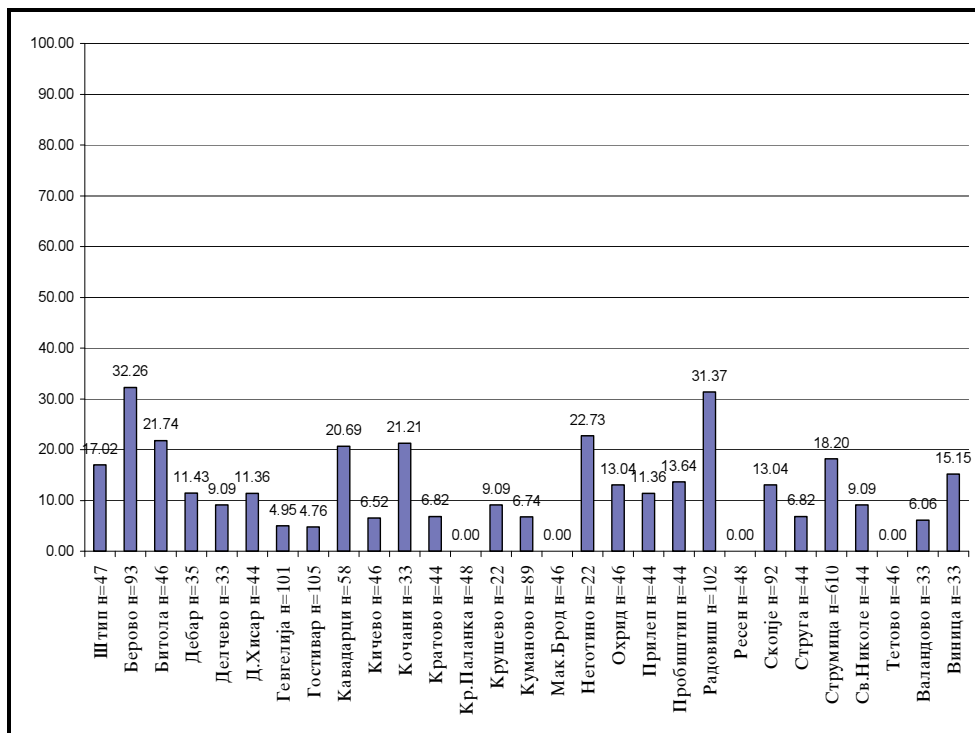
Кај овците, постои можност за детекција на антитела против *Coxiella burnetii* во млекото. Од горенаведената табела може да се види дека 90.65% од серопозитивните овци имаат антитела и во млекото. Совпаѓање на резултатите добиени со анализа на серумот, со оние добиени со анализа на млекото, е најдобро изразено кај млеко пробите кои потекнуваат од епизоотиолошкото подрачје на Радовиш и Струмица со 100.00%, потоа Берово и Гевгелија со по

80.77%, односно 80.00%. Кај пробите кои потекнуваат од Кавадарци процентот на совпаѓање е нешто помал, односно антитела се детектирани во 8 од 12 испитани млека (66.67%).

Кај серонегативните овци најдени се антитела во млекото против причинителот на Q-треската. Од резултатите прикажани во горенаведената табела се гледа дека кај 2.21% од серонегативните овци детектирани се антитела во млекото. Кај серонегативните овци кои потекнуваат од епизоотиолошкото подрачје на Берово, кај 4 (5.97%) од испитани 67 серонегативни овци најдени се антитела во млекото, додека кај овците од епизоотиолошкото подрачје

Табела 1. Наод на антитела против *Coxiella burnetii* кај овци и кози - збиен приказ

Ред.број	Епизоотиол.подрачје	Испитани	Позитивни	Негативни	Преваленција (%)
1	Штип	47	9	38	19.14
2	Берово	93	30	63	32.26
3	Битола	46	10	36	21.74
4	Дебар	35	4	31	11.43
5	Делчево	33	3	30	9.09
6	Демир Хисар	44	5	39	11.36
7	Гевгелија	101	5	96	4.95
8	Гостивар	105	5	100	4.76
9	Кавадарци	58	12	46	20.69
10	Кичево	46	3	43	6.52
11	Кочани	33	7	26	21.21
12	Кратово	44	3	41	6.82
13	Крива Паланка	48	0	48	0.00
14	Крушево	22	2	20	9.09
15	Куманово	89	6	83	6.74
16	Македон.Брод	46	0	46	0.00
17	Неготино	22	5	17	22.73
18	Охрид	46	6	40	13.04
19	Прилеп	44	5	39	11.36
20	Пробиштип	44	6	38	13.64
21	Радовиш	102	32	70	31.37
22	Ресен	48	0	48	0.00
23	Скопје	92	12	80	13.04
24	Струга	44	3	41	6.82
25	Струмица	610	111	499	18.20
26	Свети Николе	44	4	40	9.09
27	Тетово	46	0	46	0.00
28	Валандово	33	2	31	6.06
29	Виница	33	5	28	15.15
ВКУПНО:		2.098	295	1.803	14.06



Графикон 1. Преваленца на Q-треската кај овци по епизоотиолошки подрачја



Слика 1. Епизоотиолошка карта на Q-треската во Р. Македонија кај овците по епизоотиолошки подрачја, прикажана во класи од по 5%

Табела 2. Збирен приказ на резултатите од позитивните проби по методите РВК-а и i_ELISA

Ред.број	Епизоотиолошко подрачје	Испитани проби	Нег.	Поз.	Позитивни на		
					РВК-а и i_ELISA	само РВК-а	само i_ELISA
1	Штип	47	38	9	9	0	0
2	Берово	93	63	30	23	0	7
3	Битола	46	36	10	9	0	1
4	Дебар	35	31	4	3	0	1
5	Делчево	33	30	3	2	1	0
6	Демир Хисар	44	39	5	5	0	0
7	Гевгелија	101	96	5	4	1	0
8	Гостивар	105	100	5	3	2	0
9	Кавадарци	58	46	12	8	4	0
10	Кичево	46	43	3	2	1	0
11	Кочани	33	26	7	6	0	1
12	Кратово	44	41	3	2	0	1
13	Крушево	22	20	2	1	0	1
14	Куманово	89	83	6	5	0	1
15	Неготино	22	17	5	4	0	1
16	Охрид	46	40	6	5	0	1
17	Прилеп	44	39	5	5	0	0
18	Пробиштип	44	38	6	4	0	2
19	Радовиш	102	70	32	27	0	5
20	Скопје	92	80	12	9	0	3
21	Струга	44	41	3	3	0	0
22	Струмица	610	499	111	95	2	14
23	Свети Николе	44	40	4	3	1	0
24	Валандово	33	31	2	2	0	0
25	Виница	33	28	5	4	0	1
	ВКУПНО:	2.098	1.803	295	243	12	40

Табела 3. Наод на антитела со i_ELISA-млеко против *C.burnetii* кај серопозитивни молзни овци

Ред.број	Епизоотиолошко подрачје	Испитани млечни проби од серопозитивни овци	Поз	Нег	% на млеко позитивни
1	Берово	26	21	5	80.77
2	Радовиш	30	30	0	100.00
3	Гевгелија	5	4	1	80.00
4	Струмица	34	34	0	100.00
5	Кавадарци	12	8	4	66.67
	ВКУПНО:	107	97	10	90.65

Табела 4. Наод на антитела со i_ELISA_млеко против *C.burnetii* кај серонегативни молзни овци

Ред.број	Епизоотиолошко подрачје	Испитани млечни проби од серонегативни овци	Поз.	Нег.	% на млеко позитивни
1	Берово	67	4	63	5.97
2	Радовиш	72	1	71	1.39
3	Гевгелија	96	0	96	0.00
4	Струмица	36	2	34	5.56
5	Кавадарци	46	0	46	0.00
	ВКУПНО:	317	7	310	2.21

на Радовиш детектирани се антитела во млекото кај 1 (1.39%) од испитаните 72 млека од серонегативните овци. Со тоа само се потврдува констатацијата дека, кога постои можност кај серонегативните грла, потребно е да се испита млекото на евентуално присутните антитела против *Coxiella burnetii*.

ДИСКУСИЈА

Резултатите добиени со испитувањето на овците и козите се слични на резултатите на другите автори кои ја обработуваат оваа проблематика (2, 4, 12).

Докажано е дека болеста е присутна и кај популацијата на малите преживари, односно кај овците и козите. Резултатите покажуваат дека од вкупно испитаните 2.098 овци и кози заедно, од 29 епизоотиолошки единици, антитела против *Coxiella burnetii* детектирани кај животните во 25 (86.20%) епизоотиолошки подрачја, или кај 295 (14.06%) грла. Констатирана е значителна распространетост на Q-треската на целата територија на нашата република кај оваа популација на животни. Не се регистрирани серопозитивни единки само во 4 епизоотиолошки подрачја и тоа во: Крива Паланка, Македонски Брод, Ресен и Тетово. Преваленцијата се движи од 0 до 32.26%. Серопреваленцијата е највисока во епизоотиолошките подрачја на: Берово - 32.26%, Радовиш - 31.37%, Неготино - 22.73%, Битола - 21.74%, Кочани - 21.21%, и Кавадарци - 20.69%. Во другите епизоотиолошки подрачја преваленцијата е под 20%. Овие резултати укажуваат на можноста дека неконтролираните епизоотии кај овците и козите можат да бидат причина за епидемии кај луѓето и да ја про-

шират заразата во досега незаразени подрачја.

Бидејќи Q-треската кај овците и козите најчесто се манифестира со абортуси, важноста на правовремената дијагностика и елиминирањето на позитивните реактори од стадата има големо значење кај оваа популација на животни. Овие серолошки испитувања укажуваат на поголема заразеност на овците (14.01%) во однос на говедата (9.44%). Оваа констатација се објаснува и со номадскиот начин на овчарење. Важноста на одгледувањето со напасување на овците, во епизоотиологијата и епидемиологијата на Q-треската е во можноста за заразување на животните со мешање на стадата како и со контаминација на пасиштата. Од ова може да се заклучи дека на ризик се изложени не само сопствениците на овците, туку и другите жители.

Во најголем број од испитаните проби од овци, во овој труд, РВК-а антитела се докажани во низок титар, што укажува на хронична, односно латентна инфекција. Заради ова, препорачливо е испитувањата да се вршат непосредно по партусот или абортусот, кога титрите имаат значително повисока вредност. Високиот процент на позитивни реактори меѓу овците, номадското овчарење, користењето на заеднички пасишта од страна на различни стада при одгледувањето на овците, се основни фактори кои ја прават епизоотиолошката ситуација со Q-треската неповолна. Секако дека и начинот на држење на овците има влијание врз преваленцијата на болеста. Така, Саруано и сор. (2001), во една сероепизоотиолошка студија информираат за влијанието на типот на држењето на овците врз серопреваленцијата. Во услови на држење на овците преку зима во трло, а на пролет на отворено,

серопреваленцијата била 19.6%, додека кај овците чувани само во трло во текот на цела година, серопреваленцијата изнесувала 13.2%. Од друга страна, кај овците држани на отворено, преваленцијата била 1.9% (5).

Резултатите кои се добиени со користење на збирни серум и млеко мостри слични се на резултатите на Paiba и сор. (1999), (24). Така, методата i_ELISA-серум/млеко може да се користи во епизоотиолошките подрачја каде што болеста не е регистрирана или е регистрирана со мала преваленција. Со i_ELISA методата може да се испитуваат поединечни серум и млеко проби (како конфирматорен тест) и серум и млеко збирни проби (како скрининг тест). Предноста на овој начин на дијагностика е во економскиот момент, односно од 10 серуми, или 50-100 млеко проби може да се направат единечни (збирни) проби. Со самото тоа се поевтинува дијагностиката на самата болест за 10-100 пати. За испитувањата спроведени во овој труд малку се користеше дијагностиката со збирни мостри од серум и млеко.

Бидејќи РБК-а методата работена со фаза I и фаза II антиген дава скоро иста сензитивност, за одредување на сензитивноста и специфичноста на i_ELISA-серум користени се резултатите кои се добиени со РБК-а фаза I/II антиген.

Добиената сензитивност за i_ELISA-серум (cut off = 40%) во однос на РБК-а фаза I/II (како стандардна метода) е 91.8%, а специфичноста е 97.2%, односно 8.2% од серумите даваат лажно негативна реакција и 2.8% од негативните серуми реагираат лажно позитивно. Ако се одредат малку построги критериуми за позитивност на i_ELISA-серум, односно ако како cut off вредност се земе процентот на позитив-

ност - PP = 30%, во тој случај добиената вредност за сензитивноста на i_ELISA-серум изнесува 81.8%, а специфичноста 98.3%. Значи дека во овој случај ќе се зголеми бројот на лажно негативни серуми, но се намалува бројот на лажно позитивните серуми. Во секој случај, подобро е да се има што помалку лажно негативни реактори, отколку лажно позитивни, бидејќи лажно негативните реактори ќе останат неелиминирани од стадата и ќе претставуваат постојан извор на инфекција на серонегативните реактори во стадото.

Добиената сензитивност за i_ELISA-млеко (cut off = 30%) во однос на РБК-а фаза I/II антиген изнесува 81.01%, а специфичноста е 92.44%. Додека ако i_ELISA-млеко се користи со cut off од 40% сензитивноста се зголемува на 83.1% што е од голема важност затоа што се намалува бројот на лажно позитивни реактори, а специфичноста се намалува на 91.6%.

Пресметаната сензитивност и специфичност за i_ELISA-млеко (cut off = 30%) во однос на i_ELISA-серум (cut off = 30%) изнесува 89.9%, а специфичноста 90.9%. И во овој случај 10.1% од серопозитивните проби даваат лажно негативна реакција, односно 9.1% од серонегативните реагираат со лажно позитивна реакција. Доколку i_ELISA-млеко се користи со 40% cut off во однос на i_ELISA-серум (cut off = 30%), сензитивноста се намалува на 89.2%, а специфичноста расте на 94.3%.

Сензитивноста на i_ELISA_млеко кога се користи со cut off од 30%, во однос на i_ELISA-серум со cut off 40% (како стандард) изнесува 86.7%, односно специфичноста е 95.2%. Ако се користи i_ELISA-млеко со cut off 40% во однос на i_ELISA-серум со cut off 40%, сензитивноста се зголемува на 89.2%, а специфичноста се намалува на 94.3%.

Евидентна е разликата во пониската сензитивност на *i*_ELISA-млеко во однос на другите методи. Ова се објаснува со непостојаното излучување на антителата преку млекото што има за последица послаба сензитивност на методата. Уште еден податок е доста важен кога станува збор за детекција на антителата со серолошки методи, а тоа е дека 6 месеци по партусот, антителата не се детектираат кај овците и козите, односно тие исчезнуваат. Затоа, препорачливо е испитувањата да се вршат непосредно по партусот или абортусот, кога титрите на антителата имаат значително повисока вредност.

Сензитивноста и специфичноста на РВК-а фаза I/II антиген, во однос на *i*_ELISA-серум со cut off 30% е сосема задоволителна и изнесува 92.1% сензитивност и 95.8% специфичност. Сензитивноста на РВК-а фаза I/II, ако како стандард се користи *i*_ELISA-серум со cut off 40%, изнесува 86.1%, односно 13.9% од пробите даваат лажна негативност. Во тој случај специфичноста е подобра и изнесува 98.4%.

Резултатите добиени за сензитивноста и специфичноста на методите се слични на резултатите на други автори (Behumer, D'Harcourt, Devine) (3, 8).

Од горе изнесените податоци за сензитивноста и специфичноста на користените методи може да се заклучи дека најдобри резултати дава *i*_ELISA-серум, и тоа: во однос на РВК-а фаза I/II антиген, како стандард (сензитивност 91.8%, специфичност 97.2%). Бидејќи и кај двете користени методи се јавува одреден процент на лажно негативни реактори, потребно е таквите проби да се проверат барем со уште една метода.

Имајќи ги предвид својствата и досега познатата епизоотиологија на причинителот на Q-треската во светот, а после овие испитувања и кај нас, повеќе автори (6, 7, 9,

11, 13) контролата и сузбивањето на болеста ги сведуваат на примена на општи и специфични мерки.

Од општите мерки за сузбивање и контрола на болеста кај животните кои се чуват слободно (испусти и пасишта) на прво место треба да биде уништувањето на крлежите. Уништувањето на крлежите на големи површини со хемиски средства не само што е скапо и тешко изводливо, туку може да има и големи еколошки последици, односно доведува до нарушување на еко-рамнотежата во природата. Затоа, попрактично е сузбивањето на крлежите на самите животни: капење или прскање со инсектициди со продолжено дејство, односно со репеленти. Кај шталскиот (фарми) начин на држење на животните добри резултати се добиваат ако редовно се одржува хигиената (постелката и плодовите течности треба што побргу по партусот или абортусот да се отстранат и уништат и да се направи темелна дезинфекција). Шталското ѓубре треба што почесто да се чисти и складира на што пооддалечени места од шталите. Во последно време се прават напори за примена на имуногенетски вакцини против крлежите.

Специфичните мерки се истите како и кај другите заразни болести, односно се состојат од примена на терапија и имунопрофилактика (вакцинација). За користење на терапија како мерка за сузбивање на болеста постојат различни мислења. Антибиотиците, кои се терапевски делотворни кај заболениите луѓе, не делуваат на елиминирањето на причинителот од организмот. Значи, организмот клинички се опоравува, но останува клиноносител. Бидејќи, при сузбивањето на заразните болести кај животните поважен е економскиот од етичкиот момент, трајното клиноносителство и покрај применетата терапија и спасување

на единката, го отежнува сузбивањето на болеста во големи агломерации.

Се додека Q-треската има ензоотски карактер меѓу дивите и домашните животни, контролата на инфекциите предизвикани со *Coxiella burnetii* ќе биде макотрпна и тешка. Од моментот кога инфекциите со *Coxiella burnetii* се поврзани со абортуси и инфертилност, сузбивањето и превенцијата на Q-треската добива голем економски карактер. Заради својствата на причинителот (голема отпорност во надворешната средина) и неможноста за санирање на природните жаришта, истражувањата на полето на имунопрофилактиката започнати се доста рано. После долгогодишни искуства во примената на различни вакцини во однос на сојот и фазата на антигенот кој влегува во состав на вакцината, дојдено е до сознание дека најдобра имуногеност имаат вакцините произведени од фаза I *Coxiella*. Главниот проблем, при вакцинирањето на преживарите против Q-треската е сличен како и кај вакцинирањето против бруцелозата: абортусите и ендометритите видно се намалуваат, а останува излучувањето на коксиелите преку млекото и плацентата. Во Европа се користат двовалентни вакцини (*Coxiella burnetii* + *Chlamydia psittaci*) и назначено е дека ги штитат овците и козите од проблеми со фертилитетот кои ги предизвикуваат овие два агенса. Најдобри резултати со вакцинацијата се добиваат ако се вакцинираат серолошки негативните единки. Вакцините се аплицираат пред или на почетокот на самиот гравидитет, а ревакцинација треба да се спроведува секоја година. Подобри резултати се постигнуваат ако првата вакцинација се спроведува кај животните пред полната зрелост. Во нашата земја досега немаше податоци за раширеноста на болеста кај животните, па и не се преземаа

никакви мерки за сузбивање на истата. Затоа, добро би било да се одлучиме на таков чекор и да се преземат комбинација на општи и специфични мерки за сузбивање на болеста. Најдобар начин за вакцинација е да се вакцинираат претходно испитаните животни, кои дале серонегативен резултат.

ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на добиените резултати можат да се донесат следниве заклучоци:

1. Q-треската е присутна кај овците и козите на територијата на Република Македонија.
2. Преваленцијата кај овците и козите изнесува 14.06% од испитаните 2.098 проби, односно позитивно реагираат 295.
3. Преваленцијата на Q-треската, по епизоотиолошки подрачја во Република Македонија од 0.0% до 32.26% кај овците и козите и има ензоотски и ендемски карактер.
4. Најдобра метода за дијагностика на Q-треската се покажа i_ELISA-серум, која има највисока сензитивност 91.80% во однос на РВК-а, како и специфичност 97.18%.
5. Се покажа дека i_ELISA-серум треба да биде метода на избор за рутинска дијагностика и масовни (скрининг) испитувања и при контролата на Q-треската.
6. Постои можност за користење на i_ELISA-серум/млеко за дијагностика како на поединечни мостри (конфирматорен тест), така и за дијагностика преку збирни серум (до 10 проби) и млеко (до 100 проби) мостри (скрининг тест).

USE OF CLASSICAL AND IMMUNOENZYMATIC SEROLOGICAL METHODS FOR DIAGNOSTIC AND CONTROL OF Q-FEVER IN SHEEP AND GOATS IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA

Dine Mitrov¹, Ivanco Naletoski¹, Sinisa Acevski¹, Igor Dzadzovski¹,
Krste Stojanovski¹, Iskra Cvetkovic²

¹ *Department of farm animals, Faculty of Veterinary Medicine Skopje*

² *Department of microbiology and immunology, Faculty of Veterinary Medicine Skopje*
e-mail: mitrov@fvm.ukim.edu.mk

SUMMARY

Aim of this paper was introduction of contemporary diagnostic methods and simultaneously Q-fever diagnosing of sheep and goats in Republic of Macedonia. For that purpose were examined with CFT and i_ELISA 2.098 sheep and goat samples. At the same time determination of disease prevalence in epizootiological sites from examined animal species as well as establishment of control measures for Q-fever in Republic of Macedonia were aimed. Furthermore, sensitivity and specificity of every method were determined trying to establish routine diagnostic method for Q-fever in Republic of Macedonia.

As result of this investigation, Q-fever presence in all examined animals was confirmed. Considering the results which pinpoints wide spread of Q-fever through the territory of Republic of Macedonia it has enzootic and endemic character.

Prevalence in sheep and goat was 14.06%, from 2.098 examined samples antibodies against Q-fever were detected in 295.

Prevalence at epizootiological sites was from 0.0 to 39.16% at cattle, and 0.0 to 32.26% at sheep and goats. Based on this data, epizootiological map of Q-fever spread at cattle and sheep and goats was established.

Indirect immunoenzymatic method (i_ELISA) showed highest sensitivity (compared to CFT 92.1%) and specificity (compared to CFT 95.8%) for diagnostics of Q-fever in our conditions.

Results demonstrate i_ELISA-serum as a method for routine and screening diagnosing purposes in the control of Q-fever.

Prospects of using i_ELISA-serum/milk for individual sample testing (confirmatory) and bulk serum (up to 10 samples) testing and milk (up to 100) samples (screening) are present.

Because of widespread of the disease in our country, it is recommended to use eradication measures for control purposes, simultaneous use of common (ticks extermination, hygiene improvement) and specific measures (vaccination).

Keywords: Q-fever, CFT, ELISA, sheep, goat, serum, milk

ЛИТЕРАТУРА

1. Byrne W.R.: Medical aspects of Chemical and Biological Warfare, Chapter 26-Q-fever.
2. Berri M., Souriau A., Crosby D., Crochet D., Lechopier P., Rodolakis A.: Relationships between shedding of Coxiella burnetii, clinical signs and serological responses of 34 sheep. Vet. Rec., 148 (16):502-5, 2001.
3. Behymer D.E., Ruppanner R., Brooks D., Williams J.C., Franti C.E.: Enzyme immunoassay for surveillance of Q fever. Am. J. Vet. Res. 46 (11):2417-17, 1985.
4. Cettinkaya B., Kalender H., Ertas H.B., Muz A., Arslan N., Ongor H., Gurzay M.: Seroprevalence of Coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. Vet.Rec., 146:5, 131-6, 2000.
5. Capuano F., Landolfi M.C., Monetti D.M.: Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an immunofluorescence assay. Vet. Rec., 149 (22):669-71, 2001.
6. Fries L.F., Waag D.M., Williams J.C.: Safety and immunogenicity in human volunteers of a chloroform-methanol residue vaccine for Q fever. Infect. Immun., 61 (4):1251-8, 1993.
7. Giltay N., Formica N., Beers M., Egan A., Conaty S., Marimon B.: Abattoir-associated Q fever: a Q fever outbreak during a Q fever vaccination program. Aus. N. Z. J. Public Health, 25 (4):362-7, 2001.
8. Kovacova E., Kazar J., Spanelova D.: Suitability of various Coxiella burnetii antigen preparations for detection of serum antibodies by various tests. Acta. Virol., 42:6, 365-8, 1998.
9. Laušević D., Vidić Branka, Đuričić Bosiljka, Šeguljev Zorica.: Q-groznica. Zbornik plenarnih referata, Simpozijum "I Jugoslovenski epizootiološki dani, Žabljak, 10-13 Oktobar, 1999.
10. Paiba G.A., Green L.E., Lloyd G., Morgan K.L.: Prevalence of antibodies to Coxiella burnetii (Q fever) in bulk tank milk in England and Wales. Veterinary Record, 144, 519-522, 1999.
11. Pauković Č., Kovačić H., Nevjestić A., Galić Marijana, Rašeta Branka: Dijagnostika i suzbijanje Q-groznica. Vet. Glasnik, 41 (2), 123-129, 1987.
12. Vidić Branka, Šeguljev B., Vuković B., Grgić Ž., Hristovski M.: Значењето на овците во епидемиологијата на Q-треската. Мак. Вет. Прег. (Mac. Vet. Rev.), 25, 1-2, стр. 103-112, 1996.
13. Vidić Branka, Boboš S.: Koksijeloza (Coxiella burnetii) kod muznih krava i njen značaj u nastanku infekcija kod ljudi. Vet. Glasnik, Vol. 51, br.9-10, str. 433-462, 1997.
14. O.I.E.: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Paris, 1996.