

Dinamika prokuživanja bakterijom *Coxiella burnetii* kod profesionalno eksponiranih osoba u endemskom području Istre

Sep-Ševerdija, Branka

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:932182>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-04**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Branka Sep-Ševerdija

**Dinamika prokuživanja bakterijom
Coxiella burnetii kod profesionalno
eksponiranih osoba u endemskom
području Istre**

DISERTACIJA



Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Branka Sep-Ševerdija

**Dinamika prokuživanja bakterijom
Coxiella burnetii kod profesionalno
eksponiranih osoba u endemskom
području Istre**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Zavodu za javno zdravstvo Istarske županije u Puli, Odjelu za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu te u Veterinarskom institutu, Udine (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie-Sezione di Udine, Italia).

Voditelji rada su prof. dr. sc. Goran Tešović, dr. med., spec. infektologije i pedijatrijske infektologije iz Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu i dr. sc. Silvijo Špičić, dr. med. vet., znanstveni savjetnik iz Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb.

Zahvala

Zahvaljujem svojim mentorima, profesoru Goranu Tešoviću i dr. sc. Silviju Špičiću, znanstvenom savjetniku na svim sugestijama pri izradi ovog rada.

Osobito se zahvaljujem svim dragim ljudima koji su mi pomogli u ovom vrlo zahtjevnom terenskom istraživanju, posebno kolegama doktorima veterinarske medicine Goranu Hrvatinu, Hrvoju Kavčiću, Saši Arsiću, Davoru Jurmanu, Radoslavu Putniku, Marku Zohilu, Siniši Mišoviću, Saši Kostiću, Neviji Mizdarić, Tomislavu Mijatoviću, Anji Šteković, Stanku Pelku, zatim cijelom osoblju Odjela za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu, dr. med. vet. Marcu Bregoli iz Udina, kolegama s posla Željku Stipiću, Suzi Erniša i Đurđici Mohorović, kao i svima onima koji su mi na bilo koji način pomogli pri izradi ovog rada, a nisam ih ovdje posebno spomenula.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Darku Ropcu na ideji za ovaj rad i doc. dr. sc. Milanu Miloševiću na savjetima i pomoći oko statističke analize prikupljenih podataka.

Hvala svim osobama koje su sudjelovale kao ispitanici u ovom istraživanju i time doprinijele novim spoznajama o Q-groznici u Istarskoj županiji.

Velika hvala ravnatelju Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije dr. med. Aleksandru Stojanoviću na podršci i pomoći u ostvarenju ovog istraživanja.

Neizmjereno veliku pomoću u završnici pisanja ovog rada i podršku pružila mi je moja najdraža profesorica dr. sc. Ira Gjenero Margan kojoj se od srca zahvaljujem.

Za najveću moralnu podršku ipak najviše dugujem svojoj obitelji te im se od srca zahvaljujem, osobito sinu Marinu te mojim dragim roditeljima Ivanu i Miroslavi kojima i posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1 Povijest Q-groznice	2
1.2. Etiologija Q-groznice	3
1.3. Patogeneza Q-groznice	7
1.3.1. Imunološki odgovor	7
1.3.2. Odnos bakterija-domaćin	8
1.4. Epidemiologija Q-groznice i javnozdravstveni značaj	10
1.4.1. Deskriptivna epidemiologija	11
1.4.1.1. Incidencija	11
1.4.1.2. Geografska rasprostranjenost	11
1.4.1.3. Sezonska raspodjela	12
1.4.1.4. Raspodjela po dobi i spolu	13
1.4.1.5. Zanimanje i socioekonomski status	13
1.4.2. Javnozdravstveni značaj Q-groznice	14
1.4.3. Epidemiološke karakteristike Q-groznice u Istarskoj županij i općenito u Hrvatskoj	15
1.4.4. Q-groznica u Europi	18
1.5. Q-groznica u životinja	19
1.5.1 Q-groznica u ovaca	20
1.5.2. Q-groznica u koza	21
1.6. Q-groznica u ljudi	21
1.6.1. Akutna Q-groznica	22
1.6.1.1. Komplikacije u tijeku Q-groznice	23
1.6.2. Kronična Q-groznica	24

1.6.3. Q-groznica u trudnoći	25
1.7. Dijagnostika Q-groznice	25
1.7.1. Serološka dijagnostika	26
1.7.2. Diferencijalna dijagnoza Q-groznice	27
1.8. Liječenje i prevencija Q-groznice	27
1.8.1 Prevencija Q-groznice	28
1.8.1.1. Smjernice za profesionalno izložene osobe	29
1.8.1.2. Cijepljenje	30
1.9. Svrha istraživanja	31
2. HIPOTEZA	32
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	33
4. ISPITANICI I METODE	34
4.1. Ispitanici i dizajn istraživanja	34
4.1.1. Etička suglasnost	38
4.1.2. Epidemiološka anketa za ispitanike	38
4.1.3. Serološko testiranje ispitanika	38
4.1.3.1. Primijenjena serološka metoda	39
4.1.3.2. Tumačenje seroloških rezultata	39
4.2. Životinje (ovce, koze)	40
4.2.1. Etička načela za životinje	40
4.2.2. Epidemiološka anketa za vlasnike životinja	40
4.2.3. Serološko testiranje životinja	40
4.2.3.1. Primijenjena serološka metoda	41
4.2.3.2. Tumačenje seroloških rezultata	41
4.3. Statistička analiza podataka	42
5. REZULTATI	43

5.1. Ispitanici	43
5.1.1. Analiza demografskih podataka ispitanika	43
5.1.2. Analiza razina IgG u ispitanika	47
5.2. Životinje (ovce i koze)	67
5.2.1. Analiza anketa vlasnika životinja (ovce, koze)	67
5.2.2. Analiza serološkog testiranja u životinja	72
6. RASPRAVA	75
7. ZAKLJUČAK	93
8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU	94
9. SUMMARY	95
10. LITERATURA	97
11. BIOGRAFIJA	107
PRILOG 1.	
PRILOG 2.	
PRILOG 3.	
PRILOG 4.	
PRILOG 5.	
POPIS TABLICA	

POPIS OZNAKA I KRATICA

<i>C. burnetii</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
CD4⁺/CD8⁺	omjer CD4 i CD8 limfocita
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	imunoenzimski test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EU/EEA	Europska unija/Europski gospodarski prostor (engl. <i>European Union/European Economic Area</i>)
HPA	Hrvatska poljoprivredna agencija
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
IFA	indirektna imunofluorescencija (engl. <i>indirect immunofluorescence assay</i>)
IL-10	interleukin 10
KBC	Klinički bolnički centar
LCV	velika stanica (engl. <i>large-cell variant</i>)
LPS	lipopolisaharid (engl. <i>lipopolysaccharide</i>)
MLVA	analiza broja tandemskih ponavljanja na više lokusa (engl. <i>multiple locus variable number tandem repeats analysis</i>)
MST	analiza više genskih slijedova (engl. <i>multispacer sequence typing</i>)
NN	Narodne novine
ODs	optička gustoća uzorka (engl. <i>sample optical density</i>)
ODnc	optička gustoća negativne kontrole (engl. <i>negative control optical density</i>)
ODpc	optička gustoća pozitivne kontrole (engl. <i>positive control optical density</i>)
PBS	puferirana fosfatna otopina (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PBMC	mononuklearne stanice periferne krvi (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
RFLP	polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RH	Republika Hrvatska
rRNA	ribosomska ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
RR	relativni rizik

RVK	reakcija vezanja komplementa
S/P	omjer pozitivnih uzoraka (engl. <i>sample to positive ratio</i>)
SCV	mala stanica (engl. <i>small-cell variant</i>)
SLP	spora (engl. <i>spore-like particle</i>)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TNF	čimbenik nekroze tumora (engl. <i>tumor necrosis factor</i>)
ZZJZIŽ	Zavod za javno zdravstvo Istarske županije

1. UVOD I SVRHA RADA

Istraživanje Q-groznice započelo je prije više od 80 godina i od tada do danas otkrivene su mnoge značajne karakteristike ove „upitne“ groznice (*engl. query fever*) koja se smatra jednom od najčešćih zoonoza, mozaično rasprostranjena po čitavom svijetu. Bolest je osobito česta u ruralnim područjima s razvijenim stočarstvom, iako se sve češće opisuju i urbani slučajevi Q-groznice. Q-groznica jedino nije zabilježena na Novom Zelandu (1), unatoč brojnim ovčarskim farmama po čitavoj otočnoj državi, a nema je ni na Antarktiku niti Arktiku. Iako se vrlo rijetko očituje u životinja, u ljudi može izazvati širok raspon bolesti od nespecifičnog febrilnog stanja do meningitisa i endokarditisa.

Već od prvog opisa ove zoonoze iz godine 1937., bila je prepoznata, a tijekom vremena se i potvrdila povezanost Q-groznice s određenim profesijama kao što su veterinari, veterinarski tehničari, uzgajivači stoke, poljoprivrednici, prerađivači vune, šumski radnici, lovci, mesari, radnici u klaonicama te laboratorijsko osoblje.

Iako je Q-groznica prvenstveno profesionalna bolest, od nje može oboljeti svatko, tako da njezina pojava privlači veliku pozornost posljednjih desetljeća, posebice nakon izbijanja velike epidemije u Nizozemskoj koja je trajala od 2007. do 2010. godine s više od 4000 potvrđeno oboljelih osoba, s tim da su stvarne proporcije epidemije procijenjene i na više od 40 000 oboljelih. Time je do tada relativno nepoznata bolest s tek nekoliko oboljelih godišnje postala velik javnozdravstveni problem u Nizozemskoj, a njezine posljedice traju do današnjeg dana.

Q-groznica tipičan je primjer kako zoonoza može prijeći granice endemskog područja i uzrokovati epidemiju nesagledivih razmjera kada se pojave za to povoljni uvjeti kao što su povećan broj koza uslijed intenzivnijeg razvoja stočarstva, prisutnost farmi u blizini naseljenih mjesta, niska razina prokuženosti stanovništva te nedostatak ciljanog zdravstvenog nadzora.

Uzročnik Q-groznice, bakterija *Coxiella burnetii*, kao jedan od najzaraznijih i jedinstvenih unutarstaničnih patogena, nastavlja i dalje intrigirati istraživače diljem svijeta.

1.1 Povijest Q-groznice

Q-groznica otkrivena je 1935. godine u skupini radnika zaposlenih u klaonici u Brisbaneu (država Queensland) u Australiji. Oboljeli su imali povišenu tjelesnu temperaturu koja je trajala oko 14 dana, glavobolju, bolove u mišićima, a pretrage nisu rezultirale pronalaskom odgovarajućeg uzročnika. Ime ovoj enigmatičnoj bolesti dodijelio je dr Edward Holbrook Derrick koji ju je prvi opisao 1937. godine kao zaseban entitet i nazvao je “Q (query) fever” (2).

Derrick je smatrao da je uzročnik bolesti virus, međutim daljnja istraživanja koja su proveli australijski istraživači dr Macfarlane Burnet i Mavis Freeman, pokazala su da mikroorganizam što su ga izolirali iz krvi i urina Derrickovih bolesnika pripada porodici rikecija, te su ga nazvali *Rickettsia burnetii*.

U isto je vrijeme u Americi, Gordon Davis proučavajući pjegavu groznicu Stjenjaka (Rocky Mountain spotted fever), primjetio da krpelji iz područja Nine Mile u Montani prenose uzročnika koji izaziva febrilnu bolest u zamoraca, bitno različitu od bolesti koju je inicijalno proučavao, te ga je nazvao Nine Mile. Nakon njega je dr Herald Rea Cox sa suradnicima iz krpelja *Dermacentor andersoni* izolirao mikroorganizam i kultivirao ga u žumanjčanoj vreći oplodjenih kokošnjih jaja, te ga nazvao *Rickettsia diasporica*, jer je pokazivao karakteristike rikecija (2). Kasnije je dr Rolla Dyer potvrdio da se zapravo u oba slučaja radilo o istom uzročniku. Nagovješćujući mogućnost prijenosa uzročnika Q-groznice kod laboratorijskih djelatnika, dr Dyer je i sam obolio od Q-groznice tijekom posjeta laboratoriju (Rocky Mountain Laboratory) u Hamiltonu, Montana (3).

Cornelius Philip je 1948. godine predložio novi rod kojeg je nazvao *Coxiella*, te preimenovanje novog etiološkog uzročnika u *Coxiella burnetii* u čast istraživačima Coxu i Burnetu, a izdvojeni soj *C. burnetii* s područja potoka Nine Mile postao je referentni soj (2).

Derrick je Q-groznicu opisao kao opću febrilnu bolest bez lokalnog nalaza na bilo kojem organu, dok su Hornibrook i Nelson 1940. godine u jednoj epidemiji u Washingtonu, uz opće simptome, ustanovili i upalu pluća, što su kasnije potvrdili i drugi autori (4).

U Europi je Q-groznica prvi put prepoznata u Drugom svjetskom ratu kada su zabilježene veće epidemije u vojnim kolektivima. Pod nazivom „Balkan grippe“ (balkanska gripa) od 1941. do 1943. godine registrirane su epidemije Q-groznice među njemačkim vojnicima u Rumunjskoj, Bugarskoj, Jugoslaviji, Grčkoj i na Krimu (5). Opisane su i epidemije Q-groznice među savezničkim vojnicima u Italiji, Grčkoj i Korzici tijekom zime 1944. i proljeća 1945. godine (6).

Jedna od većih epidemija s 368 oboljelih osoba, izbila je svibnju 1945. godine među pripadnicima američkih zrakoplovnih jedinica koji su se iz južne Italije vraćali u Sjedinjene Američke Države (5). Do 1955. godine Q-groznica je dokazana u 51 zemlji na pet kontinenata (3). Nekoliko je autora isticalo velik vojni značaj Q-groznice osobito stoga što je vojska često stacionirana u područjima gdje su često prisutne ovce i koze. Poznato je da je dovoljna samo jedna bakterija da uzrokuje bolest u čovjeka, a u jednom gramu inficirane posteljice može biti i više od milijardu koksijela (6).

Prvi opis Q-groznice u Hrvatskoj zabilježen je 1948. godine kada je dokazana infekcija koksijelom kod jednog bolesnika (4). Maretić i njegovi suradnici otkrili su prvi slučaj ove bolesti u Istri, u blizini Pule te ga opisali 1955. godine (7).

1.2. Etiologija Q-groznice

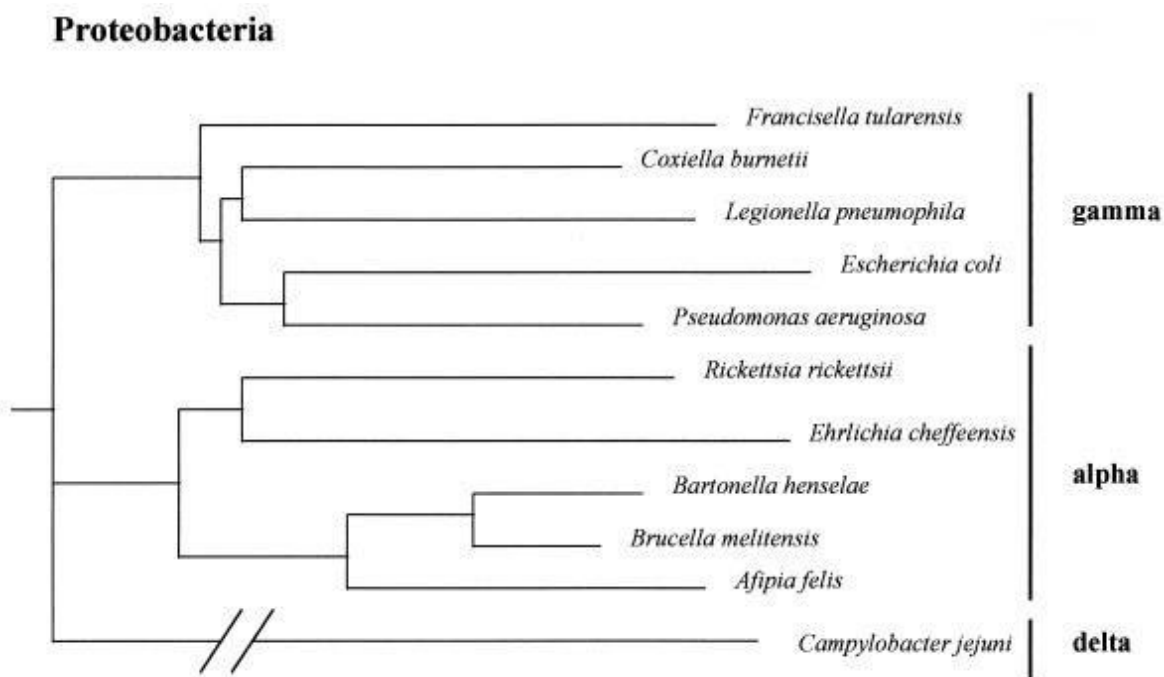
Uzročnik Q-groznice je *C. burnetii* (Slika 1.1), obligatna intracelularna bakterija, mali, izrazito pleomorfni kokobacil (0, 3-1 μ m), stanične stijenke koja sliči stijenci gram-negativnih bakterija (2). Genomskom analizom, osobito analizom slijeda nukleotida 16S rRNA, utvrđeno je da se *C. burnetii* razlikuje od drugih rikecija te je premještena u gama podskupinu *Proteobacteria* (8).



Slika 1.1 *Coxiella burnetii* (150 x 195)

Preuzeto s Interneta: https://www.ifr48.timone.univ-mrs/mst/coxiella_burnetii/

Filogenetski su joj srodne bakterije iz porodica *Legionellaceae*, *Francisellaceae*, *Pseudomonaceae* i druge *Gammaproteobacteriae* (9). Slika 1.2 prikazuje filogenetsko stablo koje prikazuje srodnost vrste *C. burnetii* s ostalim vrstama *Proteobakterija*.



Slika 1.2 Filogenetsko stablo prikazuje odnos *C. burnetii* s drugim bakterijama koje pripadaju porodici *Proteobacteria* (na temelju sekvence gena 16SrRNA metodom Neighbor-Joining)

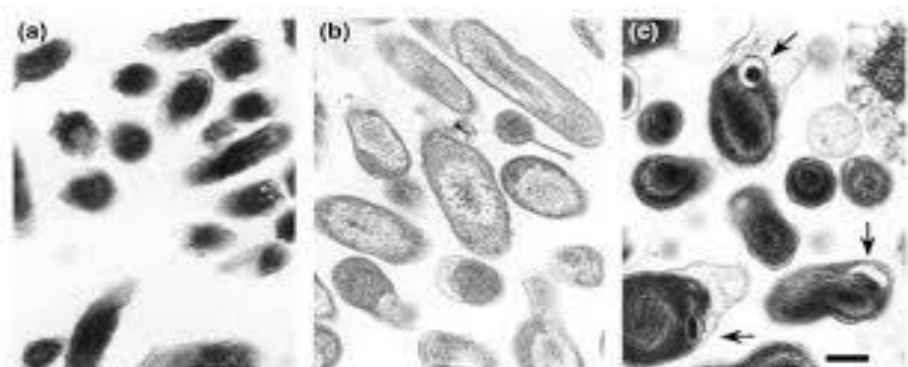
Preuzeto s Interneta: PubMed Central, sl.1. Clin Microbiol Rev 1999; 12:518-53. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88923>

Dugi se niz godina *C. burnetii* smatrala jedinom vrstom u rodu *Coxiella*, međutim novija istraživanja pokazala su da postoji još jedan član tog roda - *Coxiella cheraxi*, opisana 2000. godine kao patogen u slatkovodnom raku (*Cherax quadricarinatus*), koja pokazuje u 95,6% slučajeva sličnost s genomom *C. burnetii* u sekvenci 16S rRNA (10).

C. burnetii pokazuje izražen polimorfizam te se susreće u različitim oblicima (kokoidni, bipolarno-štapčasti te oblik lanca) koji predstavljaju njezine različite razvojne stadije. *C. burnetii* ima jedinstven unutarstanični životni ciklus s dva različita stanična oblika koji se razlikuju po veličini, sadržaju peptidoglikana i osmotskom tlaku.

Za te su oblike Mc Caul i Williams predložili nazive: mala stanica (engl. *small cell variant* - SCV) koja ima štapčasti oblik, deblji stanični zid i gušći kondenzirani kromatin,

za razliku od velike (engl. *large cell variant* - LCV) koja je okruglog oblika s tanjim staničnim zidom i raspršenim kromatinom (11). SCV koja je metabolički inaktivna i otporna na osmotski tlak, veže se uz stanicu domaćina, obično na makrofage, ulazi u stanicu fagocitozom i počinje se razvijati u fagolizosomu, u kojem kiseli pH aktivira njezine metaboličke enzime. (Slika 1.3). Kiselost je neophodna za njezin metabolizam, uključujući asimilaciju hranjivih tvari i sintezu nukleinskih kiselina i aminokiselina (12).



Slika 1.3 Razvojni ciklus *C. burnetii*

(a) stanice SCV (mala stanica, engl. *small cell variant*); (b) stanice LCV (metabolički aktivna velika stanica, engl. *large cell variant*); (c) stanice LCV s pričvršćenim stanicama SLP (polarno tjelešce, engl. *spore-like particle*), označene su strelicama. Slike dobivene elektronskim mikroskopom. Mjerilo 0,2 μm . (Preuzeto iz Heinzen i sur., 1999.)

Nakon sazrijevanja u LCV, koja je metabolički aktivna stanica, započinje sporogena diferencijacija u oblik sličan spori koji se oslobađa iz stanice domaćina staničnom lizom ili egzocitozom. McCaul i Williams su unutar LCV-a zapazili malo polarno tjelešce koje su nazvali SLP (engl. *spore-like particle*) i koje ima svojstva endospore (8).

Spora predstavlja otporni oblik ovog mikroorganizma koji može preživjeti izvan žive stanice u vrlo nepovoljnim uvjetima vanjske sredine (13). Vrlo je otporna na nizak ili visok pH, na isušivanje, na različite kemijske agense (npr. Na-hipoklorit), dezinficijense te ultraljubičasto zračenje (10).

Može preživjeti u okolini preko 10 mjeseci na temperaturama između 15°C i 20°C, više od mjesec dana u smrznutom mesu (13) te oko godinu dana u sasušenom fecesu krpelja ili vuni (5). Ostaje vijabilna nakon zagrijavanja na temperaturi od 63°C tijekom 30 minuta te nakon dvije godine čuvanja na temperaturi od -20°C (11). Koksije mogu preživjeti i u

amebama, što ukazuje na mogući alternativni mehanizam koji objašnjava njezino preživljavanje i otpornost u vanjskoj sredini (13).

Osim izuzetne otpornosti, poznato je da se koksijeke vjetrom mogu prenijeti na velike udaljenosti i tako uzrokovati bolest. Upravo su to neke od karakteristika koje ju svrstavaju u B kategoriju bioloških agensa (14).

Slijedeća je značajna karakteristika *C. burnetii* antigena fazna promjena uzrokovana mutacijama u njezinom lipopolisaharidu (LPS), ovisno o uvjetima okoline i domaćinu u kojem se umnožava (9, 11, 14). Kada se koksijela izolira iz zaraženih životinja ili ljudi, nalazi se u virulentnoj antigenoj fazi I i vrlo je infektivna (14). Nakon višestrukih laboratorijskih pasaža u staničnoj kulturi ili u oplođenim kokošjim jajima prelazi u avirulentni oblik, fazu II koja je delecijaska mutacija faze I (11, 14). Infektivni oblik bakterije ima glatki tip LPS s ugljikohidrantnim kompleksom koji sprječava interakciju protutijela s površinskim proteinima, međutim nakon kultivacije bakterije, dolazi do delecijaska mutacije LPS lanca koji postaje kraći i stvaranja faze II antigena. Ta antigenska promjena otkriva površinske proteine protutijelima. Odgovor protutijela na fazne antigene u tijeku bolesti je koristan biljeg za akutnu i kroničnu bolest (13).

Pojavu fazne varijacije antigena *C. burnetii* objasnili su Stoker i Fiset 1956. godine (15). Dokazali su da svježe izolirani sojevi ne pokazuju nikakvu reaktivnost s ranim rekonvalescentnim serumom prirodno ili eksperimentalno zaraženih životinja, ali da nakon niza pasaža preko oplođenih kokošjih jaja, podjednako dobro reagiraju s ranim i kasnim rekonvalescentnim serumom. Ti svježi izolirani sojevi nazvani su sojevima u fazi I, a sojevi adaptirani na oplođenom kokošjem jajetu, koji pokazuju karakteristike antigena za dokazivanje ranih protutijela, sojevima u fazi II (15).

Sojevi *C. burnetii* grupirani su u šest genomskih grupa (I-VI) na osnovu metode polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP). Poznato je da virulencija koksijeke i klinička manifestacija bolesti ovisi o genetskim karakteristikama i soju koksijeke, njezinim specifičnim plazmidima te varijacijama LPS-a (16).

1.3. Patogeneza Q-groznice

Respiratorni sustav osnovni je put kojim koksijela ulazi u domaćina. Nakon udisanja infektivnog aerosola, koksijela dolazi u pluća gdje se umnožava u alveolarnim makrofagima, te putem krvotoka zahvaća cijeli organizam.

Opći simptomi i različite kliničke manifestacije *C. burnetii* infekcije ovise upravo o njezinoj infektivnoj dozi, ali i o karakteristikama samog soja koksije. Poznato je da je soj bakterije koji sadrži plazmid QpH1 virulentniji te izaziva težu kliničku sliku u ljudi i u eksperimentalnih životinja, u odnosu na soj koji sadrži plazmid QpRS (2). Kod infekcije pluća dolazi do mononuklearne infiltracije u intersticiju što uzrokuje područja žarišne nekroze i krvarenja. Infekcija se može širiti krvotokom i na jetru, u kojoj stvara granulome (17). U ovisnosti o infektivnoj dozi, karakteristikama soja koksije te ulaznih vrata infekcije, dolazi do različitih kliničkih manifestacija bolesti (18).

Roman i suradnici objasnili su model perzistentne stanične infekcije, kod kojega se *C. burnetii* unutar zaražene stanice domaćina sporo umnožava (oko 20 sati) i pri tom je ne oštećuje. Inficirana stanica koja sadrži veliku vakuolu s koksijelama započinje asimetričnu diobu tako što jedna stanica kći preuzima tu vakuolu, a druga ostaje neinficirana. Otkriće da su neinficirane stanice prisutne na inficiranoj staničnoj kulturi poslije nekoliko mjeseci od infekcije, podržava ovaj model o asimetričnoj podjeli inficiranih stanica (19).

1.3.1. Imunološki odgovor

Imunološka kontrola Q-groznice posredovana T stanicama ne dovodi do eradikacije *C. burnetii* iz inficiranog domaćina. S druge strane pak, imunosupresija može inducirati relaps infekcije u izliječenih bolesnika ili laboratorijskih životinja (18, 20). Stoga imunokompromitirane osobe imaju češće relapse bolesti (2).

Studija o T-limfocitima u bolesnika s endokarditisom uzrokovanim s *C. burnetii* pokazala je da se broj CD4⁺ limfocita znatno smanjio, rezultirajući smanjenim omjerom CD4⁺/CD8⁺ koji je povezan s mogućim relapsom bolesti (21).

Kada bolesnik ima leziju srčanih zalistaka, turbulencija krvne struje može povećati broj apoptotičnih limfocita koji posljedično dovode do povećanja interleukina IL-10 (22). Monociti i u manjoj mjeri limfociti, produciraju IL-10 koji ima važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora. Zanimljivo je da monociti kod bolesnika s recidivom bolesti, pokazuju pojačanu produkciju IL-10 koja se povezuje s njihovim mikrobicidnim defektom.

Harris i suradnici su ustanovili PCR metodom da se DNK *C. burnetii* nalazi u cirkulirajućim monocitima i koštanoj srži ljudi, koji su se mjesecima ili godinama ranije zarazili koksijelom (23).

Proučavan je imunološki odgovor, uključujući funkciju monocita i njihovu produkciju citokina, kod bolesnika s akutnom i kroničnom Q-groznicom. Značajno je otkriće bilo da *C. burnetii* preživljava u monocitima kod bolesnika s kroničnom infekcijom, ali ne i kod onih s akutnim oblikom bolesti (21). Monociti, odnosno mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC) u pacijenata s kroničnim oblikom bolesti spontano proizvode povećanu količinu IL-10 koji utječe na rast *C. burnetii* u monocitima ljudi (19).

Antigena faza I bakterije *C. burnetii*, virulentni je oblik in vitro, djelomično otporan na fagocitozu, dok je antigena faza II dominantnija in vitro što se povezuje s njezinim bržim umnožavanjem u stanicama koje se koriste za kultivaciju (19). Za razliku od faze I *C. burnetii*, avirulentni oblik in vivo ne može opstati u mijeloidnim stanicama i unutar monocita dolazi do njegovog uništenja. Veza između virulentnog oblika bakterije i monocita je posredovana samo s αv i $\beta 3$ integrinima, dok je za interakciju avirulentnog oblika u monocitima neophodan i integrin CR3. Osim toga virulentna faza I *C. burnetii* izaziva u monocitima produkciju TNF preko mehanizma koji uključuje oba integrina αv i $\beta 3$ te međudjelovanje s bakterijskim LPS (24).

1.3.2. Odnos bakterija-domaćin

C. burnetii je kao unutarstanični patogen morala razviti puno mehanizama kako bi mogla invadirati i preživjeti unutar stanice domaćina.

Bakterija pokazuje tropizam za fagocite i koristi klasični fagocitni mehanizam. Kada *C. burnetii* (faza I) uđe u stanicu domaćina, bilo inhalacijom, ingestijom ili nekim drugim putem, započinje infekciju vezujući se za određene integrine te dolazi do aktivacije nekoliko staničnih supstrata koji uzrokuju promjene na njezinoj površini (14).

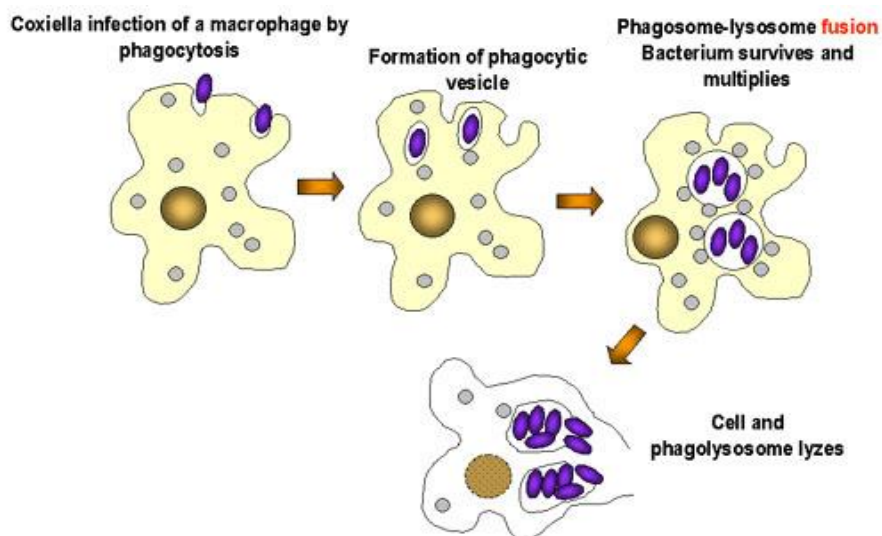
Za unutarstanične patogene, kao što je bakterija *C. burnetii*, važna je njezina visoko usavršena strategija preživljavanja unutar stanice koja se izražava kroz upravljanje proteinima stanice domaćina za održavanje infekcije, ali i za nastanak kronične infekcije. Za razliku od drugih unutarstaničnih bakterija koje koriste mehanizme za izbjegavanje endocitnih puteva, *C. burnetii* ima jedinstveni intracelularni životni ciklus.

Nakon ulaska u stanicu domaćina, koksijela uspostavlja parazitoformu vakuolu koja se na kraju spaja s odjeljcima lizosomske mreže i šireći se, stvara veliku vakuolu koja

zauzima većinu citoplazme zaražene stanice (25). Koksijela se replicira unutar zakiseljenog fagosoma (pH 4-5), s vremenom replikacije između 12 do 24 sati. Takav spori rast bakterije omogućuje dobivanje velikog broja metaboličkih prekursora od stanice domaćina, povećavajući vakuolu dok se ne stvori pritisak koji omogućuje lizu stanice domaćina (13) (Slika 1.4.).

Bakterija *C. burnetii* ima sekrecijski sistem tip IV (T4SS) koji je vrlo sličan transportnom sistemu Dot/Icm, svojstven bakteriji *Legionella pneumophila*, koja uzrokuje legionarsku bolest, a za koji se smatra da je osnova njezine infektivnosti, jer omogućuje rast patogena.

Pomoću tog sekrecijskog sistema, efektorski proteini (ankirin proteini) ulaze u stanicu domaćina, ometajući fuziju vakuola koje sadrže endosome te na taj način povećavaju preživljavanje koksijela u inficiranoj stanici (25, 26). Dobro je poznato da upravo ti efektorski proteini unutarstaničnih bakterija imaju važnu ulogu u infekciji i razvoju bolesti Q-groznice (25).



Slika 1. *C. burnetii* inficira makrofage (preuzeto s Interneta on-line Mayer G. *Bacteriology-Chapter 21: Rickettsia, Ehrlichia, Coxiella, and Bartonella*. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Coxiella>)

Ne zna se točno da li *C. burnetii* potiče ili sprječava apoptozu inficiranih stanica. Neki autori ističu njezinu sposobnost manipuliranja apoptotskog puta inficirane stanice kako bi spriječila smrt stanice domaćina i tako si omogućila pogodne uvjete za rast i umnažanje, dok drugi tvrde suprotno. Po njima *C. burnetii* utječe na apoptozu inficirane stanice već u ranom stadiju infekcije kako bi se širila po organizmu domaćina i uspostavila perzistentnu infekciju (13).

1.4. Epidemiologija Q-groznice i javnozdravstveni značaj

Najvažnija epidemiološka karakteristika *C. burnetii* je njezina velika otpornost u vanjskoj sredini, sposobnost adaptacije na različite domaćine kao i sposobnost da na različite načine napusti inficiranog domaćina. Stoga je Q-groznica bolest vrlo raznolika klinički i epidemiološki u pojedinim dijelovima svijeta, ovisno o geografskim i ekološkim čimbenicima.

C. burnetii se u prirodi održava u krpeljima i drugim člankonošcima. U svijetu ima oko 40 vrsta krpelja zaraženih koksijelama, ali se samo kod rijetkih vrsta krpelja uspio dokazati transovarijalni prijenos *C. burnetii* na sljedeće generacije. Krpelji mogu prenijeti infekciju na domaće i divlje životinje koje, u većini slučajeva, ne pokazuju znakove bolesti. Međutim, zaražene životinje će u vrijeme okota ili pobačaja, odbačenom posteljicom u kojoj se nalazi ogroman broj koksijela, kontaminirati okolinu. Poznato je da se nakon okota koksije nalaze u zraku preko dva tjedna, dok su u zemlji prisutne i dulje od 150 dana (2).

Ovce, koze i goveda se smatraju najvažnijim rezervoarima infekcije za ljude. Postoje i mnoge druge domaće i divlje životinje u kojima se mogu nalaziti koksije, a pronađene su i u pticama, ribama i artropodima (11,14). Istraživanja provedena 1950-ih i 1960-ih godina u Utahu (SAD) pokazala su da 19 vrsta sisavaca, nekoliko vrsta krpelja, buha, grinja i jedna vrsta uši sudjeluju u lancu prijenosa *C. burnetii* (15).

Ulaskom domaćih životinja u autohtona prirodna žarišta došlo je do adaptacije koksijela na domaće životinje na način da se mogu održavati u prirodi bez vektora (15). Inficirane životinje izlučuju koksije mokraćom, stolicom, mlijekom, ali najviše preko posteljice nakon okota ili pobačaja.

Najčešći put prijenosa infekcije sa životinje na ljude je udisanje infektivnog aerosola izravno tijekom okota ili pobačaja ili nakon toga, kada infektivne čestice koje se nalaze u okolini, bivaju raznošene vjetrom na velike udaljenosti te mogu uzrokovati bolest i kod osoba koje nisu imale kontakt sa životinjama (11). Moguć je prijenos infekcije izravnim kontaktom sa zaraženom životinjom preko ozljeda na koži ili sluznicama, te neizravno preko kontaminirane slame, vune, krzna ili radne odjeće, dok je alimentarni put prijenosa koksijela konzumacijom nepasteriziranog mlijeka i mliječnih proizvoda priređenih od takvog mlijeka rjeđi, premda su i u tom pogledu mišljenja podijeljena (11).

Prijenos koksije na ljude ugrizom krpelja je iznimno rijedak (14). Također se izuzetno rijetko Q-groznica može dobiti transfuzijom krvi, njegom zaraženog bolesnika,

tijekom razudbe ili za vrijeme poroda trudnice inficirane koksijelom. Opisan je i interhumani prijenos transplacentalnim putem, transplantacijom koštane srži te intradermalnom inokulacijom, no ti su slučajevi izuzetno sporadični (11). Opisan je i mogući prijenos spolnim putem (2).

Osobe koje često dolaze u kontakt s domaćim životinjama, ljudi koji žive u blizini farmi, radnici u klaonicama te laboratorijsko osoblje koje radi sa živim koksijelama u mnogo su većem riziku da obole od Q-groznice u odnosu na druge ljude.

Međutim, sve više autora objavljuje slučajeve Q-groznice u urbanim područjima. Salmon i suradnici opisali su pojavu bolesti kod Britanaca koji su živjeli u blizini ceste kojom su prolazila poljoprivredna vozila. Najvjerojatnije je izvor zaraze bio u prašini s tih vozila ili preko kontaminiranog sijena i gnojiva koje su prevozili (27).

Zbog nespecifičnih simptoma Q-groznice, bolest često ostaje neprepoznata (17).

1.4.1. Deskriptivna epidemiologija

1.4.1.1. Incidencija

Incidencija Q-groznice vjerojatno je viša nego što ju prikazuju službeni statistički podaci zbog velikog broja infekcija s blažom kliničkom slikom koje često ostaju neprepoznate te zbog nedostupnosti laboratorija za serološku dijagnostiku.

Broj prijavljenih slučajeva oboljelih od Q-groznice u Hrvatskoj oscilira iz godine u godinu. Ropac i Puntarić navode da se godišnje u Hrvatskoj prijavi više od 100 oboljelih, što čini pobol od 2,5 na 100 000 stanovnika (28). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u Hrvatskoj su više incidencije bolesti opažene u epidemijskim godinama 1983. i 1984. (6,4/100 000 i 4,2/100 000), zatim 1991. (3,6/100 000) te 2003. godine (4,5/100 000). U posljednjih dvanaest godina (2008.-2019.) incidencija Q-groznice u Hrvatskoj je u rasponu od 0,2/100 000 do 1,0/100 000 stanovnika.

1.4.1.2. Geografska rasprostranjenost

Proširenost koksije u svijetu uvjetuju geoklimatski čimbenici. Prirodno žarište Q-groznice ima svoje karakteristike i zakonitosti.

U Francuskoj se Q-groznica dijagnosticira najviše u južnom dijelu, blizu Marseillea, iako se sporadični slučajevi pojavljuju i u drugim krajevima zemlje. U Ujedinjenom

Kraljevstvu najviše je slučajeva zabilježeno u sjevernoj Irskoj i jugozapadnoj Engleskoj, u Švicarskoj je incidencija najveća na njezinom južnom alpskom dijelu, dok je u Španjolskoj zahvaćen njezin sjeverni dio, osobito provincije Basque i Navarra u kojima je intenzivniji razvoj govedarstva.

U sjeveroistočnom dijelu Italije slučajevi oboljenja od Q-groznice povezani su s migracijom stada ovaca na alpske pašnjake, a u sjevernom dijelu Grčke i na Kreti s kontaktom sa životinjama ili konzumacijom nepasteriziranog mlijeka ili svježeg sira. U istočnoj Kanadi, Kaliforniji, Izraelu i Japanu Q-groznica je endemska bolest. Od otkrića bolesti u Australiji do danas, Q-groznica se najviše dijagnosticira u njezinom istočnom dijelu (osobito u graničnom području Queenslanda i New South Walesa) i značajno je povezana s domaćom stokom i mesnom industrijom (11).

Q-groznica se manifestira na različite načine u pojedinim dijelovima svijeta, a težina bolesti ovisi o uvjetima okoliša (klimatskim i drugim ekološkim značajkama određene sredine), infektivnoj dozi, načinu stjecanja infekcije te antigenim karakteristikama *C. burnetii*. U Grčkoj, Švicarskoj, Kanadi te na sjeveru Španjolske, Q-groznica se očituje i dijagnosticira kao atipična pneumonija, u Australiji kao febrilno stanje, u Francuskoj i na jugu Španjolske (Andaluzija, Kanarski otoci) kao akutni hepatitis, a u Izraelu kao endokarditis (11).

Postoji hipoteza da na kliničku prezentaciju bolesti utječe način stjecanja infekcije. Tako npr. udisanjem infektivnog aerosola od zaraženih mačaka dolazi do razvoja upale pluća u području Nove Škotske (Kanada) (29), dok konzumacija svježeg mlijeka ima važnu ulogu u nekim dijelovima Europe, kao što su Francuska i jug Španjolske, gdje se Q-groznica manifestira većinom kao granulomatozni hepatitis (30).

U Hrvatskoj su poznata endemska žarišta Q-groznice koja uglavnom obuhvaćaju područja na kojima se uzgaja stoka (28). Opisane su mnoge manje ili veće epidemije Q-groznice u Dalmaciji, Hrvatskom primorju, Istri, Gorskom kotaru, Posavini te sjeverozapadnoj Hrvatskoj gdje se Q-groznica najčešće manifestira kao atipična upala pluća, a rjeđe kao nespecifično febrilno stanje (31).

1.4.1.3. Sezonska raspodjela

Q-groznica se u endemskim područjima pojavljuje tijekom cijele godine, ali najčešće zimi i u proljeće, tako da se sezonski karakter Q-groznice povezuje sa sezonom janjenja i jarenja (32).

Uzgajivači ovaca i koza najčešće obolijevaju u proljetnim mjesecima, dok druge profesionalno izložene osobe kao što su prerađivači vune, krznari, mesari, veterinari mogu oboljeti u bilo koje doba godine (28). Hellenbrand i suradnici opisali su da je u Njemačkoj došlo do promjene u sezonskoj distribuciji oboljelih, jer je više oboljelih registrirano u ljetnim mjesecima (33).

U tropskim područjima je incidencija bolesti viša za vrijeme kišnih sezona, a to se opet povezuje sa životinjama čije potomstvo raste u to doba godine. U Australiji se za vrijeme kišnih jesenskih sezona, od veljače do svibnja, povećava broj tobolčara koji su poznati rezervoari koksijela, dok je u Francuskoj Gvajani vrhunac obolijevanja ljudi u svibnju kada se bilježi veći broj troprstih ljenivaca, životinja sličnih mravojedima, koje su važan rezervoar koksijela u tom području (16).

U Hrvatskoj se najviše prijava akutne Q-groznice bilježi u proljetnim mjesecima, što se povezuje s janjenjem i jarenjem životinja (4, 28).

1.4.1.4. Raspodjela po dobi i spolu

Dob se smatra rizičnim čimbenikom, te su mnogi autori istakli da starije osobe češće obolijevaju od Q-groznice.

Prema istraživanju Maurina i Raoulta, seroprevalencija Q-groznice u djece raste s njihovom dobi jer se s godinama povećava vjerojatnost kontakata s uzročnikom Q-groznice (11). Istraživanje koje su proveli Raoult i suradnici pokazalo je da muški spol i dob preko 15 godina povećavaju rizik za simptomatsku Q-groznicu (19).

Osobe muškog spola češće obolijevaju, što je najviše povezano s njihovim zanimanjima, ali i češćim boravkom u prirodi.

Međutim, nekoliko je istraživanja istaknulo važnu ulogu spolnih hormona, tj. zaštitnu ulogu ženskog spolnog hormona 17 beta-estradiola u kontroli infekcije koksijelama. Rezultati istraživanja koje su proveli Leone i suradnici pokazali su da estrogini zaustavljaju upalni odgovor kojeg inducira bakterija te sprječavaju stvaranje granuloma (34). Ovi rezultati mogu objasniti zašto osobe muškog spola imaju težu kliničku sliku i češće komplikacije tijekom infekcije.

1.4.1.5. Zanimanje i socioekonomski status

Q-groznica je profesionalna bolest. Od nje prvenstveno obolijevaju osobe koje zbog prirode posla dolaze češće na izravan ili neizravan način u kontakt sa životinjama i/ili njihovim produktima. To su uzgajivači stoke, veterinari, veterinarski tehničari, prerađivači

kože i vune, djelatnici u klaonicama, mesari, lovci, djelatnici u proizvodnji sira, poljoprivrednici te laboratorijsko osoblje. Međutim i stanovništvo u ruralnim područjima je u većem riziku od infekcije koksijelama u odnosu na urbano stanovništvo. Mnogi su autori u svojim radovima istaknuli zanimanje kao jedan od najznačajnijih rizičnih čimbenika kod oboljelih od Q-groznice (35-39).

1.4.2. Javnozdravstveni značaj Q-groznice

Q-groznica je zoonoza koja se u Hrvatskoj pojavljuje sporadično ili u manjim epidemijama, a njezina učestalost raste s razvojem stočarstva. Temeljem Zakona o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti („Narodne novine“, broj 60/2014.), ali i Zakona o veterinarstvu („Narodne novine“, broj 82/2013., 148/2013.), svaki slučaj obolijevanja životinje od Q-groznice te slučaj pobačaja kod ovaca, koza i goveda, obavezno treba prijaviti Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane (40).

Prijava oboljelih osoba i životinja od Q-groznice te nadzor nad pojavom bolesti je važan iz zdravstvenih i ekonomskih razloga. Tijekom 2008. godine pretraživanjem 1161 uzorka seruma domaćih preživača na prisutnost protutijela na Q-groznicu metodom reakcije vezanja komplementa s područja Istarske županije, ustanovljeno je 9,16% seropozitivnih ovaca i koza, dok su goveda bila negativna (41). Posljednjih je godina u Istri, ali i u drugim područjima Hrvatske izražen trend razvoja seoskog turizma, kojeg često prati proizvodnja mliječnih proizvoda, kao i blizak kontakt velikog broja ljudi sa životinjama na tim imanjima. To sve može predstavljati dodatnu opasnost od Q-groznice (41).

Hengl i suradnici su dokazali po prvi put u Hrvatskoj prisutnost *C. burnetii* u sirovom mlijeku iz mljekomata u 17,4% slučajeva, što indirektno ukazuje na prisutnost koksijela u stadu goveda te je stoga potrebno kontinuirano provoditi preventivne veterinarsko sanitarne mjere. Naglasili su da prisutnost koksijela predstavlja potencijalni rizik za zdravlje ljudi iako su zabilježeni slučajevi obolijevanja na ovaj način rijetki (42). Sings i suradnici također su naglasili rizik od Q-groznice pri konzumaciji nepasteriziranog mlijeka, ali smatraju da bi i mliječni proizvodi, npr. sirevi također mogli predstavljali veći rizik nego što se to ranije smatralo (43).

Treba naglasiti kako se sve više izvještava o slučajevima obolijevanja u gradovima gdje su spore koksije raznošene vjetrovima na velike udaljenosti od pravog izvora infekcije (44).

1.4.3. Epidemiološke karakteristike Q-groznice u Istarskoj županij i općenito u Hrvatskoj

Najveći dio istarskog poluotoka (2.813 km² od 3.130 km² hrvatskog dijela Istre, što iznosi 80,1% teritorija Istre) zauzima Istarska županija. Jedan manji dio Istre pripada susjednoj Primorsko-goranskoj županiji (9,1%) te Sloveniji i Italiji (10,8%) (45).

Istarska županija je najzapadnija je županija u Hrvatskoj u kojoj živi više od 208.000 stanovnika. Većina stanovništva živi u gradovima. Ima deset gradova, 31 općinu te preko 600 sela. Gustoća naseljenosti je 73,4 stanovnika/km². Zapadna, južna i istočna strana Istarske županije okružene su morem, na sjeveru graniči sa Slovenijom, a na sjeveroistoku i istoku planine Učka i Ćićarija čine prirodnu granicu prema susjednoj Primorsko-goranskoj županiji (45).

Na temelju geološkog sastava i različitosti u tlu u Istri se razlikuju: Crvena Istra, Siva Istra i Bijela Istra. Za Bijelu Istru je karakteristično da se nalazi oko planinskih vrhova na njezinom sjeveroistočnom dijelu koji je produžetak Dinarida. Siva Istra je u unutrašnjosti Istre, dok se Crvena Istra prostire uz obalni dio, ali zahvaća i dio unutrašnjosti. Tlo je pretežno vapnenačko, tipičnog krškog reljefa.

Klima je mediteranska, a prema unutrašnjosti postepeno prelazi u kontinentalnu. Kontinentalne ravnice i doline prvenstveno su namijenjene poljoprivredi, a nekad tradicionalno ovčarstvo zastupljeno je tek u pojedinim područjima Istre (46).

Q-groznica je u južnoj Istri endemska te se javlja uglavnom sporadično i u manjim epidemijama (47). U Istarskoj županiji ističu se određena područja koja su endemska žarišta Q-groznice: područja oko Pule, Vodnjana, Valture, Galižane, Bala, Raše i Poreča.

Prokuženost stanovništva koksijelom u južnom dijelu Istre je općenito prilično visoka (oko 40%), što je ustanovljeno metodom RVK u istraživanju koje su 1959. godine u dvije epidemije Q-groznice u Barbarigi i Barbanu (mjestu u južnoj Istri) proveli Maretić i Vesenjani-Hirjan. Pokazalo se da su u obje navedene epidemije većina oboljelih bili ljudi koji su nedavno došli u Istru te prvi put došli u kontakt s *C. burnetii* (47).

U Istri se ovčarstvom bave uglavnom obiteljska poljoprivredna gospodarstva kao dio višestoljetne obiteljske, ali i područne tradicije. Prema podacima Hrvatske poljoprivredne agencije, prosječna veličina uzgajanog stada ovaca je oko 60 odraslih grla. Ovisno o meteorološkim uvjetima, sezona ispaše ovaca počinje krajem ožujka i traje sve do početka studenog, kada se ovce smještaju u staju (48). U Istri ovce po tradiciji skoro tijekom cijele godine pasu na prirodnim pašnjacima, zahvaljujući biljnoj raznolikosti Istre koja je odraz njezina geografskog položaja, podneblja i tla.

Na temelju prijava oboljelih od Q-groznice u razdoblju od 1968. do 2008. godine u Istarskoj županiji je prijavljeno 211 oboljelih od Q-groznice, što čini 9,07% svih prijavljenih slučajeva Q-groznice u Hrvatskoj za isto razdoblje. Najveći broj oboljelih od Q-groznice zabilježen je u periodu kasne zime i ranog proljeća, što se podudara s vremenom janjenja. Uglavnom su obolijevale muške osobe u radno aktivnoj dobi od 23 do 60 godina života (49).

Prate li se prijave oboljelih od Q-groznice na području cijele Hrvatske, u razdoblju od 1968. do 2008. godine, godišnji broj slučajeva oscilira iz godine u godinu i kreće se od 4 (1976. godine) do 298 (1983. godine), dok je ukupno u tom razdoblju prijavljeno 2326 oboljelih osoba od Q-groznice (Tablica 1.1).

U Hrvatskoj je Q-groznica dobro poznata zoonoza već punih 70 godina, a od 1954. godine se obavezno prijavljuje. Pojavljuje se sporadično i u manjim epidemijama, obično krajem zime ili u proljeće, te osobito u područjima razvijenog stočarstva. Na temelju prijava oboljelih osoba od Q-groznice u Hrvatskoj možemo dobiti uvid u područja s endemskom Q-groznicom. To su jadranski otoci (Krk, Pag, Brač, Korčula), područje Like, Gorskog kotara, Korduna, cijele Dalmacije, osobito Dalmatinske zagore (Benkovac, Drniš, Knin, Sinj), zatim područja Primorsko-goranske regije, Istre, sjeverozapadne Hrvatske te područja Moslavine i Slavonije (podaci HZJZ).

Tablica 1.1 Broj oboljelih od Q-groznice u razdoblju od 1968. do 2019. u Hrvatskoj
(podaci preuzeti od Službe za epidemiologiju HZJZ)

Godina	Broj oboljelih	Incidencija na 100. 000	Godina	Broj oboljelih	Incidencija na 100 000
1968.	9	0,2	1994.	33	0,7
1969.	73	1,7	1995.	27	0,6
1970.	31	0,7	1996.	99	2,1
1971.	25	0,6	1997.	51	1,1
1972.	24	0,5	1998.	26	0,6
1973.	26	0,5	1999.	20	0,4
1974.	6	0,1	2000.	26	0,6
1975.	45	1,0	2001.	51	1,1
1976.	4	0,1	2002.	23	0,2
1977.	12	0,3	2003.	206	4,5
1978.	5	0,1	2004.	104	2,3
1979.	35	0,8	2005.	40	0,9
1980.	20	0,4	2006.	28	0,6
1981.	7	0,2	2007.	43	0,9
1982.	63	1,4	2008.	41	0,9
1983.	298	6,4	2009.	22	0,5
1984.	196	4,2	2010.	24	0,5
1985.	117	2,5	2011.	20	0,4
1986.	56	1,2	2012.	43	1,0
1987.	37	0,8	2013.	25	0,6
1988.	18	0,4	2014.	21	0,5
1989.	94	2,0	2015.	14	0,3
1990.	64	1,4	2016.	8	0,2
1991.	170	3,6	2017.	29	0,7
1992.	44	0,9	2018.	16	0,4
1993.	29	0,6	2019.	9	0,2

1.4.4. Q-groznica u Europi

Novije epidemiološke studije pokazuju da je Q-groznica i dalje javnozdravstveni problem u mnogim europskim zemljama kao što su Nizozemska, Velika Britanija, Grčka, Francuska, Italija, Španjolska, Njemačka i Izrael (50).

Incidencija bolesti kreće se od 0,25 do 0,50 slučajeva na 100 000 stanovnika. Q-groznica je tipična "podprijavljena" bolest, jer se mnogi slučajevi ne registriraju zbog njene nespecifične kliničke simptomatologije. Na osnovu podataka preuzetih od Europskog sustava nadzora nad zaraznim bolestima (TESSy) za 2015. godinu, u 27 država EU/EEA zabilježen je 851 slučaj Q-groznice, od kojih je 824 (96,2%) laboratorijski potvrđeno. Stopa incidencije je bila 0,2 na 100 000 stanovnika (50). U većini tih država je broj prijavljenih slučajeva uglavnom bio isti kao i prethodnih godina ili niži, dok je u Njemačkoj i Francuskoj zabilježen porast broja prijavljenih slučajeva.

Najviše potvrđenih slučajeva Q-groznice bilo je kod pripadnika muškog spola i u dobi preko 65 godina života. Što se tiče sezonske distribucije, najviše je oboljelih bilo u periodu od travnja do listopada, s vrhuncem obolijevanja u mjesecu lipnju. To je osobito bilo izraženo u Njemačkoj i Španjolskoj. Zanimljivo je da se vrhunac obolijevanja pomaknuo za jedan mjesec unaprijed u odnosu na mjesec svibanj, za što nema pravog objašnjenja (50).

Švicarska je 1983. godine imala svoju najveću epidemiju u kojoj je oboljelo više od 400 osoba, iako je poznato da je Q-groznica u Švicarskoj rijetka i sporadična bolest (51). Najveća epidemija Q-groznice uopće zabilježena je u Nizozemskoj u razdoblju od 2007. do 2010. godine, s više od 4000 potvrđenih oboljelih osoba. Ta je epidemija stavljena pod nadzor drastičnim veterinarskim mjerama kao što je ubijanje čitavih seropozitivnih stada životinja. Međutim, ni na taj način, problem kronične Q-groznice nije mogao biti do kraja riješen. Do pojave ove epidemije, Q-groznica je u Nizozemskoj bila relativno nepoznata (52, 53).

Važeća definicija Q-groznice unutar EU uključuje klinički, laboratorijski i epidemiološki kriterij i u uporabi je od 2003. godine. Za postavljanje dijagnoze nužno mora biti prisutan barem jedan od slijedećih tri klinička kriterija: groznica, pneumonija, hepatitis; barem jedan od tri laboratorijska kriterija: izolacija *C. burnetii* iz kliničkog uzorka, dokaz nukleinske kiseline *C. burnetii* u kliničkom uzorku, specifičan odgovor protutijela na *C. burnetii* (IgG ili IgM faze II) te barem jedan od dva epidemiološka kriterija: izloženost zajedničkom izvoru te prijenos sa životinje na čovjeka (54).

1.5. Q-groznica u životinja

Poznato je da je *C. burnetii* široko rasprostranjena u prirodi te da može inficirati različite vrste sisavaca, ptice, gmazove i ribe (11). Kod krpelja je prvi put izolirana iz vrste *Dermacentor andersoni*, nakon čega je potvrđena u preko 40 vrsta krpelja, te se oni smatraju njezinim prirodnim rezervoarom.

Istraživanje koje su proveli Toledo i suradnici u središnjoj Španjolskoj, pokazalo je u dvije vrste krpelja (*Hyalomma lusitanicum* i *Dermacentor marginatus*) prisustvo koksijela, te je istaknuta njihova moguća uloga kao vektora i rezervoara *C. burnetii* (55). Sprong i suradnici, analizirajući krpelje na prisutnost koksijela PCR metodom, kao i njihovu ulogu u prijenosu infekcije za vrijeme velike epidemije Q-groznice u Nizozemskoj, zaključili su da krpelji ne predstavljaju značajniji put prijenosa za ljude. Međutim, naglasili su važnost daljnjeg istraživanja kako bi se potvrdio ili opovrgao eventualni transovarijalni prijenos *C. burnetii* na slijedeće generacije krpelja (56).

Najvjerojatniji put infekcije kod životinja je udisanje aerosola u kojem su raspršene infektivne čestice (57, 58). Ovisno o čimbenicima kao što su imuni status životinja, veličina stada te virulentnost soja *C. burnetii*, infekcija će se širiti unutar stada, što može imati za posljedicu veliki broj pobačaja (*abortion storm*), kao što je zabilježeno u Nizozemskoj u razdoblju od 2005. do 2009. godine (59).

Zaražene domaće i divlje životinje u većini slučajeva ne pokazuju znakove bolesti. Međutim, za vrijeme okota ili nakon pobačaja, preko posteljice i plodne vode izlučuju koksije u velikoj količini, iako ih mogu izlučivati u manjoj mjeri mokraćom, stolicom i mlijekom (11). Na taj način životinje kontaminiraju okolinu, a poznato je da jedan gram posteljice može sadržavati i do 10^9 koksijela (11). Novije studije pokazuju kako je izlučivanje koksijela mlijekom tipičnije za krave i koze, dok se koksije kod ovaca više izlučuju vaginalnom sekrecijom i stolicom (60, 61).

Goveda, koze i ovce se smatraju primarnim rezervoarom infekcije za ljude (11, 62). U urbanoj sredini se kao mogući izvori infekcije ljudi navode kućni ljubimci-mačke, kunići i psi. Psi se mogu zaraziti ako pojedu posteljicu zaražene životinje ili preko kontaminiranog aerosola, a mačke najvjerojatnije preko štakora koji predstavljaju značajan rezervoar koksijela za domaće životinje. Prevalencija IgG protutijela faze II *C. burnetii* među smeđim štakorima u Ujedinjenom Kraljevstvu bila je između 7-53% (63).

U domaćih je životinja Q-groznica često kronična, najčešće asimptomatska infekcija koja može uzrokovati reproduktivne komplikacije, kao što su pobačaji, upala maternice,

zaostajanje posteljice te slabo vitalna mladunčad. Uterus i mliječne žlijezde su primarno mjesto kronične infekcije koksijelama (11). Klinički ishod infekcije koksijelama, većinom kod ovaca i koza, je pobačaj i okot mrtvog ploda, a kod goveda je češći mastitis i neplodnost (60, 64). U većini slučajeva pobačaj se događa pri kraju gestacije bez specifičnih kliničkih znakova koji bi upozoravali na takav ishod (60). Krave pobacuju u zadnjoj trećini gravidnosti, na posteljici se uočava upala tkiva, nekroza i vaskulitis, a na plodovima patohistološki znakovi pneumonije.

Prisutnost protutijela na *C. burnetii* (seroprevalencija) u ovaca i koza dokazana ELISA serološkom metodom navedena je za mnoge zemlje (seroprevalencija kod ovaca je 9% u Italiji i Portugalu, 11% u Čadu, 12% u Španjolskoj, 18% u Keniji, 20% u Turskoj i Iranu, a kod koza 9% u Španjolskoj, 10% u Portugalu, 13% u Italiji i Čadu, 32% u Keniji te 66% u Iranu) (59). Antibiotško liječenje domaćih preživača provodi se za vrijeme posljednjeg mjeseca gestacije s dvije injekcije tetraciklina (oksitetraciklin 20 mg/kg TT), iako ono ne sprječava izlučivanje koksijela tijekom pobačaja ili okota. U dokazano inficiranim stadima treba posebno izdvojiti gravidne životinje, a preventivna primjena tetraciklina u dozi od 8 mg/kg dnevno, može značajno smanjiti izlučivanje koksijela iz zaraženih životinja (62).

1.5.1 Q-groznica u ovaca

Infekcija koksijelom kod ovaca je prolazna nakon čega slijedi potpuna remisija. Inficirane ovce obično prestaju izlučivati uzročnika Q-groznice nakon nekoliko mjeseci i nisu dugo zarazne za druge životinje u stadu, osim za vrijeme okota ili pobačaja (3).

Postoje eksperimentalni dokazi koji pokazuju da su gravidne ovce osjetljivije na infekciju koksijelom (59). Kod ovaca je prisutno duže izlučivanje koksijela vaginalnom sekrecijom u odnosu na koze, koje se ponovno pojavljuje sa svakim slijedećim graviditetom (60). Berri i suradnici su u svom istraživanju došli do zaključka da i seronegativne ovce mogu izlučivati koksije u više od 20% slučajeva. Stoga je potrebno pomoću PCR metode identificirati koksije u tkivima kako bi se ustanovila stvarna zaraženost ovce (57).

U eksperimentalno zaraženih ovaca primijećeni su simptomi, kao što su povišena temperatura, rinitis, inapetencija, kašalj i ubrzano disanje (65).

1.5.2. Q-groznica u koza

U koza inficiranih koksijelom opisuje se slabije uzimanje hrane i potištenost nekoliko dana prije pobačaja. Za razliku od inficiranih ovaca koje prestaju izlučivati koksije nakon nekoliko mjeseci, kod koza je često prisutno kronično izlučivanje koksijela (3). Prijenos infekcije koksijelom može biti horizontalan preko različitih krpelja, ili direktnim kontaktom s drugom zaraženom životinjom, kada se infekcija vrlo brzo proširi na seronegativne životinje u stadu te vertikalno prijenos na potomstvo (66).

Van den Brom i suradnici opisali su infekciju koksijelom u koza i ustanovili da su koze bile znatno više osjetljive od ovaca na tu infekciju, što su potvrdili i drugi autori (59, 66). Hatchette i suradnici su, istražujući epidemiju Q-groznice među zaposlenicima na farmama u ruralnom području Newfoundlanda (Kanada), došli do zaključka da je glavni uzrok obolijevanja ljudi bio kontakt s gravidnim kozama koje su pobacile (66). Koze predstavljaju veliku opasnost za zdravlje ljudi svugdje gdje dolazi do intenzivnijeg porasta broja koza na farmama, osobito ako se farme nalaze u blizini naseljenih mjesta. Na prisutnost infekcije koksijelom u koza treba posumnjati kada za vrijeme sezone jarenja dolazi do neuobičajenog porasta broja pobačaja (66). Roest i suradnici su u svom istraživanju pokazali da gravidne koze inficirane *C. burnetii* tijekom normalnog okota također izlučuju preko posteljice ogromnu količinu koksijela, kao i kod spontanijih pobačaja, te tako kontaminiraju okolinu, što predstavlja značajan izvor infekcije za ljude (58).

1.6. Q-groznica u ljudi

Poznate su različite kliničke manifestacije Q-groznice u ljudi, od akutnih oblika kao što je nespecifično febrilno stanje, atipična upala pluća, hepatitis, do razvoja kroničnih oblika bolesti od kojih je najteži endokarditis. Približno 60% inficiranih osoba nema znakove bolesti (60).

Zbog vrlo različite kliničke prezentacije, prevalencija infekcije *C. burnetii* je u velikoj mjeri nepoznata i najviše ovisi o interesu liječnika za ovu bolest, kao i o postojanju odgovarajućeg dijagnostičkog laboratorija (43). Postoje jasni eksperimentalni, a također i epidemiološki dokazi da je najvažniji put prijenosa infekcije za ljude udisanje infektivnog aerosola, zatim direktni kontakt sa zaraženom životinjom, njezinom posteljicom i tjelesnim izlučevinama te indirektnim kontaktom preko životinjskih produkata, kao što je vuna (11, 62).

1.6.1. Akutna Q-groznica

Akutna infekcija, koja se obično manifestira kao febrilno stanje nepoznatog uzroka, upala pluća ili hepatitis, gotovo uvijek započinje iznenada. Inkubacija najčešće traje dva do tri tjedna, a ovisi o infektivnoj dozi (2). Zabilježene su inkubacije od svega 4 do 5 dana, pa sve do 40 dana (4). Simptomi su obično blagi. Kada su simptomi izraženi, najčešće se radi o nespecifičnom febrilnom stanju sličnom influenci (17). Temperatura je visoka, često praćena tresavicom. Trajanje febrilnog perioda kod akutnog oblika bolesti znatno varira, ali je najčešće između 5 i 15 dana.

U ovom obliku infekcije, karakteristična je jaka čeona glavobolja, često praćena bolovima u očima i fotofobijom, kao i meningizam bez patoloških promjena u likvoru. Izražena je mijalgija, artralgiya, opća slabost, znojenje i nesanica (5). Drugi simptomi ovise o organu koji je zahvaćen. Za razliku od drugih riketsijskih bolesti, osip se pojavljuje rijetko, iako se kod nekih bolesnika pojavljuju nespecifične eritematozne promjene ili urtikarije koje mogu trajati tjednima (2). Respiratorni simptomi se obično pojavljuju nakon 5 do 7 dana od početka bolesti. Bolesnici imaju neproduktivni, suhi kašalj, a rentgen pluća obično pokazuje umjerene obostrane intersticijske infiltrate donjih režnjeva pluća, iako kod nekih bolesnika može doći do razvoja pleuralnog izljeva ili razvoja respiratornog distres sindroma (ARDS) (17).

Karakterističan je nesrazmjer između relativno velikih plućnih infiltrata koji se otkrivaju rendgenski u odnosu na auskultatorni nalaz na plućima koji može biti potpuno uredan (4). Kod Q-groznice, glavobolja je često udružena s upalom pluća za razliku od upala pluća druge etiologije (67).

Uz upalu pluća, najčešće se javlja hepatitis koji može biti asimptomatski ili praćen simptomima gubitka apetita i slabosti. Vrijednosti transaminaza su povišene, uglavnom bez žutice i uz spontanu normalizaciju kroz nekoliko tjedana. Biopsija jetre pokazuje granulome koji se sastoje od lipidnih vakuola okruženih vezivnim prstenom (17). Broj leukocita je obično normalan ili tek neznatno povišen, iako ponekad može doći do leukopenije, s nešto više nezrelih neutrofila. Karakteristična je i trombocitopenija.

Druge, manje česte manifestacije Q-groznice, uključuju miokarditis, perikarditis, meningitis i encefalitis (17).

Q-groznica uglavnom završava potpunim ozdravljenjem, spontano ili uz liječenje antibioticima (2). Kraj bolesti označen je litičkim padom temperature uz profuzno znojenje.

U nekih bolesnika 4 do 8 dana nakon pada temperature nastupa recidiv bolesti sa sličnim simptomima i traje 3 do 10 dana (5). U razdoblju rekonvalescencije, osobito u starijih osoba, zapaža se dugotrajna postinfekcijska astenija, glavobolja i znojenje (15).

Smrtnost od akutne Q-groznice je manja od 1%, a preboljenjem bolesti stječe se dugotrajna, najčešće i doživotna imunost (4, 12).

1.6.1.1. Komplikacije u tijeku Q-groznice

Moguće neurološke manifestacije tijekom akutne Q-groznice uključuju aseptički meningitis, encefalitis ili encefalomijelitis, toksično konfuzno stanje, ekstrapiramidne znakove, demenciju, poremećaj ponašanja i višestruka oštećenja kranijalnih živaca (68). Tiroiditis, miokarditis, perikarditis, nekroza koštane srži, orhitis, epididimitis, nodozni eritem, tromboflebitis i ruptura slezene vrlo su rijetke manifestacije akutne Q-groznice (67).

Reilly i suradnici izvjestili su o zapanjujuće visokoj incidenciji neuroloških komplikacija kod 103 bolesnika oboljelih od Q-groznice u Plymouthu, Engleska, koja je dosezala čak 22% u tijeku akutne infekcije (69). Bonetti i suradnici prikazali su kod jednog 70-godišnjeg bolesnika relaps demijelinizirajućeg poliradikuloneuritisa koji se razvio deset mjeseci nakon upale pluća uzrokovane infekcijom *C. burnetii* (70). Proučavajući 1383 osobe oboljele od Q-groznice u razdoblju od 1985. do 1998. godine, Raoult i suradnici su ustanovili da je glavobolja najučestalija neurološka manifestacija Q-groznice, dok su meningitis, meningoencefalitis i periferne neuropatije rjeđe (71).

Bernit i suradnici iznijeli su veći rizik razvoja neuroloških manifestacija kod profesionalno izloženih osoba tijekom akutne Q-groznice u odnosu na druge osobe. To objašnjavaju time što su te osobe izloženije infekciji *C. burnetii*, uz veću mogućnost reinfekcije ili kontakta sa sojem bakterije koja ima veći patogeni potencijal za središnji živčani sustav (68).

Dosta česta pojava, koja se najčešće povezuje s komplikacijom akutne Q-groznice i ukazuje na umjereno tešku akutnu bolest je sindrom kroničnog umora (72). Analizirajući bolesnike koji su imali Q-groznicu u Engleskoj, Ayres i suradnici su ustanovili da su prolongiran umor, pojačano znojenje, mutniji vid i kratkoća daha bili zastupljeniji u skupini bolesnika koji su imali Q-groznicu u odnosu na kontrolnu skupinu (73). Ledina i suradnici su zaključili da znatan broj bolesnika razvija sindrom kroničnog umora nakon akutne Q-groznice unatoč odgovarajućoj antibiotskoj terapiji (74).

1.6.2. Kronična Q-groznica

Osobe koje su preboljele akutnu Q-groznicu mogu za godinu do 20 godina razviti kroničnu infekciju. Imunokompromitirane osobe su u većem riziku za razvoj kroničnog oblika bolesti. Kronična Q-groznica se javlja u 5% oboljelih, ali je njezina klinička slika puno teža. Simptomi koji ukazuju na kroničnu Q-groznicu su nespecifičan umor, povišena temperatura, gubitak tjelesne težine, noćno znojenje i hepatosplenomegalija te endokarditis (17). Endokarditis je najčešća i najteža manifestacija kronične Q-groznice. Pritom smrtnost iznosi i do 65% (18). Nastaje kod imunokompromitiranih osoba i kod onih koji imaju oštećene ili umjetne srčane zalistke na kojima koksije mogu dugo preživjeti. Međutim, kako ultrazvuk srca rijetko pokazuje vegetacije na zaliscima, serološka dijagnostika je osobito važna za potvrdu dijagnoze kronične Q-groznice.

Kroničnom infekcijom se smatra kada simptomi Q-groznice perzistiraju duže od šest mjeseci uz prisutnost IgG i IgA protutijela na antigene faze I *C.burnetii*. U kroničnoj Q-groznici uz protutijela za fazu II javljaju se u višem titru i protutijela za virulentni antigen faze I koja dugo perzistiraju (titar protutijela za fazu I IgG titar (>800) i IgA (>100) (18). Rjeđe, kronična se infekcija može razviti u arterijskoj aneurizmi, arteriovenskoj prenosnici, jetri, plućima, zglobovima ili kostima, te osim endokarditisa razlikujemo i druge kronične infekcije kao što su granulomatozni hepatitis, intersticijska fibroza pluća, intravaskularne infekcije, osteoartritis te osteomijelitis (18). Osip se zapaža u oko 20% bolesnika s endokarditisom kao posljedica vaskulitisa nastalog odlaganjem imunih kompleksa.

Mnogi su autori naglasili da je razvoj kardiovaskularne kronične Q-groznice više povezan sa zdravstvenim stanjem oboljele osobe (imunosupresija, oštećenje srčanih zalistaka), nego sa specifičnim sojevima *C. burnetii* (24, 75, 76). Međutim, Glazunova sa suradnicima je genotipizacijom sojeva koksije pomoću tehnike MST (engl. *multispacer sequence typing*), ustanovila korelaciju između sojeva QpRS koksijela i kronične Q-groznice te sojeva QpDV koksijela i akutne Q-groznice (77).

Fenollar i suradnici su u retrospektivnoj studiji bolesnika oboljelih od Q-groznice u razdoblju od 1985. do 2000. godine procijenili da je kod bolesnika s oštećenim srčanim zaliscima u 39% slučajeva veći rizik za razvoj kroničnog endokarditisa (75). Tissot-Dupont i suradnici, ističući važnost rizičnih čimbenika na razvoj kronične infekcije koksijelom, smatraju da je potrebno kontrolirati bolesnike koji su oboljeli od Q-groznice kroz duže vrijeme, osobito one s povećanim rizikom za razvoj kronične infekcije (22).

U Francuskoj je u posljednjih trideset godina zabilježeno češće pojavljivanje kronične infekcije koksijelom u imunokompromitiranih bolesnika, kao što su onkološki bolesnici, dijalizirani, transplantirani, oboljeli od kronične mijeloične leukemije, bolesnici inficirani virusom humane imunodeficijencije (HIV), kronični alkoholičari te bolesnici koji primaju kortikosteroidnu terapiju (76). Važno je dobro poznavati rizične čimbenike za razvoj kronične Q-groznice te rano postaviti dijagnozu s obzirom na visok pobol i smrtnost.

1.6.3. Q-groznica u trudnoći

Trudnoća je stanje tijekom kojeg je imuni odgovor oslabljen te su trudnice stoga u većem riziku od obolijevanja ako dođu u kontakt s uzročnicima zarazne bolesti. Poznato je da za vrijeme trudnoće dolazi do hormonskih promjena koje uzrokuju imunomodulaciju te stoga dolazi do reaktivacije koksijela i njihovog umnožavanja u posteljici.

C. burnetii kod trudnica može uzrokovati pobačaje, prijevremeno rođenje djeteta te nižu porođajnu težinu u novorođenčeta (11). Sam ishod trudnoće kod oboljele trudnice, ovisit će u kojem tromjesječju trudnoće je došlo do infekcije. Poznato je, naime, da su češći pobačaji ako je infekcija nastupila tijekom prvog tromjesječja. Kod inficiranih trudnica u prvom tromjesječju trudnoće, terapija kotrimoksazolom spriječila je pobačaj, ali nije imala utjecaj na kasniji razvoj kroničnog oblika bolesti (78).

Iako su kod trudnica česte asimptomatske infekcije, one imaju predispoziciju za razvoj kronične Q-groznice ili reaktivaciju bolesti za vrijeme kasnijih trudnoća (78). Utjecaj infekcije *C. burnetii* na trudnoću te raspon rizika od nepovoljnog ishoda trudnoće među zaraženim ženama još uvijek nisu dovoljno istraženi. Opisani su slučajevi fetalne smrti, placentitisa te trombocitopenije kod trudnica oboljelih od Q-groznice (79).

1.7. Dijagnostika Q-groznice

Dijagnoza Q-groznice postavlja se na temelju kliničke slike, epidemioloških podataka i mikrobioloških pretraga (28). Razlikovanje Q-groznice od drugih atipičnih pneumonija na osnovu same kliničke slike i rutinskih laboratorijskih nalaza najčešće nije moguće.

Iscrpna i ciljana epidemiološka anamneza može usmjeriti na dijagnostičke postupke koji potvrđuju etiologiju bolesti (80). Iz epidemioloških podataka saznajemo je li oboljela osoba boravila u poznatom endemskom žarištu Q-groznice, je li bila u kontaktu s domaćim

i/ili divljim životinjama, a osobito je važan podatak kontakt s ovčama ili srodnim životinjama u vrijeme okota (janjenje, jarenje, telenje i sl.).

Međutim za postavljanje točne dijagnoze najvažnija je laboratorijska dijagnostika. Ona može biti izravna i neizravna.

Izravnom laboratorijskom dijagnostikom *C. burnetii* se može izolirati iz krvi i iskašljaja bolesnika u akutnoj Q-groznici i iz krvi i vegetacija na srčanim zaliscima kod kroničnog endokarditisa. Izolacija se provodi u laboratorijskim životinjama, žumanjčanoj vreći kokošjeg embrija te u staničnoj kulturi. Ovaj postupak se provodi rijetko, i to samo u referentnim laboratorijima trećeg stupnja biosigurnosti-BSL3, s obzirom da je koksijela vrlo infektivna i često uzrokuje laboratorijske infekcije te je potreban poseban oprez i zaštita (81).

Izravna imunofluorescentna tehnika za detekciju *C. burnetii* koristi se kod bolesnika s Q-endokarditisom jer se koksije nalaze u velikom broju na zahvaćenim srčanim zaliscima (13). PCR metoda se uspješno koristi u otkrivanju DNA *C. burnetii* u staničnim kulturama i kliničkim uzorcima. Dostupna je u većini laboratorija i ima visoku specifičnost i osjetljivost (82).

Neizravna dijagnostika je serološka dijagnostika koja se temelji na dokazivanju specifičnih protutijela.

1.7.1. Serološka dijagnostika

Serološka dijagnostika temelji se na humoralnom imunosnom odgovoru na infekcije. U svakodnevnom kliničkom radu koristi se neizravna laboratorijska dijagnostika, tj. dokaz specifičnih protutijela u bolesnikovu serumu pomoću seroloških testova. Najčešće se primjenjuje imunoenzimski test (EIA/ELISA) i indirektna imunofluorescencija (IFA). IFA je metoda izbora u dijagnostici Q-groznice (17, 79).

U akutnoj Q-groznici primarno se javljaju protutijela na antigenu fazu II *C. burnetii*. Protutijela IgM se pojavljuju potkraj prvog ili u drugom tjednu bolesti, a najviši titar dosežu od četvrtog do osmog tjedna. IFA ili EIA/ELISA-testom mogu se otkriti protutijela klase IgM i tako rano postaviti radnu dijagnozu akutne Q-groznice iz samo jednog uzorka seruma, dok je za potvrdu dijagnoze potrebno uzeti parni serum nakon 2 do 3 tjedna.

Dijagnoza akutne Q-groznice dokazuje se četverostrukim porastom titra protutijela, titrom IgM protutijela ≥ 50 , ili IgG titrom ≥ 200 za antigen faze II (17, 83). IgM protutijela perzistiraju 6 do 8 mjeseci, a IgG najvjerojatnije doživotno (83).

U kroničnoj Q-groznici su protutijela antigene faze I *C.burnetii* u višem titru od protutijela faze II, a također je viši titar protutijela IgA. Serološka dijagnostika je osobito važna kod onih uzročnika koje je teško izolirati ili se radi o posebno infektivnim uzročnicima, kao što je to *C. burnetii*. Dinamiku stvaranja protutijela možemo pratiti određivanjem titra protutijela u određenim vremenskim intervalima. Primarnu infekciju karakterizira serokonverzija kada dolazi do promjene imunološkog statusa od neprisutnih do prisutnih protutijela u serumu. Prvo se pojavljuju IgM protutijela nakon 2-3 tjedna od primarne infekcije, a kasnije dolazi do stvaranja IgG protutijela koja postepeno rastu. Sekundarni, dodatno pojačani (booster) ili anamnestički odgovor javlja se kod ponovnog susreta s istim uzročnikom, kao što je to kod reinfekcije.

1.7.2. Diferencijalna dijagnoza Q-groznice

Diferencijalna dijagnoza Q-groznice uključuje mnoge bolesti. Kada se u ranom stadiju očituje kao nespecifična febrilna bolest, nalikuje brojnim drugim infekcijama, kao što su influenza i druge virusne infekcije, salmoneloza, enteroviroza, malarija, hepatitis, a u kasnijoj fazi brojnim bakterijskim, virusnim, mikoplazmatskim upalama pluća te psitakozii. Kod brzo progredirajućih oblika upale pluća treba posumnjati na legionarsku bolest i tularemiju, a kod granulomatoznog hepatitisa treba isključiti sarkoidozu, tuberkulozu, Hodgkinovu bolest i infekcijsku mononukleozu.

Diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir i rikecije, bruceloza, leptospiroza, sepsa, histoplazmoza, subakutni bakterijski endokarditis, meningoencefalitisi različite etiologije te neka druga stanja koja se rjeđe povezuju s Q-groznicom, kao što su vertebralni osteomijelitis te različite hematološke manifestacije (prolazna hipoplastična anemija, trombocitoza, ruptura slezene) i još mnoge druge bolesti (2).

1.8. Liječenje i prevencija Q-groznice

Lijek izbora za akutnu Q-groznicu su tetraciklini (doksiciklin) koji skraćuju febrilnu fazu bolesti za 1-2 dana. Preporučena doza doksiciklina je 2 puta dnevno 100 mg per os ili parenteralno najmanje dva tjedna (17, 81).

Antibiotsko liječenje je učinkovitije ako se primjeni unutar tri dana od početka bolesti. Primjena odgovarajućeg antibiotika dovodi do bržeg ozdravljenja i sprječava recidive. Pretpostavlja se da liječenje doksiciklinom smanjuje vjerojatnost nastanka kronične infekcije. *C. burnetii* je in vitro osjetljiva na brojne antibiotike, osim na beta-laktamske. Iako

je doksiciklin lijek izbora, od alternativnih lijekova koriste se makrolidi, kinoloni i kotrimoksazol (11).

Ako se Q-groznica dijagnosticira za vrijeme trudnoće, lijek izbora je kotrimoksazol (sulfametoksazol i trimetoprim) do kraja trudnoće, a također i kod kroničnog oblika Q-groznice u djece (81). Nakon poroda, treba nastaviti terapiju s 200 mg doksiciklina i 600 mg hidroksiklorokina najmanje jednu godinu.

U bolesnika s Q-endokarditisom, liječenje mora biti dugotrajno. Obično se kombinira jednokratno doksiciklin u dozi 200 mg, a zatim 2 x 100 mg dnevno i hidroksiklorokin u dozi 200 mg tri puta dnevno, tako da koncentracija lijeka u plazmi bude 0,8-1,2 µg/ml (81). Terapija endokarditisa traje od 18 mjeseci do 4 godine, a kod nekih bolesnika je liječenje doživotno (2, 17). Hidroksiklorokin alkalizira fagolizosome u kojima se nalaze koksije i pojačava baktericidni učinak doksiciklina (12).

Bolesnike koji uzimaju tu kombinaciju lijekova treba upozoriti na neželjene učinke liječenja kao što su fotosenzibilizacija i toksično djelovanje na mrežnicu oka (2). Stoga su obavezne oftalmološke kontrole svakih šest mjeseci (2). Oni bolesnici koji ne mogu primati tu kombinaciju lijekova, mogu se liječiti kombinacijom rifampina (1x300 mg) i doksiciklina (2x100mg) ili ciprofloksacina (750 mg dva puta dnevno) koja je također vrlo učinkovita. U većini slučajeva potrebna je kirurška intervencija zamjene srčanih zalistaka da bi se postiglo izlječenje.

Fluorokinoloni se preporučuju u slučaju meningoencefalitisa jer, za razliku od tetraciklina, bolje prolaze krvno-moždanu barijeru (12).

1.8.1 Prevencija Q-groznice

U program preventivnih mjera protiv Q-groznice kod životinja predlažu se sistematska serološka testiranja te cijepljenje životinja, osobito u endemskim područjima.

Cijepljenje je vrlo učinkovito kod nezaraženih životinja. Smatra se da cijepljene životinje ne mogu prenijeti bolest.

Otkako je 2010. godine uvedeno obavezno cijepljenje za ovce i koze u Nizozemskoj, nije bilo niti jednog pobačaja uzrokovanog koksijelama te se cijepljenje smatra vrlo učinkovitom mjerom u sprječavanju pobačaja kod ovaca i koza (84). Na taj se način sprječava izlučivanje bakterija mlijekom, mokraćom i stolicom te kontaminacija okoline, a samim tim i sprječavanje prijenosa infekcije na ljude.

Životinje koje su imale pobačaj treba izolirati najmanje tri tjedna. Prije uvođenja novih životinja u stado preporučuje se njihovo serološko testiranje. Ako je stado zaraženo, može se primjeniti antibiotska zaštita tetraciklinima. Smatra se da liječenje životinja smanjuje pojavu pobačaja, ali ne sprječava izlučivanje koksijela.

1.8.1.1. Smjernice za profesionalno izložene osobe

Profesionalno izložene osobe moraju se pridržavati određenih pravila kako bi se spriječilo obolijevanje od Q-groznice. Po preporukama CDC-a, profesionalno izložene osobe moraju nositi propisnu zaštitnu opremu: zaštitne maske (bolji bi bio respirator N-95), zaštitne naočale, zaštitne rukavice te zaštitnu odjeću (85).

Osobito je važno koristiti zaštitnu opremu za vrijeme rada s gravidnim životinjama (66). Potrebno je provoditi striktne higijenske mjere na farmama, a naročitu pozornost treba usmjeriti na pravilnu dispoziciju životinjskih ekskreta, osobito nakon okota ili pobačaja, sanitarno zbrinjavati pobačene plodove, posteljice, plodne ovojnice na način da ih se odloži u zatvorene spremnike, a potom spali. Na taj način divlje i domaće životinje (npr. mačke, psi) neće moći doći u kontakt s odbačenom posteljicom koja može biti kontaminirana, a i utjecat će se i na smanjenje kontaminacije okoliša.

Veliku pozornost treba posvetiti redovitom čišćenju štala i dezinfekciji stajske opreme. U tu svrhu preporučuje se 10%-tni Na-hipoklorit. Treba izbjegavati uporabu gnojiva iz zaraženih stada na poljoprivrednim zemljištima. Gnojivo se treba fermentirati najmanje šest mjeseci ili ga treba kemijski tretirati primjenom vapna.

Potrebno je ograničiti pristup objektima gdje su smještene zaražene životinje ili potencijalno zaražene životinje (karantena za uvezene životinje) te koristiti u takvim objektima zrak pod negativnim tlakom da se spriječi širenje infekcije putem zraka na druge životinje, ali i na ljude. Radnici u mesnoj industriji se trebaju striktno pridržavati smjernica za sterilizaciju kod demontaže/montaže opreme za preradu mesa. Ruke trebaju češće prati dezinfekcijskim sapunom. Potrebno je primjeniti odgovarajuće postupke kod pranja kontaminirane odjeće. Cijepljenje je indicirano za sve profesionalno izložene osobe, osobito za laboratorijsko osoblje koje je uključeno u istraživanja i rad sa živim koksijelama.

Izuzetno je važna edukacija profesionalno izloženih osoba o infekciji i načinu prijenosa te pravovremeno informiranje onih osoba koje imaju bolest srčanih zalistaka, krvnih žila ili su na imunosupresivnoj terapiji, kako bi bile upoznate da su u većem riziku od drugih ljudi ukoliko obole od Q-groznice, zbog vrlo ozbiljnih komplikacija koje mogu

razviti tijekom bolesti. Potrebno je informirati ljude da najveći rizik od infekcije i razvoja komplikacije imaju i osobe s oslabljenim imunitetom zbog kroničnih bolesti, kao i trudnice kojima se treba posebno objasniti zašto je bitno da tijekom trudnoće ne posjećuju farme, što je suvremeni trend u sklopu sve razvijenijeg ruralnog turizma (85).

1.8.1.2. Cijepljenje

Razvoj cjepiva protiv Q-groznice prvenstveno je potaknut potrebom da se spriječi bolest među osobama koje su zbog prirode posla u većem riziku za infekciju koksijelom.

Cijepljenje životinja smatra se najboljom preventivnom mjerom u zaštiti osoba koje su zbog prirode posla u bliskom kontaktu sa životinjama te stoga izložene mogućoj zarazi koksijelom (13). Može prevenirati infekciju i time poboljšati fertilnost u životinja.

Dva trenutno dostupna cjepiva za životinje su cjepivo faze I Coxevac (CEVA Santé Animale, Francuska) i cjepivo faze II Chlamyvac FQ (MERIAL, Francuska). Istraživanjem njihove djelotvornosti pokazalo se da cjepivo faze I sprječava izlučivanje koksijela mlijekom, vaginalnom sekrecijom i fecesom te štiti od pobačaja, za razliku od cjepiva faze II koje nije imalo utjecaja na izlučivanje bakterija, kao ni na razvoj bolesti (86).

U Australiji se već više od 30 godina cijepi osobe koje su izložene riziku od infekcije *C. burnetii*. Cijepi se inaktiviranim cjelostaničnim cjepivom Q-VAX (CSL Limited, Parkville, Victoria, Australia) koje sadrži formalinom inaktiviranu bakteriju *C. burnetii* faze I Henzerling soj. Humano cjepivo (Q-VAX) je licencirano, ali trenutno dostupno samo u Australiji od 1989. godine.

Američka vojska koristi slično cjepivo za zaštitu svojih vojnika u područjima gdje je visoka incidencija Q-groznice ili u slučaju mogućeg biološkog rata.

Prijašnje spoznaje pokazale su da cjepivo štiti pet godina, ali je danas poznato da se cijepljenjem stvara doživotna imunost. Iako vrlo učinkovito, cjepivo ima ozbiljne nuspojave. Na mjestu aplikacije pojavljuju se supkutani apscesi ili lipomatozne tvorbe kod osoba koje su već bile u kontaktu s bakterijom *C. burnetii* ili su ranije cijepljene. Stoga je potrebno prije cijepljenja provjeriti njihov serološki status na Q-groznicu te napraviti kožni test. Ukoliko su oba testa negativna, cjepivo se može aplicirati. Aplicira se jednokratno supkutano u područje gornjeg dijela nadlaktice. Preporučuje se svim osobama starijim od 15 godina koje rade, žive ili posjećuju područja visokog rizika za Q-groznicu (13). Osoba se smatra zaštićenom 21 dan nakon cijepljenja.

Još uvijek se istražuje cjepivo za koje ne bi bilo potrebno prethodno testiranje i koje bi imalo manje nuspojava od postojećeg.

1.9. Svrha istraživanja

Poznato je da je južni dio Istre endemsko područje za Q-groznicu. Do sada nije provedeno istraživanje kojim bi se ustanovila prokuženost koksijelom na području cijele Istarske županije, s obzirom da je posljednjih desetak godina došlo do značajnih promjena u pogledu razvoja stočarstva u sjevernom dijelu županije.

Tijekom prospektivnog praćenja ispitanika kroz dvije uzastopne godine ustanovit će se dinamika protutijela u serološki pozitivnih profesionalno izloženih osoba te upoznati dinamika humoralnog odgovora ispitanika u obje regije Istarske županije.

Znanstveni doprinos temelji se na istraživanju dinamike humoralnog imunološkog odgovora u profesionalno izloženih osoba.

Istraživanje će omogućiti dobivanje dodatnih saznanja i o sljedećem:

1. određivanje prevalencije asimptomatskih infekcija koksijelom na temelju seroloških nalaza ispitanika u profesionalno izloženih osoba te usporedba južnog endemskog područja Istre u odnosu na sjeverni dio te županije
2. određivanje učestalosti reinfekcija tijekom prospektivnog praćenja ispitanika kroz dvije uzastopne godine na osnovi praćenja dinamike protutijela u serološki pozitivnih profesionalno izloženih osoba
3. izračunavanje kumulativne incidencije i relativnog rizika u ispitanika s obzirom na intenzitet izloženosti ovcima i/ili kozama te s obzirom na pripadnost regiji (sjever/jug)
4. određivanje međuzavisnosti pojavnosti infekcije koksijelom u ljudi ovisno o prokuženosti, odnosno prisutnosti klinički manifestne bolesti životinja.

2. HIPOTEZA

Profesionalno izložene osobe u endemskom južnom dijelu Istre prokuženije su bakterijom *C. burnetii* u odnosu na profesionalno izložene osobe u sjevernom dijelu Istre.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ:

Istražiti dinamiku prokuživanja *C. burnetii* u profesionalno izloženih osoba u sjevernom i južnom dijelu Istarske županije tijekom dvije uzastopne godine.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Utvrditi međuzavisnost pojavnosti infekcije koksijelom u ljudi, ovisno o prokuženosti, te prisutnosti klinički manifestne bolesti u životinja u kontaktu.
2. Usporediti serološki status ispitanika u endemskom južnom dijelu Istre u odnosu na ispitanike sjevernog dijela Istarske županije.
3. Utvrditi dinamiku prokuživanja ispitanika u endemskom južnom dijelu u odnosu na sjeverni dio Istre.
4. Utvrditi učestalost rizičnih čimbenika za prokuženost koksijelom među ispitanicima.
5. Usporediti učestalost rizičnih čimbenika za ispitanike u endemskom, južnom dijelu u odnosu na sjeverni dio Istre.
6. Utvrditi stopu eventualne reinfekcije.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici i dizajn istraživanja

Ovim seroepidemiološkim istraživanjem koje je provedeno na području Istarske županije u razdoblju od svibnja 2014. do srpnja 2016. godine, početno je bilo obuhvaćeno 171 osoba. Tijekom navedenog razdoblja, 13 ispitanika je odustalo zbog osobnih razloga, dok ih je dvoje umrlo. U konačnici, podaci 156 ispitanika bili su uključeni u statističku analizu.

Ispitanici su bile osobe starije od 18 godina koje dolaze u kontakt s ovcima i/ili kozama na farmama i individualnim gospodarstvima te su u većem riziku od obolijevanja od Q-groznice u odnosu na opću populaciju. Izabrani su na temelju popisa uzgajivača ovaca i koza s područja Istarske županije i njihove suglasnosti za sudjelovanje u istraživanju. Također su kao ispitanici uključeni i doktori veterinarske medicine koji su potpisali pristanak za ovo istraživanje.

Epidemiološka metoda primjenjena u ovom istraživanju predstavlja kombinaciju prospektivnog (istraživanje počinje u sadašnjosti i prati zdrave ispitanike tijekom 2 godine i 2 mjeseca) i retrospektivnog kohortnog istraživanja (postoje podaci o izloženosti osoba u ispitivanju među zdravim ispitanicima koji su ušli u istraživanje). Radi se o zatvorenoj kohorti, u kojoj nema ulazaka novih ispitanika.

Osim toga, ovo istraživanje ima elemente ugniježđenog istraživanja slučajeva i kontrola (*nested case-control study*) jer se ispituje učinak više rizičnih čimbenika na nastanak infekcije, a novodijagnosticirani slučajevi bolesti prikazuju se kao slučajevi, dok se kontrole odabiru među onim ispitanicima kod kojih se nije pojavila bolest.

Kohorta od 156 zdravih ispitanika je prema intenzitetu izloženosti domaćim životinjama (ovce, koze) podijeljena u dvije skupine: visoko rizična profesionalna izloženost i izloženost koja nije profesionalna.

Pojam „visoko rizična profesionalna izloženost“ označava cjelodnevnu dugotrajnu izloženost domaćim životinjama, osobito ovcima i kozama koje žive u velikim stadima, zatim rizični zahvati na životinjama, a posebno prisustvovanje okotu ili pobačaju.

U prvoj skupini ispitanika bilo je 96 profesionalno izloženih osoba (veterinari, veterinarski tehničari, uzgajivači stoke), kojima je to osnovno zanimanje, a u drugoj skupini 60 ispitanika. Drugu skupinu ispitanika činile su osobe koje su u svom malom seoskom domaćinstvu imale nekoliko koza i/ili ovaca, a njihova zanimanja nisu bila rizična za Q-

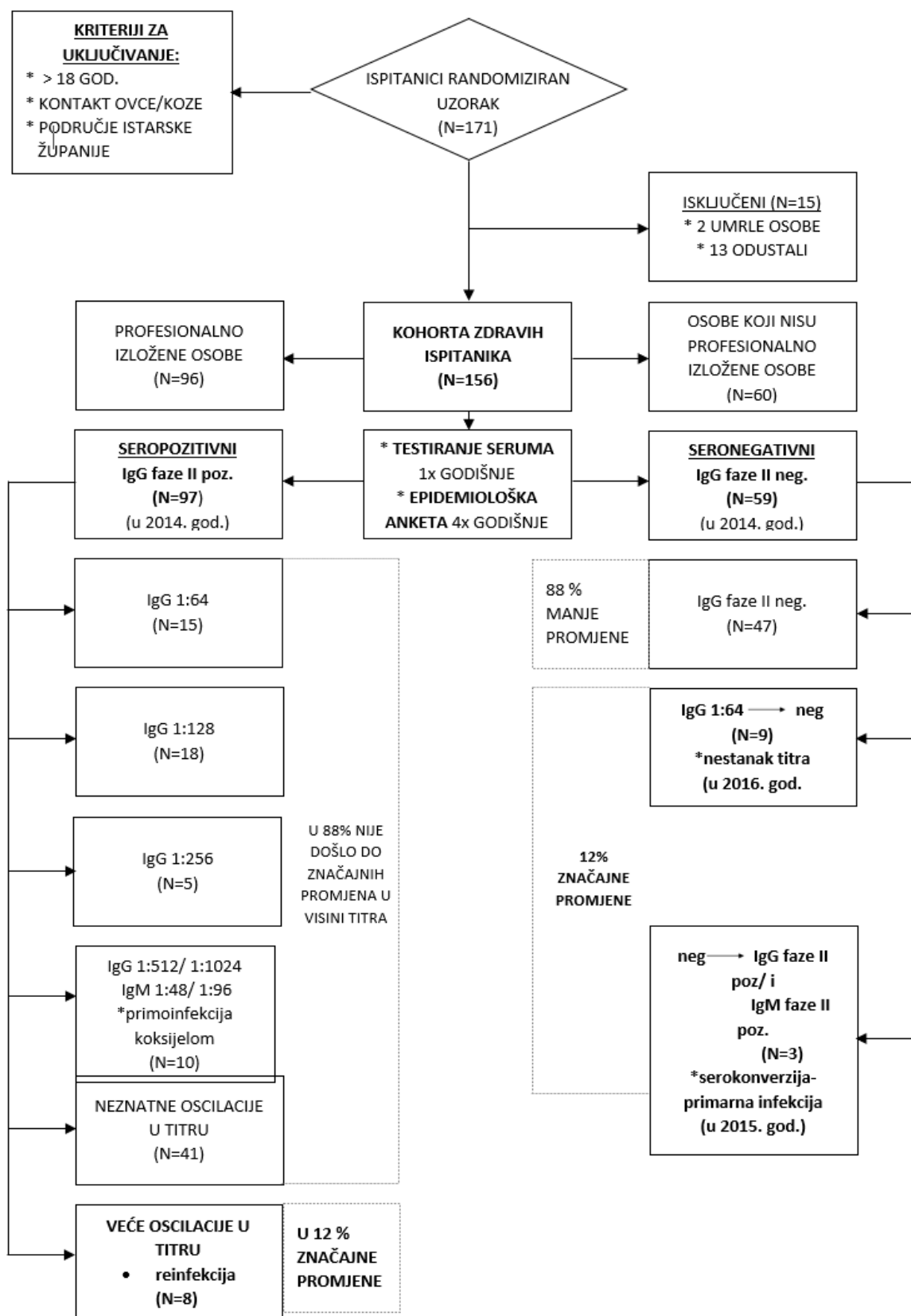
groznicu (trgovci, konobari i sl.), ili su bili umirovljenici i domaćice, te je time njihova izloženost bila znatno manja.

Ispitanici su također podjeljeni u dvije skupine s obzirom na mjesto prebivališta (južni ili sjeverni dio Istarske županije) kako bi se moglo usporediti postoje li značajnije razlike u prokuženosti koksijelom između ispitanika u endemskom južnom dijelu Istre u odnosu na sjeverni dio Istre.

Svi ispitanici su tijekom razdoblja od dvije godine i dva mjeseca praćeni na isti način. Na početku istraživanja utvrđen im je početni imunološki status testiranjem na prisutnost protutijela na *C. burnetii* serološkom metodom indirektne imunofluorescencije (IFA). U seronegativnih osoba praćen je serološki status i klinička pojavnost eventualne infekcije koksijelom (testiranje seruma jednom godišnje i ispunjavanje ankete s ciljanim pitanjima za određene zdravstvene tegobe karakteristične za primoinfekciju koksijelom četiri puta godišnje). Također je praćen serološki status i u onih ispitanika kod kojih je na početku istraživanja utvrđen pozitivan imunosni odgovor na infekciju *C. burnetii*, tj. kod prethodno prokuženih, kako bi se dobio uvid u eventualnu dinamiku prokuživanja bakterijom *C. burnetii*.

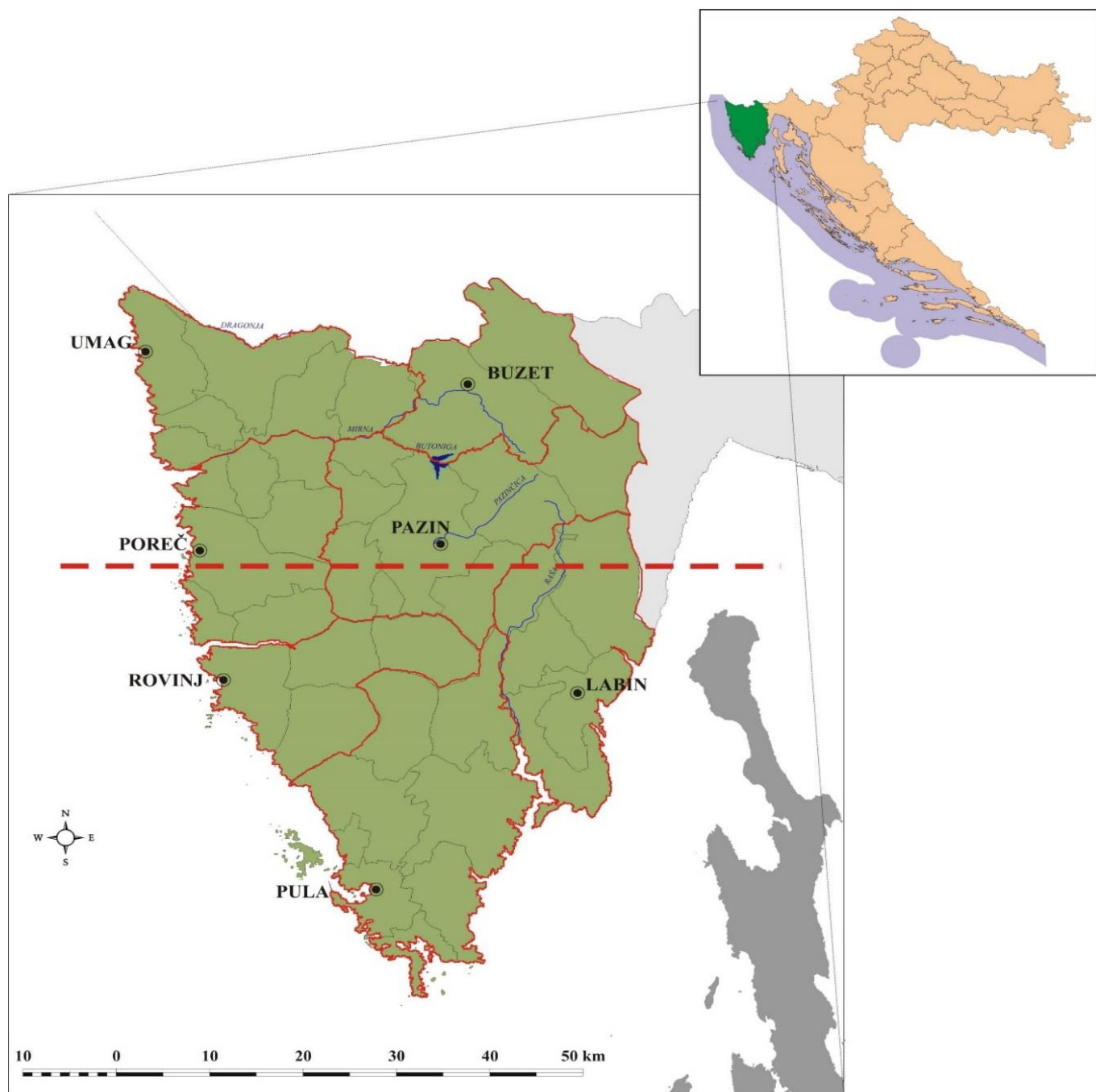
Na taj način mogli smo otkriti prošle infekcije, primoinfekcije te reinfekcije uz podatke o simptomatskoj ili asimptomatskoj pojavi infekcije. Pokazatelj prošle infekcije bio je titar protutijela IgG ≥ 64 uz neg IgM, za primoinfekciju visok IgM uz prisutne simptome infekcije te negativan IgG, a za reinfekciju ponovna pojava visokog titra IgG protutijela uz negativan IgM. Ispitanici s titrom protutijela IgG za fazu II *C. burnetii* ≥ 64 smatrani su seropozitivnim, tj. prokuženim osobama. U bolesnika s dokazanom infekcijom koji su zatražili liječničku pomoć ili su bili bolnički liječeni, analizirani su podaci iz njihove medicinske dokumentacije.

Samo prethodno seronegativne osobe, koje su u tijeku praćenja razvile pozitivan titar protutijela (serokonverzija), odnosno dijagnostički značajan (četverostruki ili veći) porast titra na *C. burnetii*, te one koje su uz prisutnost IgG protutijela imale i značajan titar IgM protutijela kao i one s dokazanom reinfekcijom, smatrane su novoinficiranim osobama. U tih osoba smo na osnovu serološkog nalaza i epidemioloških podataka mogli donijeti ispravan zaključak radi li se o primoinfekciji koksijelom koja se mogla manifestirati kao akutna bolest ili kao asimptomatska infekcija. One osobe koje su na početku istraživanja imale IgG protutijela na koksijelu nisu uzete u računanje kumulativne incidencije, jer se kod njih radilo o ranije prisutnoj infekciji. Hodogram istraživanja dinamike prokuženosti bakterijom *C. burnetii* u ispitanika na području Istarske županije prikazuje Slika 4.1.



Slika 4.1 Hodogram istraživanja dinamike prokuženosti bakterijom *C. burnetii* u ispitanika na području Istarske županije u razdoblju od svibnja 2014. do srpnja 2016. godine

Na karti Istre prikazana je crvena isprekidana linija koja prolazi kroz selo Trošti i dijeli istarski poluotok na gornji, sjeverni i donji, južni dio (Slika 4.2).



Slika 4.2 Karta Istre s istaknutom crvenom linijom koja prolazi kroz središte Istre (selo Trošti) <http://izletipoistri.com/2009/06/22/srediste-istre>

4.1.1. Etička suglasnost

Svi ispitanici su, nakon što su detaljno upoznati s okolnostima i svrhom istraživanja, potpisali informirani pristanak da svojevrijedno prihvaćaju sudjelovanje u ovom istraživanju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije u Puli i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.1.2. Epidemiološka anketa za ispitanike

Usporedno sa serološkim ispitivanjima obavili smo i epidemiološko ispitivanje pomoću ankete kojom smo od ispitanika prikupili podatke o dobi, spolu, zanimanju, mjestu boravka, navikama, vrsti i trajanju moguće izloženosti, prethodno preboljeloj upali pluća ili kroničnim bolestima povezanim s većim rizikom od nastanka komplikacija kod Q-groznice.

Drugom anketom s ciljanim pitanjima o eventualnim zdravstvenim smetnjama ispitanika koje su karakteristične za Q-groznicu mogli smo prospektivno pratiti njihovo zdravstveno stanje tijekom navedenog razdoblja i usporediti njihove simptome koji su odgovarali infekciji koksijelom s pozitivnim serološkim nalazom.

4.1.3. Serološko testiranje ispitanika

Za određivanje prisutnosti specifičnih protutijela IgG faze II *C. burnetii* u serumu osoba koristili smo metodu IFA (Vircell Microbiologist *Coxiella burnetii* II IgG/IgM, Granada, Španjolska). Osjetljivost korištenog IFA testa bila je 100% za IgG i IgM protutijela, a specifičnost 98,1% za IgG protutijela i 97,6% za IgM protutijela.

Svakom ispitaniku uzeli smo natašte uzorak od 5 mL krvi iz kubitalne vene. Uzeta krv stajala je 2-3 sata pri sobnoj temperaturi, a zatim smo je centrifugirali pri 3000 okretaja/min u trajanju od deset minuta. Serume smo izdvojili u drugu plastičnu epruvetu i spremili u ledenicu na -20°C do serološkog testiranja.

Prikupljene uzorke poslali smo u Odjel za virološku serologiju, Odjela za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu zbog određivanja specifičnih protutijela na bakteriju *C. burnetii* referentnom serološkom metodom (IFA).

U tri mjerenja kroz dvije uzastopne godine, dobili smo uvid u serološki status ispitanika, ali i u dinamiku prokušivanja bakterijom *C. burnetii*.

4.1.3.1. Primijenjena serološka metoda

IFA je serološka metoda izbora za dijagnozu akutne i kronične Q-groznice. Za dokaz specifičnih protutijela u ljudi korišten je IFA test proizvođača Vircell (Granada, Španjolska). Izvodi se na način da se na stakalca, čija polja su presvučena antigenom *C. burnetii* faze II, Nine Mile soj (ATTC 616-VR), stavi 20 µL razrijeđenog seruma te pozitivna i negativna kontrola koje se ne razrjeđuju. Svaki se uzorak seruma razrjeđuje u dvostrukim serijskim razrjeđenjima od 1:64 do 1:128. Stakalce se inkubira u vlažnoj komori 30 minuta na 37°C, a zatim ispiri dva puta u fosfatnom puferu (PBS) te se uroni kratko u kadicu s destiliranom vodom. Stakalca se osuše na zraku, a zatim se stavi 20 µL konjugata (Vircell anti-humani IgG -FITC konjugat obilježen fluoresceinom) u sva polja, i nakon toga inkubiraju u vlažnoj komori 30 minuta na 37°C na tamnom mjestu. Slijedi ispiranje dva puta po 10 minuta u PBS-u i jedanput u destiliranoj vodi te sušenje na zraku. Ukapa se medij za mikroskopiranje, stavi pokrovnica te se očitava pomoću fluorescentnog mikroskopa kod povećanja od 400 puta. Ukoliko je test bio pozitivan u početnim razrjeđenjima, napravljena su serijska razrjeđenja do 1:2048. Kod pozitivne reakcije vide se zeleni fluorescentni kokobacili, dok kod negativne reakcije nema fluorescencije, već se vide samo crvene, sitnije stanice (Slika 5.3. i 5.4.).

Titar je očitao kao recipročna vrijednost najvećeg razrjeđenja seruma u kojem je bila vidljiva fluorescencija. Budući da prisutnost reumatoidnog faktora u krvi može dovesti do lažno pozitivnog IgM rezultata, a visoka razina protutijela IgG do lažno negativnog IgM rezultata, prije određivanja IgM protutijela učinjena je apsorpcija pomoću anti-IgG protutijela (apsorbens) (13).

4.1.3.2. Tumačenje seroloških rezultata

IgM neg, IgG neg	nema infekcije, inkubacija ili prodromalni stadij
IgM poz, IgG neg	moguća akutna infekcija
IgM poz, IgG poz	akutna infekcija
IgM neg, IgG visoko poz	kasna rekonvalescencija, moguća reinfekcija
IgM neg, IgG nisko poz	ranija infekcija, prokuženost

4.2. Životinje (ovce, koze)

Istovremeno s obavještanjem i educiranjem ispitanika o Q-groznici, načinima prijenosa te mjerama zaštite, započeli smo prikupljati i uzorke krvi ovaca i koza s različitih područja Istarske županije, uglavnom s područja odakle su bili i ispitanici.

Seroepidemiološko presječno istraživanje (*cross-sectional study*) za ovce i koze na području Istarske županije provedeno je u dvije etape. Prva etapa je bila u razdoblju od svibnja 2013. godine do travnja 2014. godine, a druga od siječnja do prosinca 2015. godine.

Za serološko testiranje životinja korišten je indirektni ELISA test.

4.2.1. Etička načela za životinje

Prilikom uzimanja uzoraka krvi od slučajno odabranih životinja (ovce i koze), pridržavali smo se etičkih načela Zakona o dobrobiti životinja. (NN 19/99).

4.2.2. Epidemiološka anketa za vlasnike životinja

Pomoću ankete za vlasnike ispitivanih životinja utvrdili smo dob i pasminu ovaca, odnosno koza, njihovo podrijetlo i zdravstveno stanje te eventualne reproduktivne smetnje (spontani pobačaj, deformirano potomstvo), zatim broj ušne markice, podatke o vlasniku te podatke o higijenskim uvjetima na farmi. Niti jedna životinja nije bila cijepljena protiv Q-groznice, što je bilo za očekivati.

S obzirom na veličinu stada, ovce i koze smo podijelili u tri skupine: malo stado (<100 životinja), srednje stado (101-200 životinja) i veliko stado (>200 životinja), a s obzirom na dob u tri kategorije: 1-2 godine, 3-6 godina, > 6 godina. Na temelju vizualnog dojma i ovisno o higijenskim mjerama koje su se provodile na farmama, higijenski uvjeti na farmi podijeljeni su na loše, dobre i vrlo dobre uvjete.

Imali smo uvid i u podatke Hrvatske poljoprivredne agencije, kao i podatke Hrvatskog veterinarskog instituta o izvršenim obveznim serološkim pretragama krvi ovaca i koza ukoliko je došlo do bolesti među životinjama ili pobačaja na određenim farmama u Istarskoj županiji koje smo uključili u ovo istraživanje.

4.2.3. Serološko testiranje životinja

Uzorci krvi uzeti su od slučajno odabranih životinja istovremeno s rutinskim uzimanjem krvi na brucelozu kod ovaca i koza starijih od godine dana. Približno se od svake desete životinje u stadu uzimao uzorak krvi. Venepunkciju su provodili veterinari na terenu. Krv je uzeta iz jugularne vene i nakon toga centrifugirana pri 3000 okretaja/min. kroz deset

minuta. Serume smo odvojili i zaledili na -20°C do serološkog testiranja. Prikupljene uzorke krvi poslali smo u Veterinarski institut u Udine, Italija (Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie-Sezione di Udine, Italia) na serološko testiranje.

Prisutnost specifičnih protutijela protiv *C. burnetii* antigene faze I i II utvrđena je ELISA testom. Rezultati su izraženi kao omjer optičke gustoće uzorka krvi i pozitivne kontrole (S/P). Za svaki uzorak krvi, S/P je izračunat korištenjem formule:

$$S/P = \frac{(OD\ s - OD\ nc)}{(OD\ pc - OD\ nc)} \times 100$$

(OD s je optička gustoća uzorka na dvostrukoj valnoj duljini 450-620 nm, OD pc je optička gustoća pozitivne kontrole, a OD nc je optička gustoća negativne kontrole)

U životinja u kojih smo našli pozitivan nalaz na bakteriju *C. burnetii* u prvoj etapi istraživanja, ponovili smo vađenje krvi nakon 20 mjeseci (druga etapa istraživanja), te istom serološkom metodom utvrdili eventualne promjene u titru protutijela protiv *C. burnetii*. S/P vrijednosti >40 smatrane su pozitivnim nalazom.

4.2.3.1. Primijenjena serološka metoda

ELISA test proizvođača LSIVet Ruminant Q Fever-serum/Milk, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA korišten je za dokaz protutijela u životinja.

Pretraga se izvodi u mikrotitarskim pločama s 96 udubina. Uzorci se dodaju u udubinu mikrotitarske ploče koje su obložene antigenom. Ako je u uzorku prisutno specifično protutijelo, ono će se vezati na antigen i formirati antigen-protutijelo kompleks. Nakon ispiranja, dodaje se konjugat označen enzimom. Poslije drugog ispiranja, dodaje se kromogeni supstrat. Pojava boje u indirektnom ELISA testu označava pozitivnu reakciju. Intenzitet boje je proporcionalan količini specifičnih protutijela u uzorku. Nastale reakcije očitavaju se pomoću spektrofotometra pri valnoj dužini 450/620 nm.

4.2.3.2. Tumačenje seroloških rezultata

Za izračunavanje titra protutijela vrijednost S/P se pomnožila s brojem 100 (titar protutijela = S/P x 100). Titar protutijela veći od 40 smatrao se pozitivnim nalazom.

Jačina reakcije ELISA serološke metode: 1. titar 40-100 (pozitivan +)

2. titar 101-200 (pozitivan ++)

3. titar 201-300 (pozitivan +++)

4. titar > 300 (pozitivan ++++).

4.3. Statistička analiza podataka

Za pripremu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički.

Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su u skladu s dobivenim podacima primijenjeni odgovarajući neparametrijski testovi.

Kategorijske nominalne vrijednosti prikazane su kroz odgovarajuće frekvencije i udjele. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone, a razlike između njih analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom, te prikazane pravokutnim dijagramom unutar kojeg su prikazane vrijednosti medijana, interkvartilnih raspona, minimalnih i maksimalnih vrijednosti te ekstremnih vrijednosti koje se od medijana razlikuju za više od 3 interkvartilna raspona.

Multivarijatni model predikcije pripadnosti skupini sa seropozitivnim nalazom prikazan je binarnom logističkom regresijom.

Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su χ^2 testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom u slučajevima kada je u analizi bilo manje od 10 ispitanika/slučajeva. Kada su tablice bile veće od formata 2x2 onda se umjesto Fisherovog egzaktnog testa koristio Fisher-Freeman-Haltonov test.

Za testiranje hipoteze i ciljeva koristila se binarna logistička regresija kojom su se izračunali standardizirani omjeri izgleda (OR) s pripadajućim 95% intervalima pouzdanosti (CI). P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnima.

U statističkoj analizi korištena je podrška programa IBM SPSS Statistics, verzija 25.0, licenciranog pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu:

<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>

5. REZULTATI

5.1. Ispitanici

5.1.1. Analiza demografskih podataka ispitanika

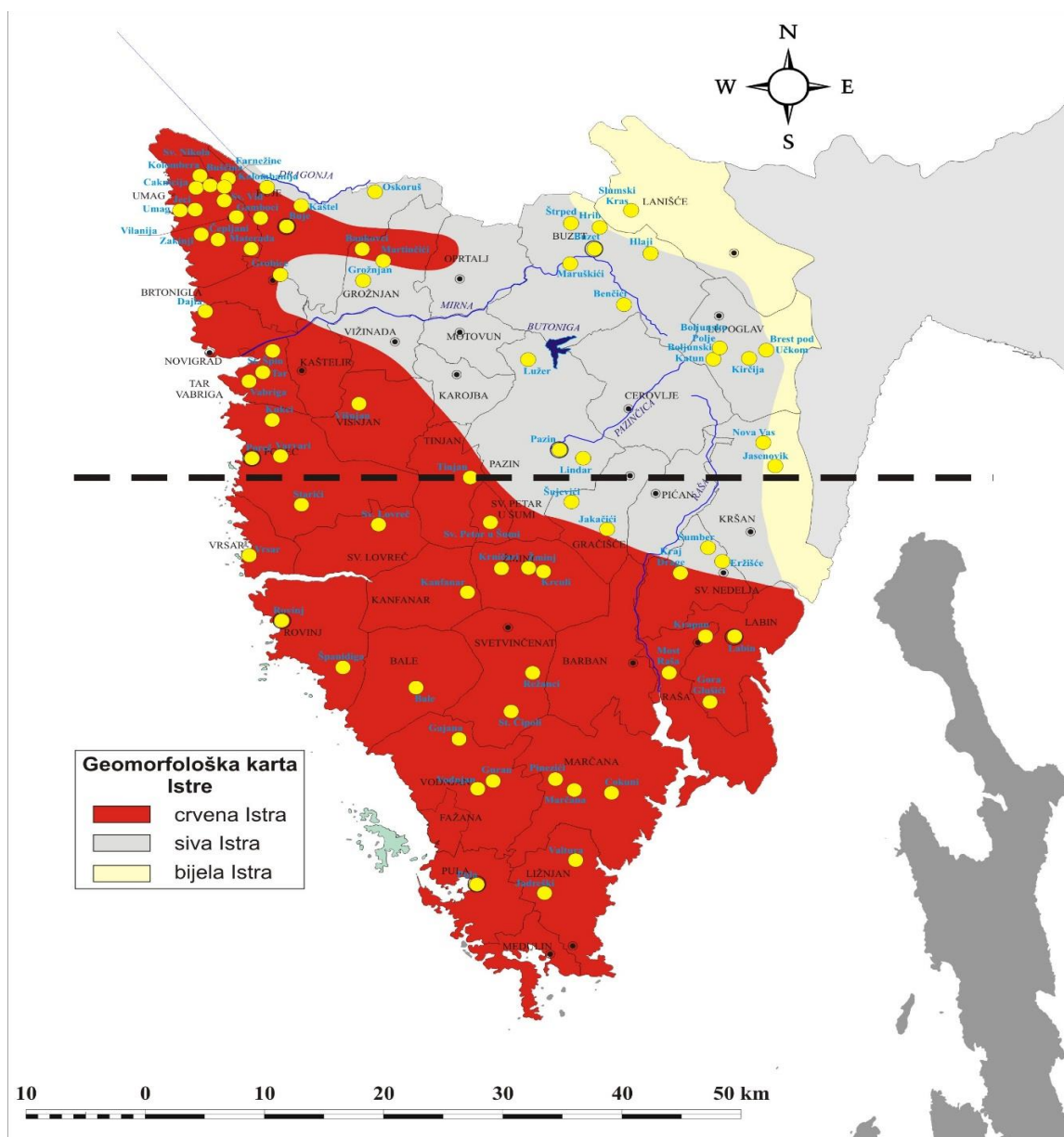
Ispitanicima se jednom godišnje u razdoblju od svibnja 2014. do srpnja 2016. godine, uzimao uzorak krvi i testirao na prisutnost protutijela na bakteriju *C. burnetii*.

Na karti Istre su žutim kružićima označena mjesta uzorkovanja krvi kod ispitanika, geomorfološka područja koja obuhvaćaju Crvenu, Sivu i Bijelu Istru te linija koja dijeli istarski poluotok na južni i sjeverni dio (Slika 5.1).

Na južnom dijelu Istarske županije bilo je ukupno 59 (37,8%) ispitanika (67,8% muški spol i 32,2% ženski spol), a na sjevernom dijelu 97 (62,2%) ispitanika (60,8% muški spol, 39,2% ženski spol). Više ispitanika bilo je iz ruralne sredine 126 (80,8%) i oni su bili skoro podjednako zastupljeni u obje promatrane regije (na južnom dijelu Istarske županije bilo ih je 83,1%, a na sjevernom 79,4%) (Tablica 5.1 i 5.2).

Ispitanici muškog spola bili su zastupljeniji u ovom istraživanju (99 osoba muškog i 57 osoba ženskog spola). Najviše ih je bilo u dobnoj skupini od 38 do 60 godine. Najmlađi ispitanik imao je 18 godina, a najstariji 80 godina života. Nije bilo značajnijih razlika u dobi s obzirom na promatrane regije (Slika 5.2). S obzirom na broj godina provedenih na farmi, 82 (52,6%) ispitanika je bilo manje od 20 godina na farmi, a 74 (47,4%) više od 20 godina. Ispitanici mlađi od 50 godina, kao i oni stariji od 50 godina bili su u ovom istraživanju skoro podjednako zastupljeni (Tablica 5.1).

S obzirom na profesionalnu izloženost, odnosno na njihovo osnovno zanimanje, 96 (61,5%) ispitanika je bilo u pravom smislu profesionalno izloženo domaćim životinjama (doktori veterinarske medicine, veterinarski tehničari, ovčari, kozari, djelatnici u proizvodnji sira), u odnosu na 60 (38,5%) ispitanika koji su na svojim malim seoskim domaćinstvima imali tek nekoliko ovaca i/ili koza. Ta druga skupina ispitanika imala je zanimanje koje nije bilo povezano s rizikom od obolijevanja od Q-groznice ili su bili u mirovini.



* Izvor za kartu: Zavod za javno zdravstvo istarske županije Pula, Služba za zdra vstvenu ekologiju

Slika 5.1 Geomorfološka karta Istre s označenim mjestima uzorkovanja krvi kod ispitanika

Tablica 5.1 Prikaz učestalosti rizičnih čimbenika za prokuženost koksijelom među ispitanicima

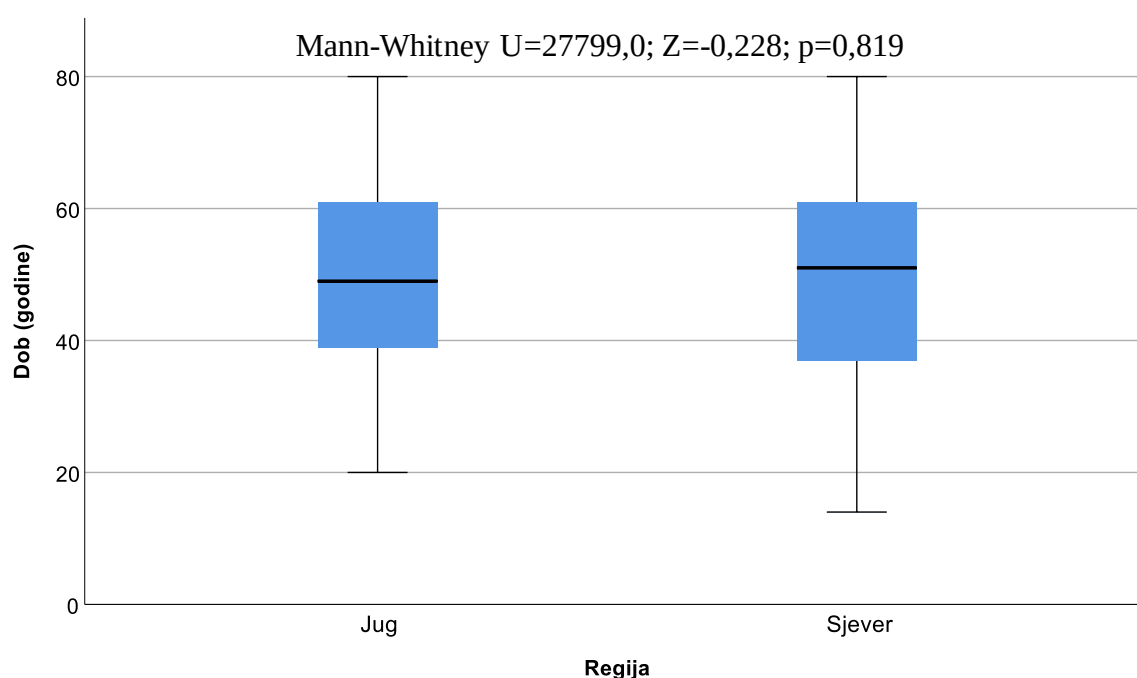
Varijabla	Svojstvo	N	%	95 % CI	
Spol	Muški	99	63,50	55,70	70,70
	Ženski	57	36,50	29,30	44,30
Regija	Jug	59	37,80	30,50	45,60
	Sjever	97	62,20	54,40	69,50
Dob	<50 godina	77	49,36	41,59	57,16
	>50 godina	79	50,64	42,84	58,41
Broj godina provedenih na farmi	<20 godina	82	52,56	44,74	60,29
	>20 godina	74	47,44	39,71	55,26
Profesionalna izloženost	Ne	60	38,50	31,10	46,30
	Da	96	61,50	53,70	68,90
Kontakt: ovce	Ne	35	22,40	16,40	29,40
	Da	121	77,60	70,60	83,60
Kontakt: koze	Ne	88	56,40	48,60	64,00
	Da	68	43,60	36,00	51,40
Konzumacija nepasterizirano mlijeko/ sirevi	Ne	72	46,20	38,50	54,00
	Da	84	53,80	46,00	61,50
Prisustvovanje: janjenje, jarenje	Ne	25	16,00	10,90	22,40
	Da	131	84,00	77,60	89,10
Kontakt: vuna	Ne	20	12,80	8,30	18,70
	Da	136	87,20	81,30	91,70
Kontakt: druga životinja	Ne	24	15,40	10,40	21,70
	Da	132	84,60	78,30	89,60
Kontakt: krpelj	Ne	73	46,80	39,10	54,60
	Da	83	53,20	45,40	60,90
Kronična bolest	Ne	101	64,70	57,00	71,90
	Da	55	35,30	28,10	43,00
Upala pluća	Ne	112	71,80	64,40	78,40
	Da	44	28,20	21,60	35,60
Pušač	Ne	103	66,00	58,40	73,10
	Da	53	34,00	26,90	41,60
Tip naselja	Selo	126	80,80	74,10	86,40
	Grad	30	19,20	13,60	25,90
Prisutnost simptoma infekcije	Ne	64	41,00	33,50	48,90
	Da	92	59,00	51,10	66,50

U Tablici 5.1 prikazani su rizični čimbenici za Q-groznice, kao što su dob i spol ispitanika, regija jug/sjever, broj godina boravka na farmi, kontakt s ovcima i/ili kozama, kontakt s drugim životinjama na farmi (mačke, psi, kunići), prava profesionalna izloženost, konzumacija nepasteriziranog mlijeka i/ili sireva, kontakt s vunom, ugriz krpelja, život u ruralnoj ili urbanoj sredini, prisustvovanje janjenju/jarenju, preboljenje upale pluća, pušenje cigareta te prisutnost neke kronične bolesti. Iako ne predstavlja rizični čimbenik, varijabla *prisutnost simptoma infekcije* je također bila vrlo značajna u procjeni obolijevanja od Q-groznice.

U kontaktu s ovcima bio je 121 ispitanik (77,6%), s kozama 68 (43,6%), dok je 131 ispitanik (84,0%) prisustvovao janjenju i/ili jarenju. U kontaktu s vunom bilo je 87,2 % ispitanika, a također je tako visok postotak zabilježen i u kontaktu s drugim životinjama (pas, mačka, kunić). Ugriz krpelja imalo je 83 ispitanika (53,2%), a nepasterizirano mlijeko i sireve konzumiralo je 84 ispitanika (53,8%).

Kroničnu bolest (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, kronični opstruktivni bronhitis, bronhalna astma, reumatske ili srčane smetnje) imalo je 55 ispitanika (35,3%), a od 156 ispitanika 34% su bili pušači.

Upalu pluća tijekom života preboljelo je 44 ispitanika (28,2%). Simptome koji su bili karakteristični za infekciju koksijelama imalo je 92 ispitanika (59%).



Slika 5.2 Dob ispitanika s obzirom na ispitivane regije: Mann-Whitneyjev U test

5.1.2. Analiza razina IgG u ispitanika

Na početku istraživanja se u 97 (62,2%) ispitanika serološkom metodom IFA utvrdila prisutnost specifičnih protutijela IgG faze II *C. burnetii*, a godinu dana kasnije seropozitivnost je registrirana u 100 (64%) ispitanika. Pri posljednjem serološkom testiranju ukupno je bila 91 (58%) seropozitivna osoba, s obzirom da se u devet osoba zabilježio nestanak protutijela (Tablica 5.2).

Praćenjem dinamike titra protutijela u seropozitivnih osoba tijekom navedenog razdoblja, moglo se vidjeti da u 88% ispitanika nije došlo do značajnijih promjena u visini titra protutijela IgG faze II *C. burnetii*.

Rezidualni titar 64 kroz sva tri mjerenja zabilježen je u 15 osoba, titar 128 kod 18 ispitanika, a trajno povišen titar 256 je imalo pet ispitanika. Porast titra od 64 na 128 i od 128 na 256 imalo je deset ispitanika, a pad titra od 128 na 64 zabilježen je u 26 ispitanika. Kod pet ispitanika se zabilježio neznatčan porast titra, a nakon slijedećeg testiranja uzorka krvi, pad titra.

Također se u deset ispitanika registrirao visok titar IgG faze II (512 i 1024) te su njihovi serum testirani i na IgM protutijela. Titar IgM protutijela (48 i 96) potvrdio je da se u njih radilo o primarnoj infekciji koksijelom, tj. o akutnoj Q-groznicu.

Značajnije promjene registrirane su u devet ispitanika koji su na posljednjem vađenju krvi izgubili svoj rezidualni titar 64 i postali seronegativni, dok je kod troje drugih došlo do značajnijeg porasta titra protutijela IgG faze II *C. burnetii* zbog reinfekcije.

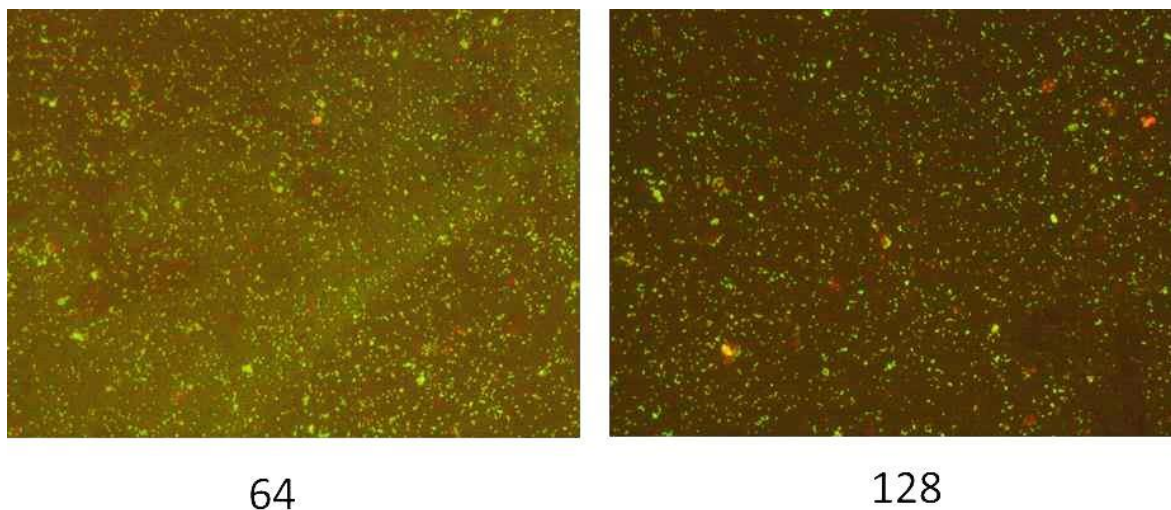
Od 59 (37,8%) seronegativnih osoba na početku istraživanja, kod tri ispitanika je nakon godinu dana došlo do serokonverzije uslijed primarne infekcije koksijelom praćene simptomatologijom karakterističnom za akutnu Q-groznicu.

Epidemiološkim anketiranjem prokuženih osoba analizirali smo 24 seropozitivne osobe koje su bile u kontaktu s ovcima i/ili kozama od rane mladosti, ali nisu imale upalu pluća ili bilo kakve druge simptome koje bismo mogli povezati s Q-groznicom. S obzirom da i tijekom ovog istraživanja te osobe nisu imali promjene u svom zdravstvenom stanju, a i titar protutijela protiv bakterije *C. burnetii* se kretao od graničnog titra do titra od 128, mogli smo zaključiti da je tijekom vremena kod njih došlo najvjerojatnije do asimptomatske serokonverzije. Stopa asimptomatske serokonverzije iznosila je 24,0% (95,0% CI 16,4%-33,0%) (Tablica 5.2).

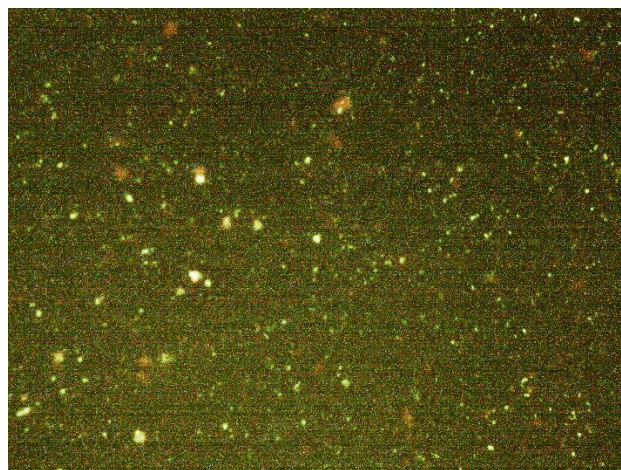
Analizirajući titrove IgG protutijela kod 8 seropozitivnih ispitanika u kojih je uočen značajniji porast IgG titra (od 64 na 512, te od 128 na 1024), moglo se zaključiti da se radi o reinfekciji. Međutim, medicinsku dokumentaciju da su prije više od 10 godina

hospitalizirani zbog Q-groznice, imala su tri ispitanika, tako da je taj značajniji porast IgG titra kod njih bio siguran dokaz da je došlo do ponovne infekcije istim uzročnikom tj. do reinfekcije.

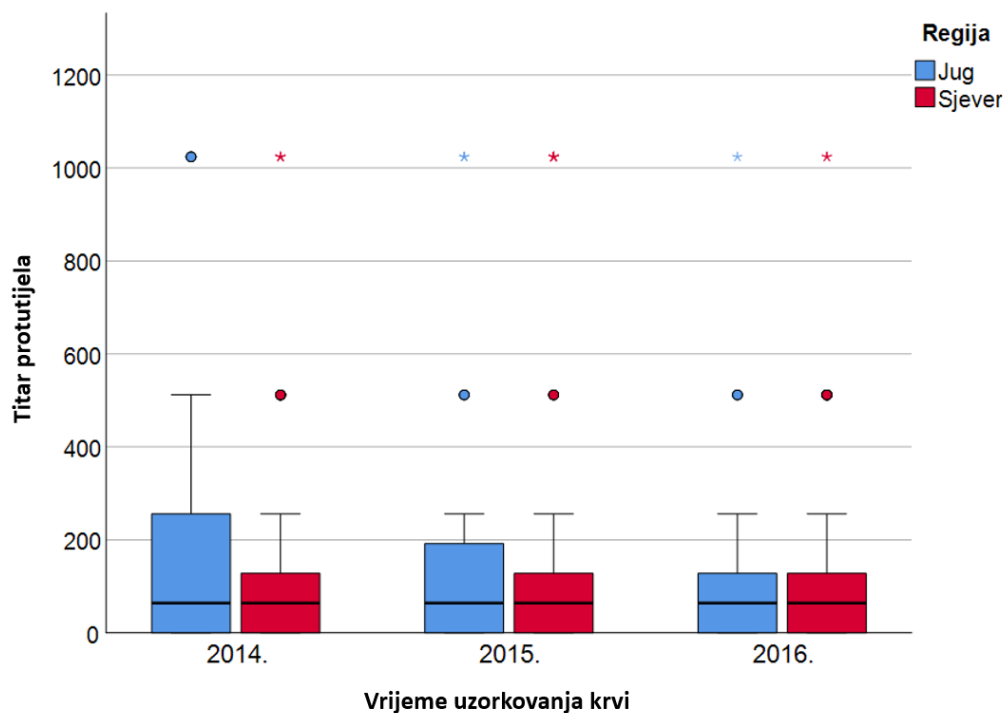
Slika 5.3 pokazuje pozitivan IFA nalaz *C. burnetii* IgG vidljiv imunofluorescentnim mikroskopom kod razrjeđenja 1:64 i 1:128, a Slika 5.4. negativan nalaz (IFA).



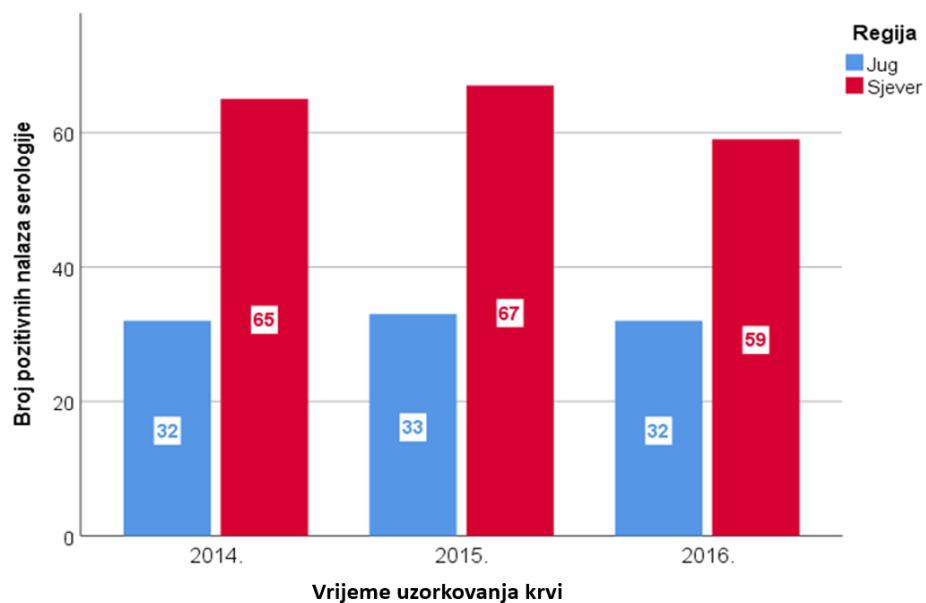
Slika 5.3 *Coxiella burnetii*, pozitivan nalaz IgG, titar 64 i 128 (IFA) vidljivo na imunofluorescentnom mikroskopu (vlastito istraživanje)



Slika 5.4 *Coxiella burnetii*, negativan nalaz (IFA) vidljivo na imunofluorescentnom mikroskopu (vlastito istraživanje)



Slika 5.5 Dinamika seroloških nalaza između pojedinih vremena uzorkovanja krvi s obzirom na ispitivane regije



Slika 5.6 Broj pozitivnih seroloških nalaza s obzirom na vrijeme uzimanja uzoraka krvi i regiju

Tablica 5.2 Prikaz učestalosti pojedinih seroloških nalaza među ispitanicima: *Fisherov egzaktni test*

		N	%	95% CI	
Pozitivna serologija IFA IgG	Ne	59	37,82	30,49	45,60
2014.	Da	97	62,18	54,40	69,51
Pozitivna serologija IFA IgG	Ne	56	35,90	28,68	43,63
2015.	Da	100	64,10	56,37	71,32
Pozitivna serologija IFA IgG	Ne	65	41,67	34,14	49,50
2016.	Da	91	58,33	50,50	65,86
Pozitivna serologija IFA IgG	Ne	56	35,90	28,68	43,63
ukupno	Da	100	64,10	56,37	71,32
Značajan porast IFA IgM	Ne	90	90,00	82,99	94,74
	Da	10	10,00	5,26	17,01
Serološki status	Bez promjena	88	88,00	80,60	93,30
	Reinfekcija	3	3,00	0,90	7,80
	Nestanak titra	9	9,00	4,50	15,80
Asimptomatska serokonverzija *	Ne	76	76,00	67,00	83,60
	Da	24	24,00	16,40	33,00

* s obzirom na ukupan broj seropozitivnih nalaza

Serološke vrijednosti za sva tri mjerenja tijekom navedenog razdoblja bile su gotovo identične i nije bilo značajnijih razlika u učestalosti pozitivnih nalaza između ispitanika u južnom dijelu u odnosu na sjeverni dio Istarske županije (IFA IgG 2014. god. $p=0,127$; 2015.god. $p=0,122$; 2016.god. $p=0,503$; pozitivna serologija ukupno, $p=0,122$; Fisherov egzaktni test) (Tablica 5.2). Dinamika titra između pojedinih vremena mjerenja s obzirom na ispitivane regije prikazana je na Slici 5.5, a broj seropozitivnih ispitanika s obzirom na vrijeme uzimanja uzoraka krvi i regiju Slikom 5.6.

U Tablici 5.3 prikazane su razlike u dinamici prokuživanja i serološkom statusu ispitanika u endemskom južnom dijelu u odnosu na sjeverni dio Istre. Također su prikazane razlike u učestalosti rizičnih čimbenika između južnog dijela u odnosu na sjeverni dio Istre.

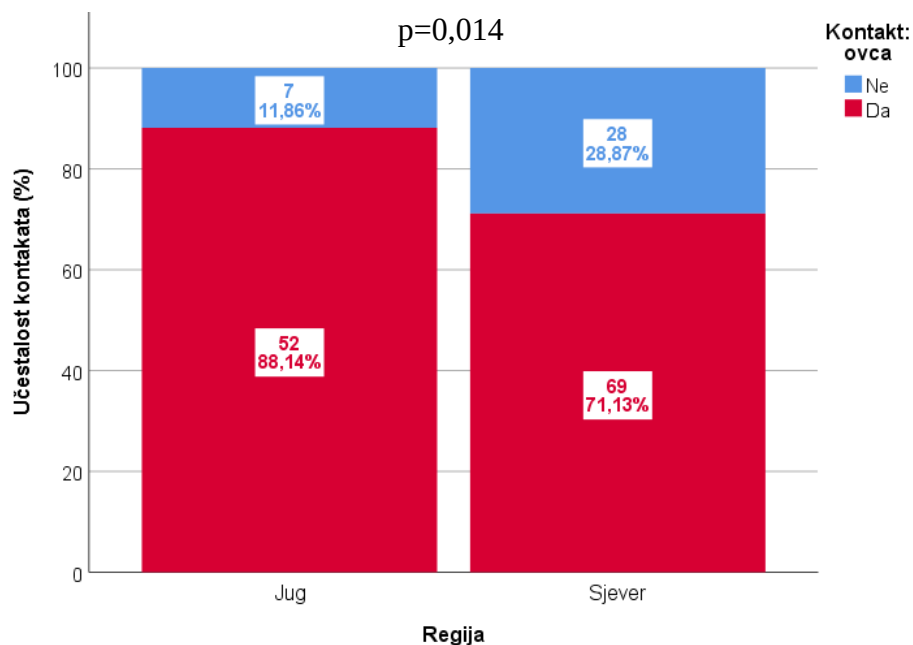
Na sjevernom dijelu Istre ispitanici su bili prokuženiji u odnosu na ispitanike s južnog dijela (69,1% : 55,9%), no razlika se nije pokazala statistički značajnom ($p=0,0097$). Time je opovrgnuta polazna hipoteza ovog istraživanja.

Od rizičnih čimbenika na jugu značajnije je bio zastupljen kontakt ispitanika s ovčama u 88,1%; $p=0,014$, prisustvovanje janjenju i/ili jarenju u 91,5%; $p=0,045$ te kontakt s vunom u 94,9%; $p=0,024$. Oni rizični čimbenici koji su bili statistički značajni s obzirom na pripadnost regiji (sjever/jug) posebno su još prikazani stupičastim dijagramom (Slike 5.7- 5.9).

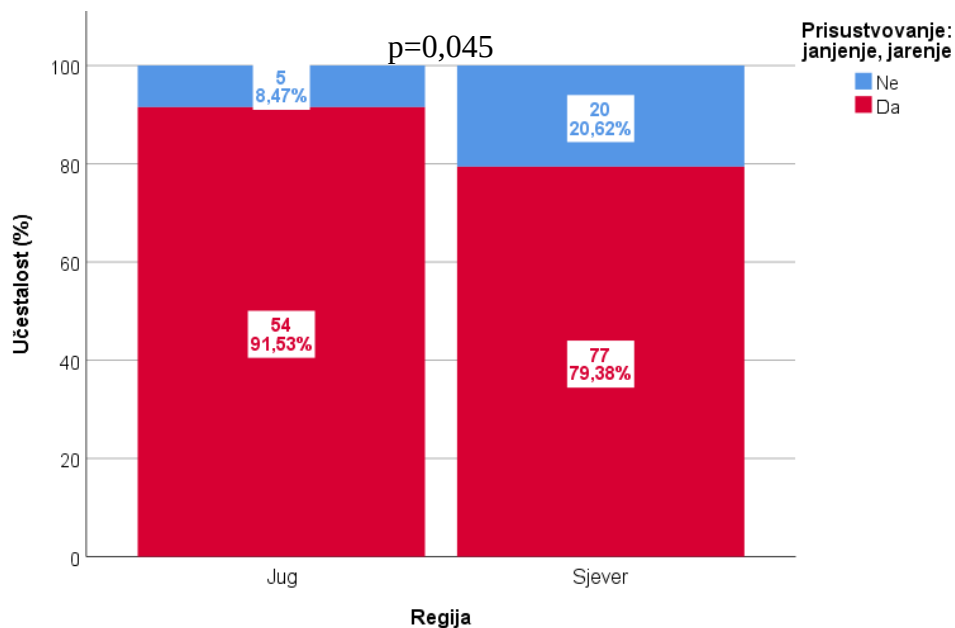
Tablica 5.3 Razlike u učestalosti rizičnih čimbenika, dinamici prokuživanja i serološkom statusu u endemskom južnom dijelu u odnosu na sjeverni dio Istre: X² test ili Fisherov egzaktni test

Varijabla	Svojstvo	Regija				p
		Jug		Sjever		
		N	%	N	%	
Dobna skupina	<50 godina	31	52,50	46	47,40	0,535
	>50 godina	28	47,50	51	52,60	
Spol	Muški	40	67,80	59	60,80	0,381
	Ženski	19	32,20	38	39,20	
Profesionalna izloženost	Ne	21	35,60	39	40,20	0,566
	Da	38	64,40	58	59,80	
Broj godina na farmi	<20 godina	29	49,20	53	54,60	0,506
	>20 godina	30	50,80	44	45,40	
Kontakt: ovca	Ne	7	11,90	28	28,90	0,014
	Da	52	88,1	69	71,10	
Kontakt: koza	Ne	36	61,00	52	53,60	0,365
	Da	23	39,00	45	46,40	
Kontakt: nepasterizirano mlijeko	Ne	23	39,00	49	50,50	0,161
	Da	36	61,00	48	49,50	
Prisustvovanje: janjenje, jarenje	Ne	5	8,50	20	20,60	0,045
	Da	54	91,50	77	79,40	
Kontakt: vuna	Ne	3	5,10	17	17,50	0,024
	Da	56	94,90	80	82,50	
Kontakt: druga životinja	Ne	7	11,90	17	17,50	0,342
	Da	52	88,10	80	82,50	
Kontakt: krpelj	Ne	23	39,00	50	51,50	0,127
	Da	36	61,00	47	48,50	
Kronična bolest	Ne	36	61,00	65	67,00	0,441
	Da	23	39,00	32	33,00	
Upala pluća	Ne	39	66,10	73	75,30	0,218
	Da	20	33,90	24	24,70	
Pušač	Ne	38	64,40	65	67,00	0,739
	Da	21	35,60	32	33,00	
Pozitivna serologija 2014.	Ne	27	45,80	32	33,00	0,111
	Da	32	54,20	65	67,00	
Pozitivna serologija 2015.	Ne	26	44,10	30	30,90	0,097
	Da	33	55,90	67	69,10	
Pozitivna serologija 2016.	Ne	27	45,80	38	39,20	0,418
	Da	32	54,20	59	60,80	
Pozitivna serologija ukupno	Ne	26	44,10	30	30,90	0,097
	Da	33	55,90	67	69,10	
Značajan porast IFA IgM	Ne	29	87,90	61	91,00	0,620
	Da	4	12,10	6	9,00	
Tip naselja	Selo	49	83,10	77	79,40	0,573
	Grad	10	16,90	20	20,60	
	Ne	24	72,70	52	77,60	
Asiptomatska serokonverzija*	Da	9	27,30	15	22,40	0,591

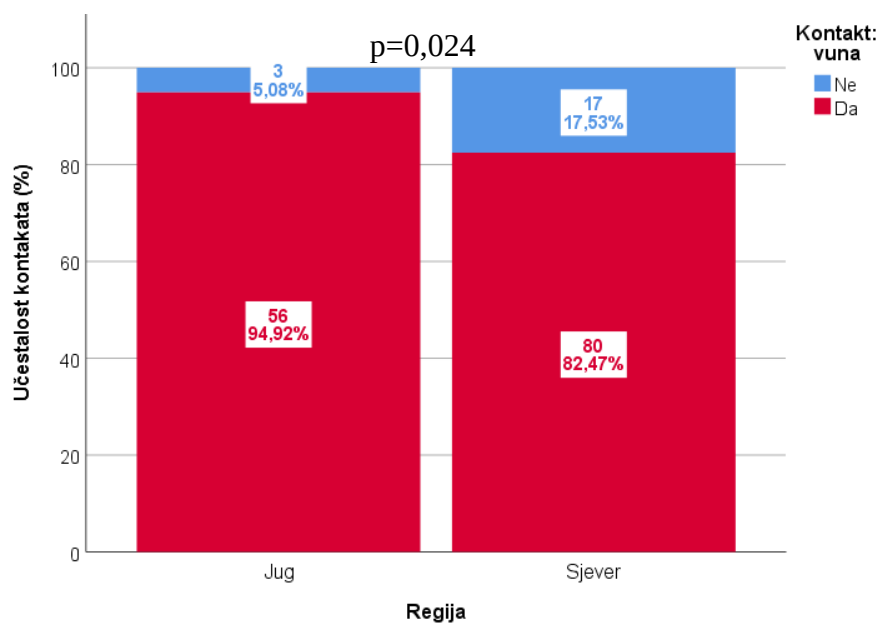
*s obzirom na ukupan broj seropozitivnih nalaza



Slika 5.7 Razlika u učestalosti kontakata ispitanika s ovcima s obzirom na ispitivane regije: *Fisherov egzaktni test*

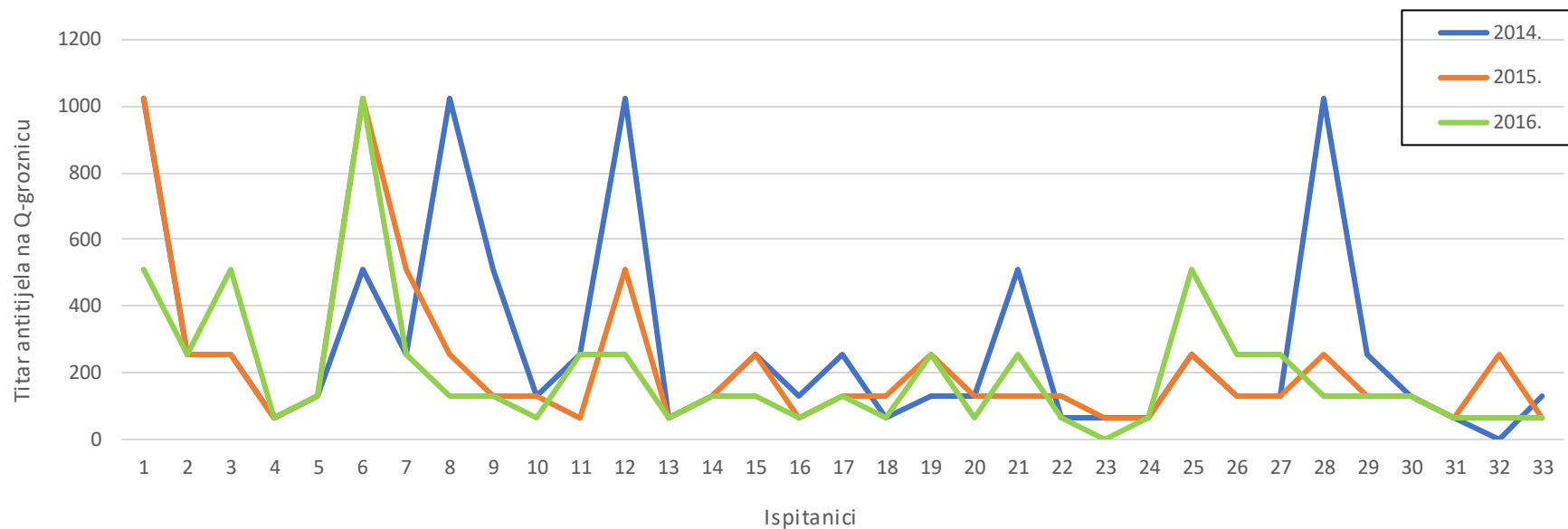


Slika 5.8 Razlika u učestalosti kontakata ispitanika koji su prisustvovali janjenju i/ili jarenju s obzirom na ispitivane regije; *Fisherov egzaktni test*

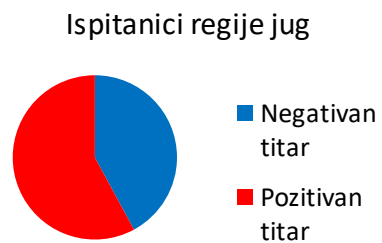


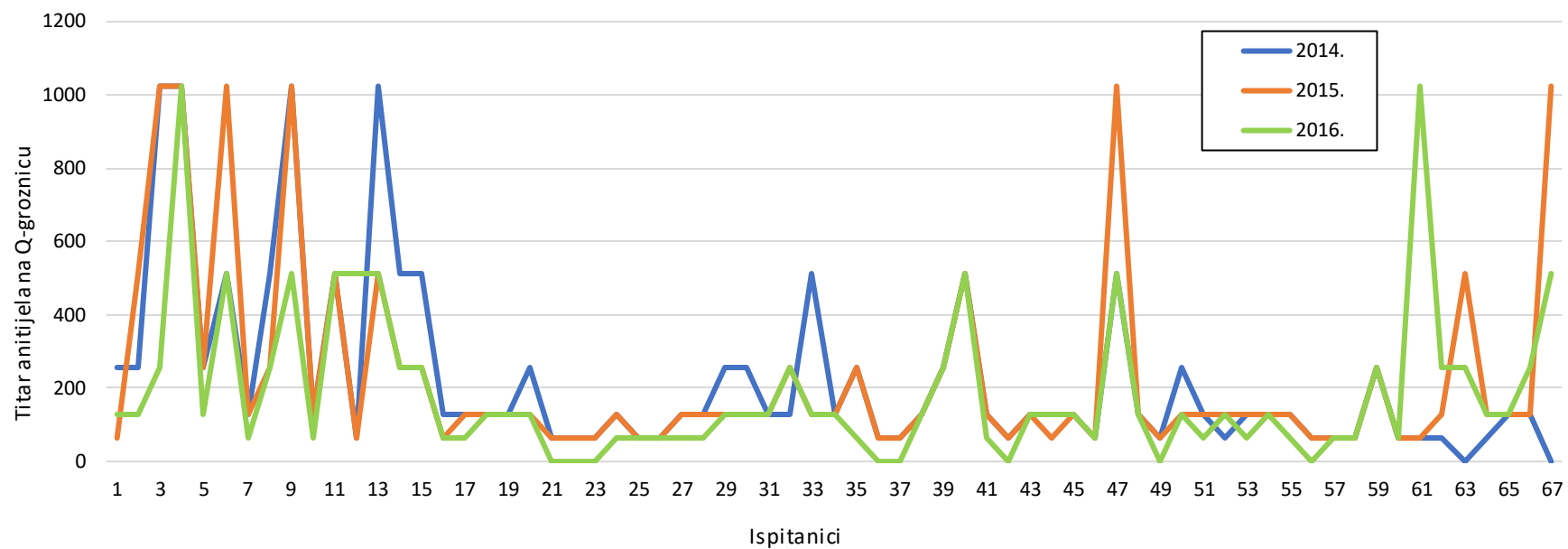
Slika 5.9 Razlika u učestalosti kontakata ispitanika s vunom s obzirom na ispitivane regije; *Fisherov egzaktni test*

Dinamika titra protutijela na *C. burnetii* kod ispitanika na južnom i sjevernom dijelu Istre u razdoblju od 2014. do 2016. godine prikazana je na Slikama 5.10 i 5.11.



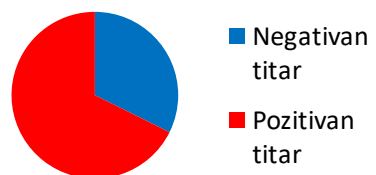
Slika 5.10 Dinamika titra protutijela na Q-groznicu tijekom navedenog razdoblja za ispitanike južnog dijela Istre





Slika 5.11 Dinamika titra protutijela na Q-groznicu tijekom navedenog razdoblja za ispitanike sjevernog dijela Istre

Ispitanici regije sjever



Tablica 5.4 Razlike u dobi ispitanika, broju godina provedenih na farmi te titru protutijela prikazanim kroz kontinuirane numeričke vrijednosti: Mann-Whitneyev U test

Regija		N	Min.	Max.	Centile			p
					25.	Medijan	75.	
Dob (godine)	Jug	59	20	80	39,00	49,00	61,00	0,819
	Sjever	97	14	80	37,00	51,00	61,00	
Broj godina na farmi	Jug	59	2	78	18,00	20,00	36,00	0,152
	Sjever	97	1	80	6,25	18,00	31,75	
Serologija I (5-7/2014)	Jug	59	0	1024	0,00	64,00	256,00	0,457
	Sjever	97	0	1024	0,00	64,00	128,00	
Serologija II (4-7/2015)	Jug	59	0	1024	0,00	64,00	256,00	0,504
	Sjever	97	0	1024	0,00	64,00	128,00	
Serologija III (4-7/2016)	Jug	59	0	1024	0,00	64,00	128,00	0,554
	Sjever	97	0	1024	0,00	64,00	128,00	

Iz podataka u tablici 5.4 je vidljivo da nema razlike u dobi između ispitanika s juga u odnosu na ispitanike sa sjevera Istre. Također nema razlike u titru protutijela kao ni u broju godina provedenih na farmi.

Tablica 5.5 Stopa asimptomatske serokonverzije s obzirom na izloženost pojedinim rizičnim čimbenicima: χ^2 test ili Fisherov egzaktni test

SAMO POZITIVNA SEROLOGIJA N=76		Asimtomatska serokonverzija				p
		Ne		Da		
		N	%	N	%	
Dobne skupine	<50 godina	33	43,40	11	45,80	0,836
	>50 godina	43	56,60	13	54,20	
Spol	Muški	55	72,40	16	66,70	0,592
	Ženski	21	27,60	8	33,30	
Profesionalna izloženost	Ne	25	32,90	3	12,50	0,052
	Da	51	67,10	21	87,50	
Broj godina na farmi	<20 godina	36	47,40	8	33,30	0,227
	>20 godina	40	52,60	16	66,70	
Kontakt: ovca	Ne	13	17,10	4	16,70	0,960
	Da	63	82,90	20	83,30	
Kontakt: koza	Ne	42	55,30	15	62,50	0,532
	Da	34	44,70	9	37,50	
Konzumacija nepasteriziranog mlijeka	Ne	39	51,30	10	41,70	0,410
	Da	37	48,70	14	58,30	
Prisustvovanje: janjenje, jarenje	Ne	10	13,20	4	16,70	0,666
	Da	66	86,80	20	83,30	
Kontakt: vuna	Ne	8	10,50	4	16,70	0,420
	Da	68	89,50	20	83,30	
Kontakt: druga životinja	Ne	18	23,70	3	12,50	0,241
	Da	58	76,30	21	87,50	
Kontakt: krpelj	Ne	39	51,30	9	37,50	0,238
	Da	37	48,70	15	62,50	
Kronična bolest	Ne	43	56,60	18	75,00	0,107
	Da	33	43,40	6	25,00	
Upala pluća	Ne	54	71,10	18	75,00	0,707
	Da	22	28,90	6	25,00	
Pušač	Ne	38	50,00	16	66,70	0,153
	Da	38	50,00	8	33,30	
Tip naselja	Selo	62	81,60	20	83,30	0,845
	Grad	14	18,40	4	16,70	
Regija	Jug	24	31,60	9	37,50	0,591
	Sjever	52	68,40	15	62,50	

U Tablici 5.5 prikazana je stopa asimptomatske serokonverzije s obzirom na izloženost pojedinim rizičnim čimbenicima. Asimptomatska serokonverzija je bila češće zastupljena kod profesionalno izloženih osoba muškog spola, starijih od 50 godina, iz

ruralnog područja sa sjevernog dijela Istre, koje su bile preko 20 godina na farmi, u kontaktu s vunom, u kontaktu s ovcima i drugim životinjama, koje su prisustvovala janjenju i/ili jarenju te češće konzumirale nepasterizirano mlijeko i sireve, u odnosu na druge seropozitivne osobe. Međutim, statistički značajna razlika u izloženosti navedenim rizičnim čimbenicima između njih i drugih seropozitivnih ispitanika nije ustanovljena.

Tablica 5.6 Stopa reinfekcije ispitanika s obzirom na pojedine regije

	Stopa reinfekcije %	95 % CI
Jug	3,39	0,71 - 10,43
Sjever	6,19	2,62 - 12,30

Tablica 5.6 prikazuje stopu reinfekcije ispitanika s obzirom na pojedine regije (sjever/jug). Reinfekcija je registrirana kod dvije osobe na južnom dijelu Istre (3,39%) te kod šest ispitanika na sjevernom dijelu Istarske županije (6,19 %).

Međutim samo kod tri ispitanika mogli smo s visokom sigurnošću potvrditi da je tijekom ovog istraživanja došlo do reinfekcije jer smo imali uvid u prethodnu medicinsku dokumentaciju i serološke nalaze.

U Tablici 5.7 prikazane su razlike u učestalosti rizičnih čimbenika za prokuženost koksijelom među ispitanicima.

Rizični čimbenici za prokuženost koksijelom među ispitanicima bili su: muški spol $p=0,009$; profesionalna izloženost $p<0,001$; boravak na farmi preko 20 godina $p=0,004$; kontakt s ovcima $p=0,030$; kronična bolest $p=0,006$; te pušenje cigareta $p<0,001$.

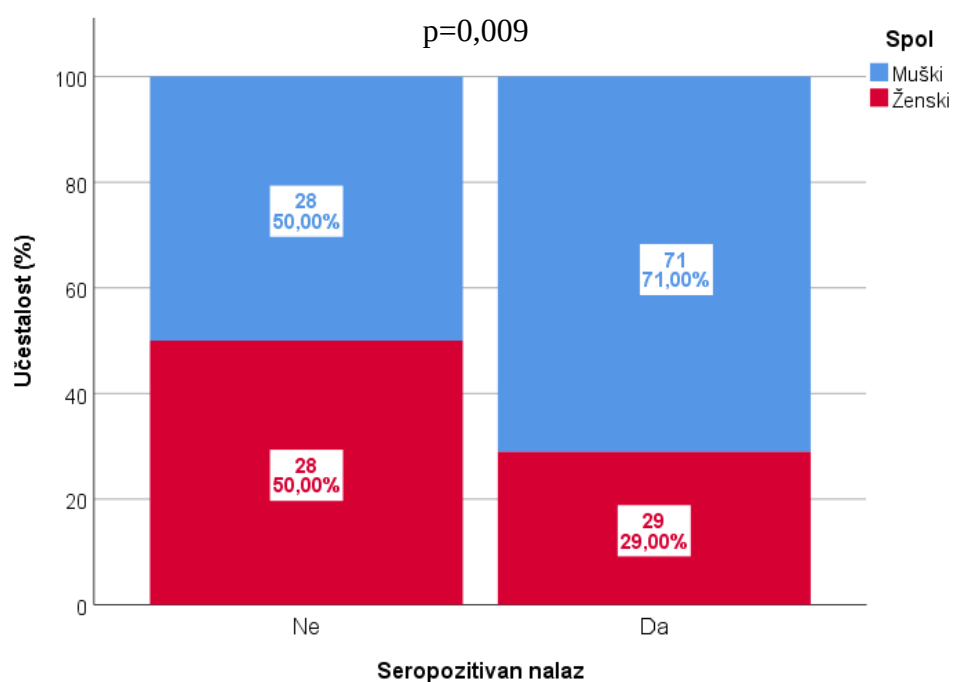
Češći kontakt s drugim životinjama (pas, mačka, kunić) nije se pokazao značajnim rizičnim čimbenikom za prokuženost koksijelom među ispitanicima.

Tablica 5.7 Razlike u učestalosti rizičnih čimbenika za prokuženost koksijelom među ispitanicima: χ^2 test ili Fisherov egzaktni test

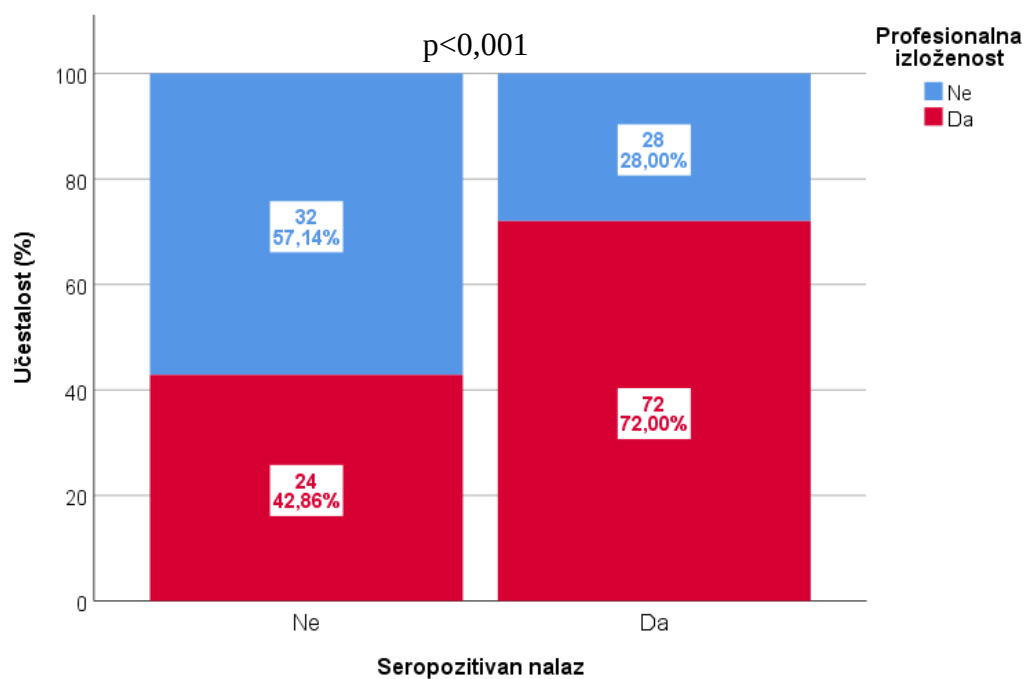
Varijabla	Kategorija	Pozitivna serologija				P
		N	Ne %	N	Da %	
Dobne skupine	<50 godina	33	58,90	44	44,00	0,074
	>50 godina	23	41,10	56	56,00	
Spol	Muški	28	50,00	71	71,00	0,009
	Ženski	28	50,00	29	29,00	
Profesionalna izloženost	Ne	32	57,10	28	28,00	<0,001
	Da	24	42,90	72	72,00	
Broj godina na farmi	<20 godina	38	67,90	44	44,00	0,004
	>20 godina	18	32,10	56	56,00	
Kontakt: ovce	Ne	18	32,10	17	17,00	0,030
	Da	38	67,90	83	83,00	
Kontakt: koze	Ne	31	55,40	57	57,00	0,843
	Da	25	44,60	43	43,00	
Konzumacija nepasterizirano mlijeko/sir	Ne	23	41,10	49	49,00	0,341
	Da	33	58,90	51	51,00	
Kontakt: janjenje, jarenje	Ne	11	19,60	14	14,00	0,357
	Da	45	80,40	86	86,00	
Kontakt: vuna	Ne	8	14,30	12	12,00	0,682
	Da	48	85,70	88	88,00	
Kontakt: druga životinja	Ne	3	5,40	21	21,00	0,009
	Da	53	94,60	79	79,00	
Kontakt: krpelj	Ne	25	44,60	48	48,00	0,687
	Da	31	55,40	52	52,00	
Kronična bolest	Ne	40	71,40	61	61,00	0,006
	Da	16	28,60	39	39,00	
Upala pluća	Ne	40	71,40	72	72,00	0,939
	Da	16	28,60	28	28,00	
Pušač	Ne	49	87,50	54	54,00	<0,001
	Da	7	12,50	46	46,00	
Tip naselja	Selo	44	78,60	82	82,00	0,602
	Grad	12	21,40	18	18,00	
Regija	Jug	26	46,40	33	33,00	0,097
	Sjever	30	53,60	67	67,00	
Prisutni simptomi infekcije	Ne	37	66,10	27	27,00	<0,001
	Da	19	33,90	73	73,00	

Iz Tablice 5.7 izdvojili smo samo one rizične čimbenike koji su bili statistički značajni i grafički ih prikazali stupičastim dijagramom (Slike 5.12- 5.19).

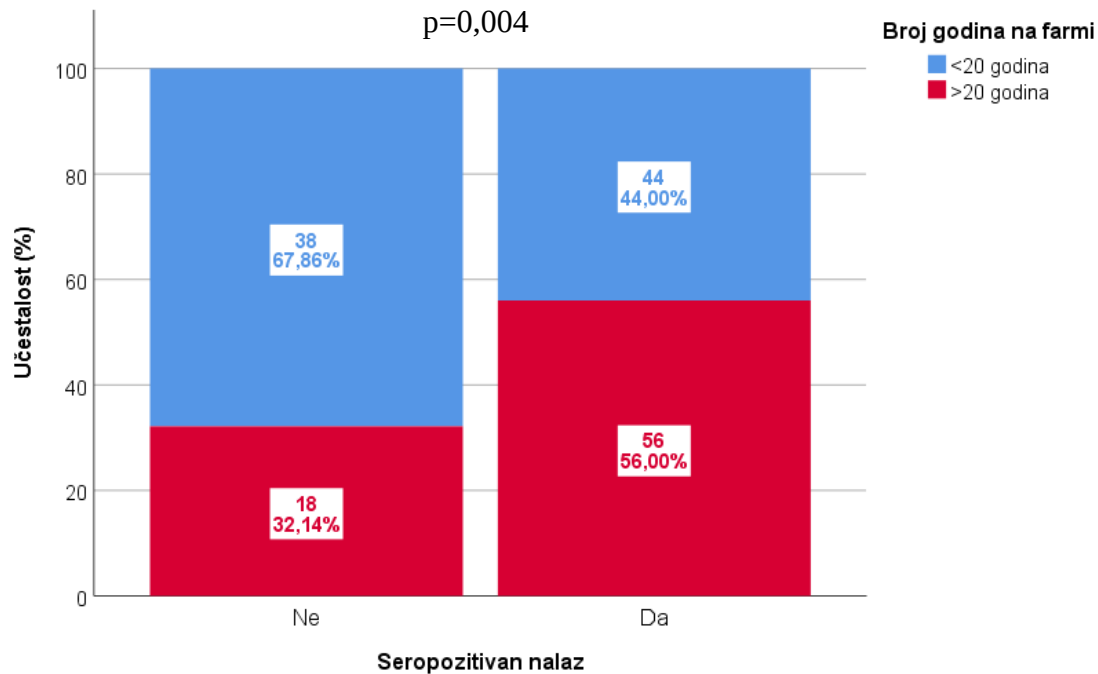
Varijabla *prisutni simptomi infekcije*, iako ne spada u rizične čimbenike, bila nam je vrlo značajna u interpretaciji seroloških nalaza, kako bi mogli s većom sigurnošću donijeti zaključak radi li se o ponovnom oboljenju ili ne, te bolje procijeniti dinamiku prokuživanja ispitanika.



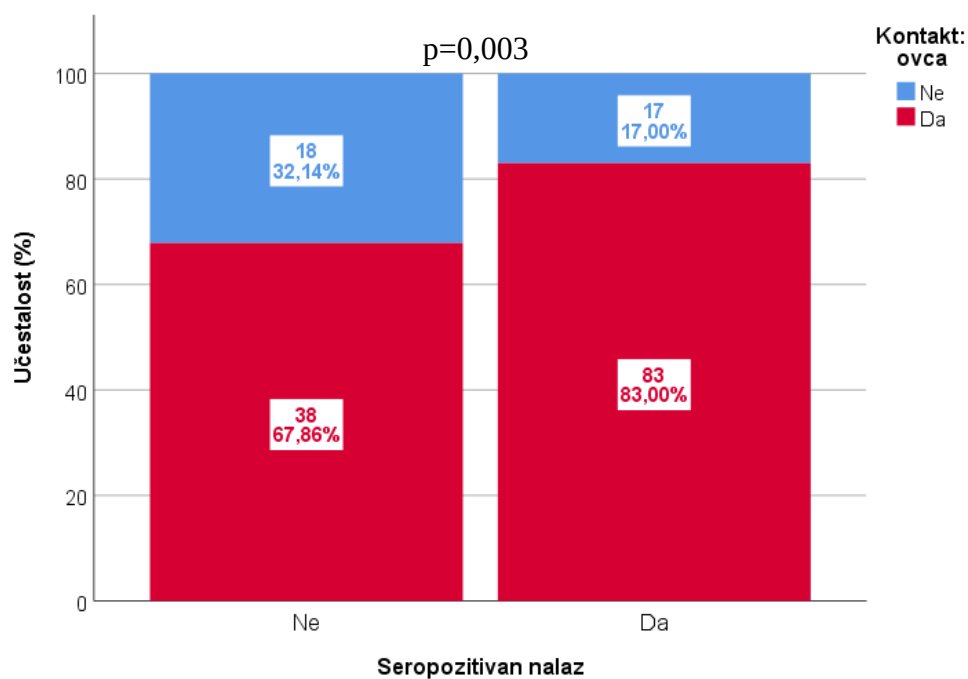
Slika 5.12 Razlika u učestalosti ispitanika muškog i ženskog spola s obzirom na seropozitivan nalaz; χ^2 test



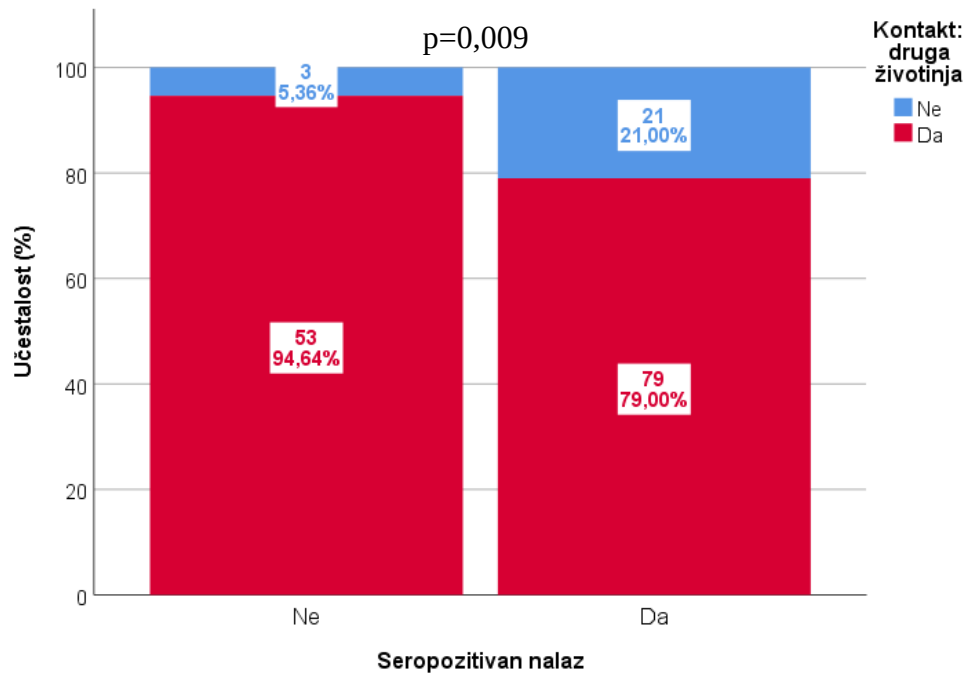
Slika 5.13 Razlika u učestalosti prave profesionalne izloženosti s obzirom na seropozitivan nalaz; χ^2 test



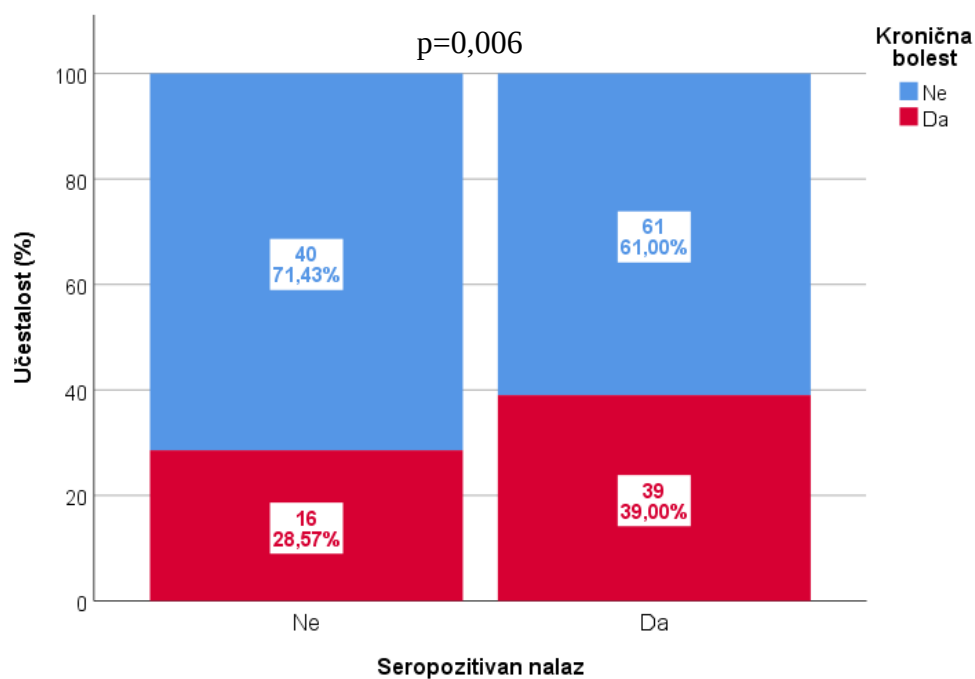
Slika 5.14 Razlika u učestalosti broja godina provedenih na farmi s obzirom na seropozitivan nalaz; χ^2 test



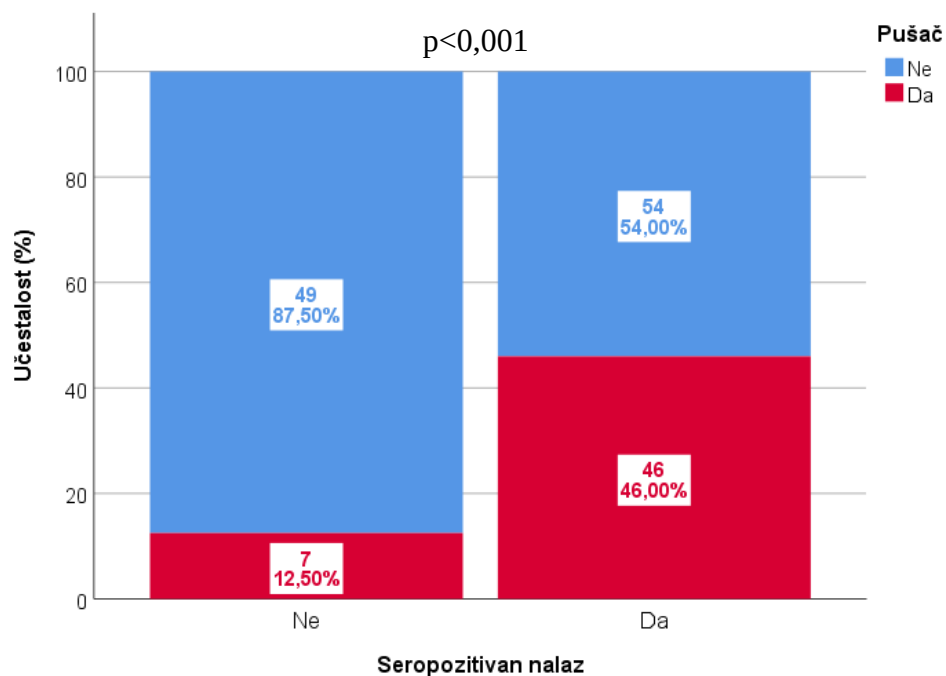
Slika 5.15 Razlika u učestalosti kontakata s ovcima s obzirom na seropozitivan nalaz;
 χ^2 test



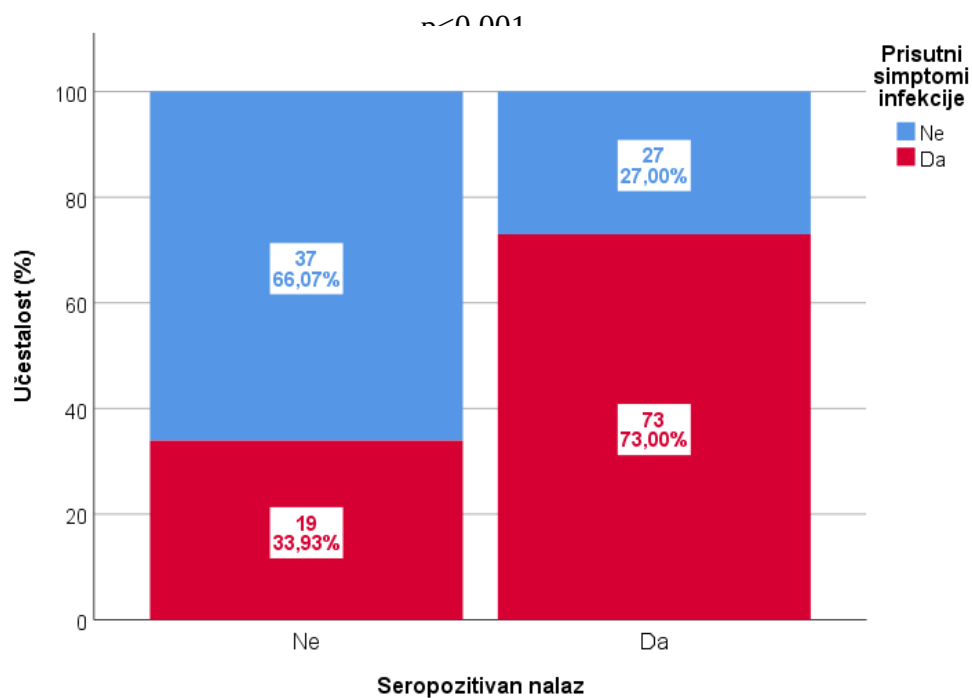
Slika 5.16 Razlika u učestalosti kontakata s drugim životinjama s obzirom na seropozitivan nalaz; Fisherov egzaktni test



Slika 5.17 Razlika u učestalosti ispitanika s kroničnim bolestima s obzirom na seropozitivan nalaz; χ^2 test



Slika 5.18 Razlika u učestalosti ispitanika pušača s obzirom na seropozitivan nalaz; Fisherov egzaktni test



Slika 5.19 Razlika u učestalosti ispitanika s prisutnim simptomima infekcije s obzirom na seropozitivan nalaz; *Fisherov egzaktni test*

Tablica 5.8 Multivarijantni logistički regresijski model predikcije za *Coxiella burnetii* seropozitivne osobe

r²=53%; p<0,001	OR	95% CI		P
		Donji	Gornji	
Sjever vs. Jug	3,22	1,24	8,40	0,016
Dob >50 godina	2,24	0,73	6,91	0,161
Muški spol	1,64	0,61	4,34	0,329
Profesionalna izloženost	6,37	2,04	19,86	0,001
Broj godina na farmi >20 godina	3,63	1,34	9,80	0,011
Kontakt: ovca	1,86	0,65	5,32	0,245
Kontakt: druga životinja	0,27	0,05	1,29	0,100
Kronična bolest	1,53	0,49	4,74	0,464
Pušač	4,97	1,66	14,87	0,004
Prisutni simptomi infekcije	5,99	2,30	15,61	<0,001

U Tablici 5.8 prikazan je multivarijantni logistički regresijski model predikcije za *C. burnetii* seropozitivne osobe (titar protutijela na *C. burnetii* ≥ 64) tijekom promatranog razdoblja s obzirom na prediktorske varijable. Model je statistički značajan ($X^2=75,9$; $df=10$, $p<0,001$) i objašnjava 53% varijance zavisne varijable (pozitivitet na *C. burnetii*) te ispravno klasificira 83% ispitanika. U ovaj regresijski model su stavljene sve varijable koje su u prethodnoj analizi (Tablica 5.7) imale značajnost na razini $p<0,001$ s time da se dodatno išlo prema pravilu desetke, odnosno maksimalno jedna prediktorska varijabla na 10 seropozitivnih slučajeva (zavisna varijabla). Obzirom da smo u ispitivanju imali 100 seropozitivnih osoba, odgovarao bi regresijski model s najviše 10 prediktorskih varijabli.

Iz modela se kao značajni prediktori izdvajaju: profesionalna izloženost OR=6,37 (95% CI 2,04-19,86; $p=0,001$), ispitanici pušači OR=4,97 (95% CI 1,66-14,87; $p=0,004$), više od 20 godina boravka na farmi OR=3,63 (95% CI 1,34-9,80; $p=0,11$), pripadnost sjevernoj regiji s omjerom izgleda OR=3,22 (95% CI 1,24-8,40; $p=0,016$) te prisutni simptomi infekcije OR=5,99 (95% CI 2,30-15,61; $p<0,001$). Ovi omjeri izgleda su kontrolirani na utjecaj svih korištenih varijabli u regresijskom modelu. Najznačajniji prediktor seropozitivnog nalaza je profesionalna izloženost.

S obzirom da se u ovom istraživanju radi o zatvorenoj kohorti te da nije bilo velikog osipanja ispitanika (*drop-out*), mogli smo na kraju izračunati kumulativnu incidenciju u profesionalno izloženih ispitanika i u ispitanika čija izloženost nije bila profesionalna.

Tablica 5.9 Kumulativna incidencija u ispitanika prema intenzitetu izloženosti životinjama (ovce, koze)

	Novoinficirani	Zdravi	Kumulativna incidencija (KI)	(%)
Profesionalno izloženi	16	80	0,167	16,67
Neprofesionalno izloženi	2	58	0,033	3,33

Tablica 5.9 prikazuje kumulativnu incidenciju u profesionalno izloženih ispitanika u odnosu na ispitanike koji nisu profesionalno izloženi u razdoblju trajanja istraživanja od 2 godine i 2 mjeseca. Kumulativna incidencija profesionalno izloženih osoba iznosi 16,67 %, a u ispitanika iz seoskih domaćinstava, tj. u neprofesionalno izloženih osoba 3,33%.

Kumulativna incidencija (apsolutni rizik) pokazala je da su profesionalno izložene osobe u većem riziku za nastanak infekcije (simptomatske ili asimptomatske) u odnosu na neprofesionalno izložene osobe (seoska domaćinstva).

Relativni rizik (RR) = 5 i uz 95% CI 1,36-19,19 pokazuje da je rizik obolijevanja 5 puta veći kod profesionalne izloženosti u odnosu na izloženost koju imaju ispitanici koji žive u seoskom domaćinstvu. Dakle, profesionalna izloženost značajno povećava rizik za razvoj bolesti.

Tablica 5.10 Kumulativna incidencija u ispitanika s obzirom na pripadnost regiji (sjever/jug)

	Novoinficirani	Zdravi	Kumulativna incidencija (KI)	(%)
Ispitanici na sjeveru	11	86	0,113	11,34
Ispitanici na jugu	7	52	0,119	11,86

Kumulativna incidencija ispitanika koji žive na sjevernom dijelu Istre u odnosu na one s južnog dijela prikazana je u Tablici 5.10.

RR=0,96 uz 95% CI 0,41-2,29 pokazuje da regija (sjever/jug) nema utjecaja na rizik od obolijevanja od Q-groznice.

5.2. Životinje (ovce i koze)

Prema službenom popisu 2014. godine u Istarskoj županiji registrirano je 16 648 ovaca i 2 688 koza (HPA). Istraživanjem je obuhvaćeno 6 039 (36,27%) ovaca i 953 (35,45%) koza, a serološka analiza krvi na *C. burnetii* obavljena je na 548 (9,10%) obuhvaćenih ovaca i 86 (9,00%) obuhvaćenih koza. Ukupno smo prikupili 634 uzoraka krvi ovaca i koza iz 66 stada (46 stada ovaca i 20 stada koza).

Područja koja su obuhvaćena ovim istraživanjem čine otprilike 84,7% površine Istarske županije (2382 km²/2813 km²) i grupirana su u sedam epidemioloških područja oko gradova Pula, Rovinj, Poreč, Umag, Labin, Pazin i Buzet. Od ukupno 31 općine u Istarskoj županiji, ovim istraživanjem nije obuhvaćeno samo osam općina (Medulin, Fažana, Barban, Cerovlje, Motovun, Oprtalj, Pićan i Vižinada), što predstavlja površinu od oko 430,95 km².

5.2.1. Analiza anketa vlasnika životinja (ovce, koze)

U Tablici 5.11 prikazani su deskriptivni i serološki pokazatelji na ispitivanom uzorku životinja iz kojih je vidljivo da su i ovce i koze više zastupljene na sjevernom dijelu Istarske županije (ovce 312; 56,9%; koze 62; 72,10%).

Loši higijenski uvjeti na farmi prisutni su samo kod ovaca na južnom dijelu Istre i to u 15,3% slučajeva.

S obzirom na veličinu stada, 50,4% ovaca je bilo u stadima većim od 200 jedinki, i to osobito na jugu Istre, dok je 64,0% koza bilo u manjim stadima (≤ 100 jedinki), uglavnom sjeverno od linije koja prolazi središtem Istre (Tablica 5.10 i 5.11).

Na južnom dijelu Istarske županije, s obzirom na pasminu ovaca, zastupljenije su bile solčavsko-jezerska ovca (33,5%) i pramenka (33,1%), dok je istarska ovca bila zastupljenija na sjeveru (45,5%). Kod koza je na jugu bila samo pasmina francuska alpina (100%), a na sjevernom dijelu su uz francusku alpinu (54,8%), bile u većem broju snasta koza (16,1%) i istarska koza (9,7%).

Pozitivan serološki nalaz na *C. burnetii* potvrđen je kod 65,0% vlasnika ovaca i kod 47,8% vlasnika koza. Više seropozitivnih vlasnika ovaca je zabilježen na sjeveru (69,9%), dok je seropozitivan nalaz (ELISA) zabilježen kod 34 (6,2%) ovaca i tri (3,5%) koze.

Svi vlasnici su negirali reproduktivne smetnje kod svojih životinja koje su bile uključene u ovo istraživanje, kao što su spontani pobačaj i malformirano potomstvo.

Tablica 5.11 Deskriptivni i serološki pokazatelji na ispitivanom uzorku ovaca i koza

Varijabla	Svojstvo	Životinje			
		Ovce		Koze	
		N	%	N	%
Regija	Jug	236	43,10	24	27,90
	Sjever	312	56,90	62	72,10
Higijenski uvjeti na farmi	Loši	84	15,30	0	0,00
	Dobri	445	81,20	86	100,00
	Vrlo dobri	19	3,50	0	0,00
Seropozitivni vlasnici (broj)	Negativni	36	35,00	12	52,20
	Pozitivni	67	65,00	11	47,80
Veličina stada	Malo (0-100)	162	29,60	55	64,00
	Srednje (101-200)	110	20,10	15	17,40
	Veliko (>200)	276	50,40	16	18,60
Dob (godine)	1-2	144	26,30	13	15,10
	3-6	266	48,50	57	66,30
	>6	138	25,20	16	18,60
ELISA	Negativan nalaz	514	93,80	83	96,50
	Pozitivan nalaz	34	6,20	3	3,50
Jačina reakcije	1	14	41,20	1	33,30
	2	18	52,90	2	66,70
	3	2	5,90	0	0,00

*Jačina reakcije (ELISA serološka metoda)

U Tablici 5.12 prikazane su razlike između sjevernog i južnog dijela Istarske županije s obzirom na pasminu ovaca, higijenske uvjete na farmama ovaca, seropozitivne vlasnike farmi, veličinu stada ovaca te seropozitivan nalaz u ovaca.

Tablica 5.12 Razlike između sjeverne i južne regije s obzirom na pasminu ovaca, higijenske uvjete na farmama ovaca, seropozitivne vlasnike ovaca, veličinu stada ovaca i serološki nalaz (ELISA) u ovaca: χ^2 test ili Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

OVCE Varijable	Kategorije	Regija				p
		Jug		Sjever		
		N	%	N	%	
Pasmine	Dubrovačka ruda	3	1,30	0	0,00	<0,001
	Istočno frizijska	0	0,00	58	18,60	
	Istarska	62	26,30	142	45,50	
	Pramenka	78	33,10	14	4,50	
	Romanovska	0	0,00	3	1,00	
	Sardinijska	0	0,00	42	13,50	
	Solčavsko jezerska	79	33,50	53	17,00	
	Trav.pramenka	14	5,90	0	0,00	
Higijenski uvjeti na farmi	Loši	66	28,00	18	5,80	<0,001
	Dobri	170	72,00	275	88,10	
	Vrlo dobri	0	0,00	19	6,10	
Seropozitivni vlasnici (broj)	Ne	14	46,70	22	30,10	0,110
	Da	16	53,30	51	69,90	
Veličina stada	Malo (0-100)	70	29,70	92	29,50	<0,001
	Srednje (101-200)	10	4,20	100	32,10	
	Veliko (>200)	156	66,10	120	38,50	
ELISA	Ne	234	99,20	280	89,70	<0,001
	Da	2	0,80	32	10,30	
Jačina reakcije*	1 (+)	2	0,80	12	3,80	<0,001
	2 (++)	0	0,00	18	5,80	
	3 (+++)	0	0,00	2	0,60	

*Jačina reakcije (ELISA serološka metoda)

Značajne razlike zabilježene su u raspodjeli pasmina ovaca (autohtona istarska ovca je zastupljenija na sjevernom dijelu) i higijenskim uvjetima na farmi koji su bili lošiji na jugu Istre, ($p < 0,001$), zatim veličini stada (veća stada na jugu; $p < 0,001$) te jačini reakcije i

pozitivnom serološkom nalazu (ELISA) u ovaca (češći i snažniji pozitivni nalazi na sjeveru Istre, $p < 0,001$) (Tablica 5.12).

Tablica 5.13 Razlike između sjeverne i južne regije s obzirom na pasminu koza, higijenske uvjete na farmama koza, seropozitivne vlasnike koza, veličinu stada koza te serološki nalaz (ELISA) u koza: X^2 test

KOZE Varijable	Kategorije	Regija				p
		Jug		Sjever		
		N	%	N	%	
Pasmina	Burska	0	0,00	3	4,80	0,024
	Francuska Alpina	24	100,00	34	54,80	
	Hrvatska bijela	0	0,00	5	8,10	
	Hrvatska šarena	0	0,00	2	3,20	
	Istarska koza	0	0,00	6	9,70	
	Smasta	0	0,00	11	17,70	
	Sanska	0	0,00	1	1,60	
Higijenski uvjeti na farmi	Loši	0	0,00	0	0,00	NA
	Dobri	24	100,00	62	100,00	
	Vrlo dobri	0	0,00	0	0,00	
Seropozitivni vlasnici (broj)	Ne	7	100,00	5	31,30	0,002
	Da	0	0,00	11	68,80	
Veličina stada	Malo (0-100)	8	33,30	47	75,80	<0,001
	Srednje (101-200)	0	0,00	15	24,20	
	Veliko (>200)	16	66,70	0	0,00	
ELISA	Ne	24	100,00	59	95,20	0,273
	Da	0	0,00	3	4,80	
Jačina reakcije	1 (+)	0	0,00	1	1,60	0,548
	2 (++)	0	0,00	2	3,20	

*Jačina reakcije (ELISA serološka metoda)

U tablici 5.13 prikazane su razlike između sjeverne i južne regije s obzirom na pasminu koza, higijenske uvjete na farmama koza, seropozitivne vlasnike koza, veličinu stada koza te serološki nalaz (ELISA) u koza.

Značajne razlike zabilježene su u veličini stada koza (na endemskom južnom dijelu Istre bila su veća stada koza preko 200 jedinki, dok je na sjevernom dijelu bilo puno više manjih stada koza s desetak jedinki, ($p < 0,001$). Seropozitivni vlasnici koza registrirani su samo na sjevernom dijelu Istarske županije ($p = 0,002$), a higijenski uvjeti na farmama koza bili su zadovoljavajući u obje regije.

Tablica 5.14 Binarni logistički model predikcije seropozitivnog nalaza u životinja (ovce, koze)

	OR	95% CI		p
		Donji	Gornji	
Koze vs. Ovce	11,33	1,76	73,10	0,011
Sjever vs. Jug	105,71	13,53	826,07	<0,001
Lošiji higijenski uvjeti na farmi	2,63	1,19	5,88	0,017
Veće stado	21,60	5,45	85,59	<0,001
Dob životinje	0,92	0,78	1,09	0,350

Binarni logistički model predikcije seropozitivnog nalaza u životinja (tablica 5.14) pokazao je da se seropozitivan nalaz u životinja povezuje s lošijim higijenskim uvjetima na farmi, većim stadom, sjevernom regijom Istre te vrstom životinje (koza). Model je statistički značajan ($p < 0,001$), objašnjava 36,7% varijance zavisne varijable i ispravno klasificira 94,2% slučajeva.

Seropozitivitet životinja je 2,63 puta prisutniji kod životinja koje žive u lošim higijenskim uvjetima (OR 2,63; 95% CI 1,19-5,88; $p = 0,017$); 21,60 puta kod životinja koje žive u većem stadu (OR 21,60; 95% CI 5,4-85,59; $p < 0,001$) te 105 puta kod onih koje se nalaze u sjevernoj regiji Istre (OR 105,71; 95% CI 13,53-826,07; $p < 0,001$). Što se tiče vrste životinja, koze pokazuju veću osjetljivost na infekciju koksijelom u odnosu na ovce (OR 11,3; 95% CI 1,76-73,10; $p = 0,011$). Zanimljivo, ovaj rezultat da koze pokazuju veću

osjetljivost na infekciju koksijelom u odnosu na ovce pokazao se u ovom, multivarijatnom modelu, dok u čistoj bivarijatnoj usporedbi ovce pokazuju višu prevalenciju seropozitivnog nalaza (6,20% u odnosu na 3,50%). Ipak, u multivarijatnom okruženju prikazanom u Tablici 5.14 na konačnu prediktivnu vrijednost utječu i druge prediktorske varijable tako da je ovo relevantniji podatak.

Tablica 5.15 Binarni logistički model seropozitivnog nalaza u ljudi s obzirom na životinje koje imaju na farmi

	OR	95% CI		p
		Donji	Gornji	
Ovce vs. koze	2,11	1,21	3,68	0,008
Sjever vs. jug	3,09	1,93	4,92	<0,001
Loši higijenski uvjeti na farmi	2,56	1,19	5,55	0,016
Veće stado (>200 životinja)	2,73	2,11	3,54	<0,001
Dob životinje	0,98	0,89	1,07	0,616

Model je statistički značajan ($p < 0,001$), objašnjava 25,3% varijance zavisne varijable i ispravno klasificira 78,3% slučajeva. U ovom regresijskom modelu prikazan je utjecaj pojedinih čimbenika životinja na pozitivan nalaz kod ljudi: te izgleda povećava sjeverna regija u odnosu na jug (OR=3,09; 95% CI 1,93-4,92; $p < 0,001$), veće stado (OR=2,73; 95% CI 2,11-3,54; $p < 0,001$), lošiji higijenski uvjeti (OR=2,56; 95% CI 1,19-5,55; $p = 0,016$) te kontakt s ovcima u odnosu na koze (OR=2,12; 95% CI 1,20-3,70; $p = 0,008$).

5.2.2. Analiza serološkog testiranja u životinja

Serološkom pretragom (ELISA) nađeno je 37 pozitivnih seruma (5,84%) od ukupno 634 testiranih seruma ovaca i koza (34 seropozitivne ovce (6,2%) i 3 seropozitivne koze (3,5%). Sveukupno je u ovo istraživanje bilo uključeno 66 stada ovaca i koza. Od ukupno 46 stada ovaca, 6 stada su bila seropozitivna (13%), a od 20 stada koza, jedno je stado bilo seropozitivno (5%).

Stado se smatralo pozitivnim ako je barem jedna životinja iz stada bila seropozitivna.

S obzirom na dob seropozitivnih životinja, ovce u dobi 1-2 godine bile su osjetljivije na infekciju koksijelom (22 seropozitivne ovce od ukupno 144 ovaca te dobi), u odnosu na starije ovce (3-6 godina; 7/266, > 6 godina; 5/138), ali statistička značajnost nije potvrđena (Tablica 5.15). Broj seropozitivnih koza je bio premali za analizu po dobi.

Veličina stada se pokazala značajnom za seropozitivnost životinja. Velika stada s više od 200 jedinki bila su statistički značajno seropozitivnija u odnosu na mala (0-100 jedinki) i srednja stada (101-200 jedinki).

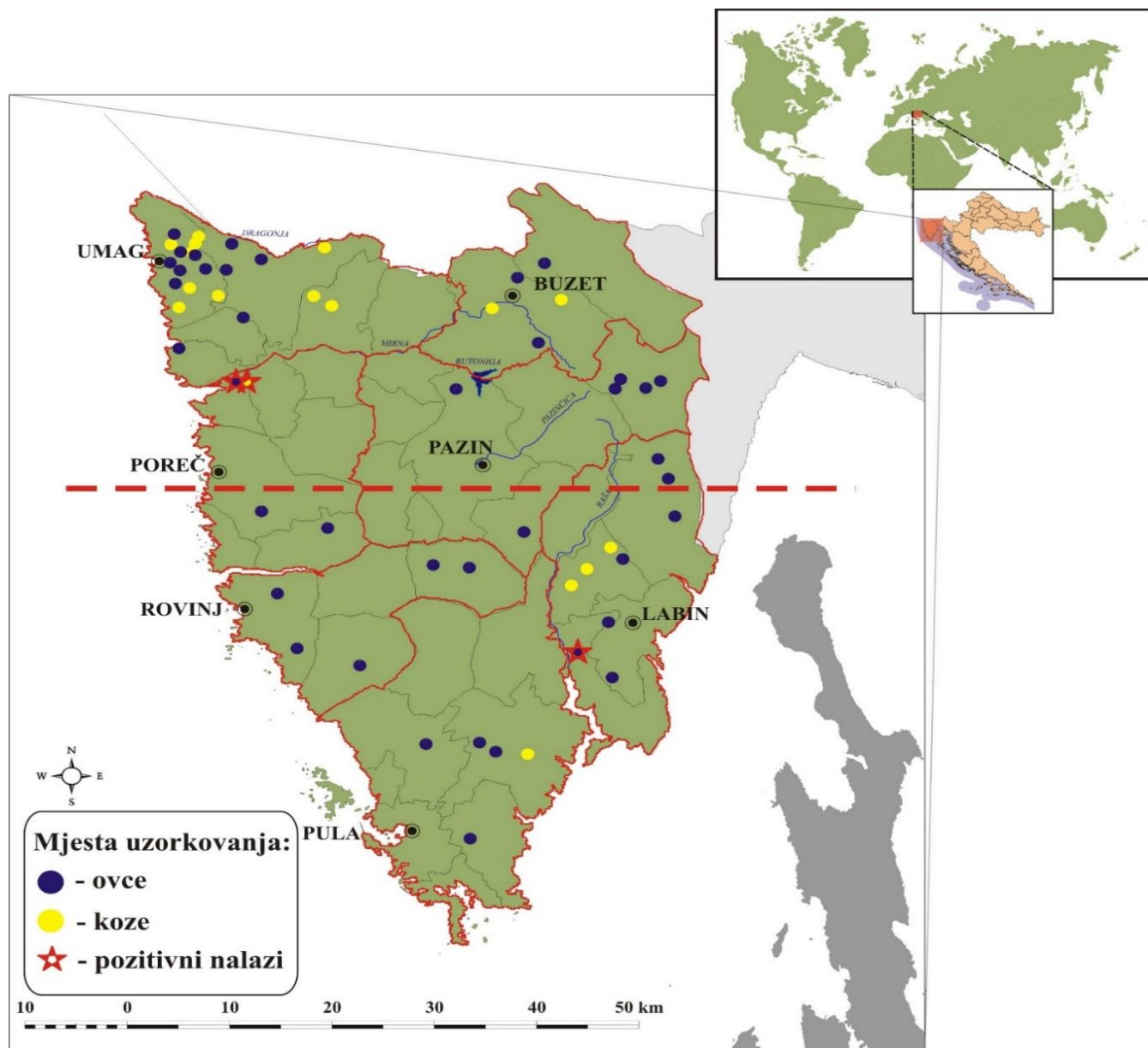
Higijenski uvjeti na farmi ovaca bili su dobri u 81,2% stada, dok su u 15,3% bili loši. Značajna korelacija je nađena između seropozitivnih ovaca i loših životnih uvjeta na farmi.

Najviše seropozitivnih ovaca registrirano je kod autohtone pasmine istarska ovca, ukupno 19 seropozitivnih, kod istočno-frizijske ovce bilo je 13 seropozitivnih, dok je kod solčavsko-jezerske ovce i pramenke nađena samo jedna seropozitivna ovca. Kod ostalih pasmina (sardinijska ovca, dubrovačka ruda, romanovska ovca i travnička pramenka) nije zabilježena seropozitivnost. Seropozitivni nalaz kod ovaca zabilježen je samo u dva područja (područje oko Poreča i područje oko Raše).

Upravo je na tim područjima veća zastupljenost velikih farmi ovaca i koza. Izdvaja se jedno područje oko Poreča s pet većih stada ovaca u kojima su registrirane seropozitivne ovce. Prevalencija seropozitivnih ovaca unutar tih pet stada bila je 0,5%; 1%; 1,3%; 2,3% i 3,2%. Manje epidemije i sporadični slučajevi obolijevanja od Q-groznice kod ljudi zabilježeni su upravo na tim područjima te se može vidjeti povezanost obolijevanja ljudi sa seropozitivnošću, odnosno prisustvom protutijela na bakteriju *C. burnetii* u životinja. Seropozitivan nalaz kod koza registriran je samo na području Poreča i njegove okolice.

U drugoj etapi istraživanja, ponovili smo uzorkovanje krvi samo kod seropozitivnih životinja iz prve etape istraživanja. Međutim od 37 seropozitivnih životinja, našli smo samo 10 ovaca i jednu kozu, iako smo vlasnike upozorili da posebnu pozornost obrate na seropozitivne životinje iz prve etape istraživanja. Istom serološkom metodom ustanovili smo promjene u titru protutijela protiv *C. burnetii*. Značajan porast protutijela uočili smo kod četiri ovce, kod dvije ovce i jedne koze registriran je pad protutijela, a kod preostale četiri ovce nije došlo do promjena u odnosu na razinu protutijela iz prve etape istraživanja. Međutim, s obzirom na mali broj životinja, nismo mogli dati pouzdane zaključke vezane uz dinamiku prokuživanja koksijelom.

Slika 5.19 prikazuje na karti Istre područja uzorkovanja krvi kod ovaca i koza. Zvezdicom su označena područja gdje su registrirani pozitivni nalazi.



* Izvorkarte: Zavod za javno zdravstvo Istarske županije Pula, Služba za zdravstvenu ekologiju

Slika 5.19 Karta Istre s označenim mjestima uzorkovanja krvi kod ovaca i koza po epidemiološkim područjima te pozitivnim nalazima

6. RASPRAVA

Iako je Q-groznica tipična profesionalna bolest, njezina pojava uvijek privlači veliku pozornost javnosti, a u mnogim zemljama i dalje predstavlja velik javnozdravstveni problem. Točna incidencija Q-groznice ne može se točno odrediti, s obzirom da u preko 60% slučajeva infekcija prolazi asimptomatski, te se stoga bolest niti ne dijagnosticira.

Q-groznica se obično pojavljuje u endemskim žarištima, osobito u područjima intenzivnog stočarstva, te su stoga u većem riziku od obolijevanja ljudi koji su u bliskom i češćem kontaktu s domaćim životinjama, kao što su to uzgajivači stoke, veterinari te laboratorijsko osoblje (11). I područje Istre je jedno takvo endemsko žarište, osobito njezin južni dio gdje se bolest javlja uglavnom sporadično i u manjim epidemijama (8, 47).

Smatra se da ljudi u enzootskim žarištima dolaze u kontakt s koksijelom već u vrlo ranoj životnoj dobi. Titrovi protutijela klase IgG tijekom života postepeno opadaju, a ako nema ponovnih kontakata s koksijelom, mogu i potpuno nestati (11), što se pokazalo kod nekih ispitanika i u ovom istraživanju. Poznato je da imunosni odgovor može izostati u imunokompromitiranih osoba (76).

Dosadašnje spoznaje o Q-groznici potvrđuju da se neimuni bolesnici u kontaktu s *C. burnetii* vrlo brzo primarno inficiraju. Primarna infekcija može biti asimptomatska ili simptomatska te predstavlja akutni oblik Q-groznice i obično završava potpunim oporavkom kod zdravih osoba.

Međutim, kod nekih osoba koksije se mogu umnožavati unatoč imunološkom odgovoru koji prati primarnu infekciju, te dolazi do razvoja kronične infekcije s obzirom da imunološki sustav ne može kontrolirati infekciju. Ovu hipotezu podržavaju svi dostupni podaci, kako u ljudi, tako i kod životinja. Kod imunokompromitiranih životinja može doći do relapsa infekcije ako su one tretirane kortikosteroidima, ako su ozračene ili imaju neku drugu kroničnu infekciju (14).

Na kraju istraživanja serološki smo testirali 11 novopridošlih osoba na jednu veću farmu. Sedam osoba je bilo seropozitivno na bakteriju *C. burnetii*, od kojih su dvije osobe imale simptome akutne Q-groznice (podaci nisu prikazani u rezultatima). Radilo se o

ljudima koji su prvi put došli u kontakt s ovcima i kozama na farmu gdje su tijekom ovog istraživanja registrirana seropozitivna stada koza i ovaca na *C.burnetii*.

Poznato je da postoji pozitivna korelacija između intenzivnog razvoja stočarstva na jednom ograničenom području i pojave Q-groznice među ljudima, a osobito ako su u blizini naseljena mjesta (53). To se moglo vidjeti i u ovom istraživanju. Naime, jedno je područje na sjeverozapadnoj obali Istre u blizini Poreča bilo povezano s većom pojavom Q-groznice u ljudi, ali i u životinja. Tu je smješтана velika farma ovaca i koza na kojoj se u posljednjih dvadeset godina intenzivirao razvoj stočarstva, a udaljena je samo 2 kilometra od mora i u blizini je naseljenih mjesta.

Također su Einbach i suradnici u svom istraživanju pokazali povezanost infekcije Q-groznice u ljudi s infekcijom u koza i ovaca te potvrdili visok rizik zaraze koksijelom za osobe koje žive i/ili rade na farmi ili su njenoj neposrednoj blizini (87).

Novije studije potvrdile su genotipizacijom koksijela epidemiološku povezanost između infekcije domaćih životinja i bolesti u ljudi (77, 78). I u ovom istraživanju se uočila povezanost između prokuženosti vlasnika ovaca i koza te seropozitivnog nalaza u životinja, ali se to metodama primijenjenim u ovom istraživanju nije moglo i potvrditi. Jedan ispitanik, koji je prvi put došao na farmu u kojoj su stada ovaca bila seropozitivna, vrlo brzo je i obolio od Q-groznice. S obzirom na komplikacije koje su nastale kod tog ispitanika u tijeku akutne faze bolesti (senzorna polineuropatija, nesanic, pojačano znojenje, umor, kratkoća daha), a nije se radilo o imunokompromitiranoj osobi, moglo se pretpostaviti da je došao u kontakt s virulentnijim sojem koksije, ili je, s obzirom da je radio kao traktorist na farmi, češće udisao kontaminirani aerosol u kojem je bila zastupljena veća koncentracija uzročnika.

Ukupno je u ovom istraživanju zabilježeno 65,0% seropozitivnih vlasnika ovaca i 47,8% seropozitivnih vlasnika koza i to najviše na sjevernom dijelu Istre. Međutim, da bi se potvrdila stvarna povezanost između oboljelih osoba i manifestno ili asimptomatski bolesne životinje, potrebno je provesti istraživanje u kojem će se primjenom molekularnih metoda ta povezanost i dokazati.

Danas se sve češće primjenjuju molekularne metode za određivanje i genotipizaciju sojeva koksije. Tako su, primjerice, metode MLVA i MST vrlo korisne, osobito u proučavanju izvora infekcije kod epidemija Q-groznice. Osim toga, genotipizacijom sojeva

C. burnetii omogućuje se kontrola i suzbijanje bolesti u domaćih životinja koje predstavljaju primarni izvor zaraze za ljude (88).

Astobiza i suradnici su metodom MLVA otkrili različite genotipove koksijela kod domaćih životinja na sjeveru Španjolske, a među njima i nove MLVA genotipove koji nisu nađeni ni u jednom humanom ili animalnom uzorku. To je posebno zanimljivo s aspekta epidemiologije, s obzirom na to da koksijela nije bila prisutna u životinja, ali je bila u okolišu (89) te se postavlja opravdano pitanje je li taj soj koksije patogen za životinje i ljude.

Roest i suradnici su pomoću molekularne metode MLVA za genotipizaciju *C. burnetii* analizirali pozitivne uzorke krvi na koksijelu kod koza koje su bile povezane s velikom epidemijom Q-groznice u južnom dijelu Nizozemske. Njihovo je istraživanje potvrdilo epidemiološku povezanost između infekcije koza i bolesti u ljudi te pokazalo da je jedan genotip prevladavao na svim farmama koza u 91% uzoraka. Međutim, neki drugi čimbenici, kao što su klimatski uvjeti, gustoća naseljenosti ljudi i veći broj koza na jednom mjestu, pokazali su se značajnijim u odnosu na djelomično virulentniji soj koksije i njegovo širenje. Taj dominantni genotip je pronađen i u istočnom dijelu Nizozemske što ukazuje na klonsko širenje koksije (90).

I u Hrvatskoj je provedeno istraživanje u kojem su Račić i suradnici metodom MLVA otkrili 13 novih genotipova *C. burnetii* iz 335 pozitivnih humanih i animalnih uzoraka i time dali svoj doprinos u filogenetici *C. burnetii* (91).

Postojeći podaci o prokuženosti koksijelom kod ljudi koji žive na području Istre su vrlo oskudni i neujednačeni. Maretić je sa suradnicima, proučavajući dvije epidemije Q-groznice na području južne Istre, ustanovio metodom RVK vrlo visoku prokuženost stanovništva (oko 40%) (8). Većina oboljelih su bile osobe koje su po prvi puta došle u kontakt s koksijelom. Za razliku od njih, autohtono stanovništvo se tijekom života u kontaktu s ovčama, koje se smatraju najvažnijim rezervoarom infekcije u Istri, postepeno asimptomatski prokužilo.

Sep-Ševerdija je u retrospektivnom epidemiološkom istraživanju koje je obuhvatilo razdoblje od 1968. do 2008. godine, analizirajući prijavljene slučajeve oboljelih od Q-groznice u Istarskoj županiji i Hrvatskoj, ustanovila da prosječni godišnji broj prijavljenih slučajeva u Istarskoj županiji iznosi 2,55/100 000 stanovnika, dok je u čitavoj Hrvatskoj taj omjer 1,21/100 000 stanovnika, što ukazuje na dvostruko veću učestalost oboljelih od Q-

groznice u Istarskoj županiji. U tom razdoblju je u Istarskoj županiji bilo 211, a u Hrvatskoj 2326 prijavljenih slučajeva Q-groznice (49).

Vilibić-Čavlek i suradnici su, analizirajući serume 552 febrilna bolesnika s protrahiranim kašljem s različitih područja u Hrvatskoj od kojih je 152 (27,5%) imalo protutijela na Q-groznicu, ustanovili seroprevalenciju od 21,2% za Istarsku županiju, 30,8% za Dalmaciju, 35% za Zagreb s okolicom te 41% za Slavoniju i Liku (92). Ovi podaci zapravo pokazuju da Q-groznica nije češća u Istri, nego se u ostalim područjima Hrvatske vjerojatno ne prijavljuju adekvatno svi slučajevi oboljenja.

U proteklih 50 godina na području Istre zabilježeno je 7 epidemija Q-groznice, pri čemu je broj oboljelih varirao od 24 oboljela 1969. do svega 4 bolesnika 1999. godine.

Jedna od interesantnijih epidemija bila je ona iz 1971. godine kada je oboljelo 19 osoba koje su se bavile uzgojem krava u Valturi blizu Pule. Međutim, izvor infekcije nisu bile krave, nego sijeno koje je najvjerojatnije bilo kontaminirano koksijelama. U spremište sijena, naime, dolazile su gravidne ovce iz obližnjeg mjesta blizu Valture, a bilo je nekoliko ovaca i u neposrednoj blizini krava. Ljudi koji su nosili to sijeno za krave, najvjerojatnije su se zarazili udisanjem čestica prašine kontaminirane koksijelama, a ne preko izravnog kontakta s kravama.

Epidemija Q-groznice početkom 1992. godine rezultirala je povećanim pobolom od atipične upale pluća na području tadašnje općine Pula kada je 12 osoba hospitalizirano, ali se nije uspio naći izvor zaraze. Moguće je da je vjetar koji često puše na ovom području bio jedan od mogućih uzroka ove epidemije.

U ožujku 1999. godine izbila je epidemija Q-groznice među sudionicima šahovskog turnira koji se održavao u jednom ugostiteljskom objektu u blizini Vodnjana kada su četiri osobe oboljele od atipične upale pluća. Izvor zaraze su najvjerojatnije bile ovce koje su se nalazile u blizini. Značajan je podatak da je vlasnik stada nedavno prije pojave bolesti u ljudi kupio nekoliko ovaca od kojih su pojedine bile pozitivne na koksijelu (49).

Početkom travnja 2008. godine u blizini Vodnjana oboljelo je osam golf igrača. Glavni razlog epidemije bilo je vjetrovito vrijeme pogodno za aerogeni put prijenosa infekcije, te stada ovaca koja su pasla u blizini golf terena (49).

Posljednja veća epidemija Q-groznice u Istri zabilježena je početkom travnja 2011. godine, kada je oboljelo šest novopridošlih radnika na jednoj velikoj farmi u Poreštini. Inače su na tom području u prethodnih deset godina bili zabilježeni sporadični slučajevi

obolijevanja od Q-groznice, što je vjerojatno povezano s većim brojem stada ovaca i koza koja na ovom području obitavaju.

Od 156 ispitanika uključenih u ovo istraživanje, na početku je ustanovljena prisutnost specifičnih protutijela IgG faze II *C. burnetii* kod 97 (62%) ispitanika, a godinu dana kasnije seropozitivnost je zabilježena kod 100 (64%) ispitanika. Na kraju ovog dvogodišnjeg istraživanja utvrđena je seropozitivnost kod 91 (58%) ispitanika s obzirom da se kod devet osoba ustanovio nestanak protutijela, tj. postali su seronegativni.

Tako visoku seroprevalenciju među profesionalno izloženim osobama, ustanovili su i drugi autori (37, 92, 93, 94, 95). Dorko i suradnici proveli su istraživanje kojim su pokazali da su djelatnici u jednom Veterinarskom institutu u istočnoj Slovačkoj, koji su imali učestale kontakte s domaćim životinjama, ali i kućnim ljubimcima, imali specifična IgG protutijela na antigen faze I i faze II *C. burnetii*. Kod 63% djelatnika ustanovljena su protutijela na antigene faze II *C. burnetii* (37).

Tabibi i suradnici su istražujući rizik izloženosti uzročnicima nekih zoonoza kod poljoprivrednika i uzgajivača životinja na području sjeverne Italije (Lombardija) ustanovili, između ostalog, znatno višu seroprevalenciju na *C. burnetii* (50%) kod uzgajivača životinja u odnosu na one koji nisu bili u kontaktu sa životinjama. Tako visoka seroprevalencija na koksijelu ukazuje da su oni više izloženi uzročniku Q-groznice te stoga i u većem riziku da obole u odnosu na poljoprivrednike i kontrolnu skupinu (93).

U istraživanju koje su proveli Szymańska-Czerwińska i suradnici ustanovljena je seroprevalencija na *C. burnetii* od 31,2% kod djelatnika zaposlenih na farmama goveda, ovaca i koza u jugoistočnoj regiji Poljske (94).

Van den Brom i suradnici su utvrdili visoku seroprevalenciju na *C. burnetii* od 65,1% kod veterinarima za vrijeme trajanja epidemije Q-groznice u južnom dijelu Nizozemske u kojoj je oboljelo preko 4000 osoba (95). Epidemija Q-groznice u Nizozemskoj trajala je od 2007. do 2010. godine i bila je najveća do sada opisana po broju oboljelih i trajanju. Epidemiološki podaci iz te epidemije pokazali su da su starija životna dob, muški spol i pušenje cigareta bili povezani sa seropozitivnim nalazom kod ispitanika (96).

Istraživanje o seroprevalenciji Q-groznice, bruceloze i leptospiroze među veterinarima i poljoprivrednicima u ruralnom području južne Italije, koje su proveli Monno i suradnici, pokazalo je da 73,4% ispitanika ima IgG protutijela na *C. burnetii*, 3,1% na brucele, dok na leptospiru nisu nađena protutijela IgG (97).

Tijekom ovog istraživanja kroz dvije uzastopne godine, praćenjem dinamike titra protutijela, uočili smo da kod 88% ispitanika nije došlo do značajnijih promjena u visini titra protutijela IgG faze II *C. burnetii*. Uglavnom su imali titar IgG protutijela u rasponu od rezidualnog titra 64 do titra 256. Većina ispitanika je imala konstantne vrijednosti titra kroz tri mjerenja ili su zabilježene manje oscilacije u titru, što se može pripisati i ljudskom faktoru, tj. subjektivnosti prilikom očitavanja rezultata IFA testa.

Rezidualni titar 64 kroz sva tri mjerenja zabilježen je kod 15 osoba, titar 128 kod 18 ispitanika, a trajno povišen titar 256 je imalo pet ispitanika. Porast titra od 64 na 128 te od 128 na 256 imalo je deset ispitanika, a pad titra od 128 na 64 zabilježen je kod 26 ispitanika. Kod pet ispitanika zabilježen je neznatčan porast titra, a nakon slijedećeg testiranja uzorka krvi, pad titra.

Međutim, kod deset ispitanika se registrirao izrazito visok titar specifičnih protutijela IgG faze II (četverostruko veći od granične vrijednosti titra, titar 1024), te se njihov serum testirao i na IgM protutijela kako bi se dokazala akutna infekcija koksijelom. Titar protutijela IgM kretao se u rasponu od 48 do 192 i ukazivao je na primarnu infekciju koksijelom. Kod tri mlađa veterinara zabilježena je asimptomatska Q-groznica, dok su sedam djelatnika koji su prvi put došli raditi na farmu na kojoj smo ustanovili seropozitivne ovce i koze, razvili kliničku sliku nespecifičnog febrilnog oboljenja

Tijekom ovog istraživanja kod tri ispitanika je primjećen visok titar IgG protutijela faze II (1024) kroz sva tri testiranja, a oni su preboljeli Q-groznicu prije 4 godine. Titar IgM protutijela na fazu II bio je negativan, a sva su trojica radili na farmi seropozitivnih stada gdje su stalno mogli biti izloženi toj infekciji. Uzrok tom trajno povišenom titru nismo mogli naći.

Jajou i suradnici također su ustanovili trajno povišen titar protutijela IgG faze I i faze II kod nekih bolesnika koji su prije četiri godine preboljeli Q-groznicu za vrijeme trajanja dobro poznate epidemije Q-groznice u Nizozemskoj. Međutim, ni oni nisu našli objašnjenje za tu pojavu (98).

Značajnije promjene registrirane su kod devet ispitanika koji su na posljednjem vađenju krvi izgubili svoj rezidualni titar 64 i postali seronegativni. Taj podatak ukazuje da te osobe nisu bile duže vrijeme u kontaktu s uzročnikom Q-groznice ili je kod njih došlo do promjene u imunosnom statusu zbog nekog razloga.

Zabilježen je i značajniji porast titra protutijela IgG faze II *C. burnetii* kod osam ispitanika, koji je uz promjene u njihovom zdravstvenom stanju, upućivao na reinfekciju.

Samo su tri ispitanika imali medicinsku dokumentaciju da su prije više od 10 godina hospitalizirani zbog Q-groznice, te kod njih možemo sa visokom sigurnošću govoriti o reinfekciji. Porast titra protutijela (od 64 na 512 i od 128 na 1024) bez značajnijih promjena u zdravstvenom stanju, zabilježen je kod pet ispitanika, međutim nismo mogli sa sigurnošću ustanoviti je li došlo do ponovne infekcije istim uzročnikom, tj. do reinfekcije. Ljudi koji žive na endemskom području Q-groznice se vrlo rano asimptomatski prokuže, a kako vrlo često i kroz duže vrijeme dolaze u kontakt s domaćim životinjama, osobito s ovcama, u većem su riziku da se ponovno razbole.

Od 38% imunološki naivnih na početku istraživanja, kod tri seronegativne osobe je nakon godinu dana došlo do serokonverzije uslijed primarne infekcije koksijelom. Kod njih je epidemiološkim anketiranjem ustanovljeno da su imali simptomatologiju karakterističnu za akutnu Q-groznicu, a serološko testiranje je tu dijagnozu i potvrdilo.

Epidemiološkim anketiranjem prokuženih osoba izdvojili smo 24 osobe koje su bile u kontaktu s ovcama i /ili kozama od rane mladosti, ali nisu imale upalu pluća, bolest sličnu gripi ili bilo kakve druge simptome koje bismo mogli povezati s Q-groznicom. S obzirom da i tijekom ovog istraživanja nisu imali promjene u svom zdravstvenom stanju, a i titar protutijela na *C. burnetii* se kretao od 64 do 128, mogli smo zaključiti da je kod njih tijekom vremena najvjerojatnije došlo do asimptomatske serokonverzije.

Asimptomatska serokonverzija je bila češće zastupljena kod profesionalno izloženih osoba muškog spola, starijih od 50 godina, iz ruralnog područja, sjevernog dijela Istre, koje su bile preko 20 godina na farmi, u kontaktu s vunom, u kontaktu s ovcama i drugim životinjama, koje su prisustvovala janjenju i/ili jarenju i konzumirale nepasterizirano mlijeko i sireve, u odnosu na druge seropozitivne osobe. Međutim, nije nađena statistička značajna razlika u izloženosti navedenim rizičnim čimbenicima između njih i drugih seropozitivnih ispitanika.

S obzirom na podjelu regije sjever/jug, profesionalno izložene osobe bile su podjednako zastupljene u obje ispitivane regije (64,4% : 59,8%). Sveukupno je profesionalno izloženih osoba bilo više u odnosu na drugu skupinu ispitanika koji nisu bili profesionalno izloženi, a osim toga profesionalno izložene osobe bile su i prokuženije bakterijom *C. burnetii* u odnosu na drugu skupinu ispitanika (72% u odnosu na 28%). Ispitanici iz druge skupine imali su na svojim individualnim gospodarstvima manja stada ovaca do 25 jedinki te manja stada koza do 7 jedinki. Važno je naglasiti da se oni nisu bavili ruralnim turizmom koji postaje sve zastupljeniji u Istri.

Obiteljska poljoprivredna gospodarstva koja imaju domaće životinje te se uz proizvodnju domaćih sireva, bave i ruralnim turizmom, predstavljaju moguću opasnost za obolijevanje od Q-groznice za ljude koji po prvi put dolaze u bliski kontakt s domaćim životinjama na tim imanjima ili konzumiraju nepasterizirano mlijeko i sireve (41).

Kontradiktorni su podaci o konzumaciji nepasteriziranog mlijeka i sireva kao rizičnih čimbenika za Q-groznicu (11, 61). Neka epidemiološka istraživanja potvrdila su da konzumacija nepasteriziranog mlijeka od inficiranih krava i koza predstavlja izvor infekcije za ljude (37). Sings i suradnici su također u svom istraživanju naglasili rizik od Q-groznice pri konzumaciji nepasteriziranog mlijeka i sireva (43). Whitney i suradnici ističu da serokonverzija može biti rezultat konzumacije nepasteriziranih mliječnih proizvoda (99). Međutim, Krumbiegl i Wisniewski nisu zapazili kod 34 dobrovoljaca koji su konzumirali kontaminirano svježe mlijeko, serokonverziju ili kliničke slučajeve bolesti (100). Maurin i Raoult su zaključili da je konzumacija nepasteriziranog mlijeka, najvjerojatnije, rijedak put za obolijevanje od Q-groznice (11). Eldin i suradnici su u svom istraživanju pokazali da je *C. burnetii* prisutna u komercijalnim mliječnim proizvodima (jogurt i sirevi) iz Francuske, ali da ne može u njima preživjeti. Ti rezultati upućuju da se Q-groznica ne može dobiti konzumacijom nepasteriziranih sireva i mlijeka (100). Stoga se postavlja opravdano pitanje je li konzumiranje tih proizvoda povezano s mogućim nastankom zaštitnog imuniteta u osoba koje su ga konzumirale, ali ne i s obolijevanjem od Q-groznice.

U ovom su istraživanju 84 (53,8%) ispitanika konzumirala nepasterizirano mlijeko i sireve, međutim nije zabilježena statistička značajna razlika učestalosti tog čimbenika za prokuženost koksijelom između njih i ispitanika koji nisu konzumirali te proizvode.

Provedeno istraživanje na području Istarske županije pokazalo je da su seropozitivni ispitanici bili starije osobe muškog spola, profesionalno izloženi u pravom smislu riječi, s preko 20 godina provedenih na farmi, češće u kontaktu s ovčama, koji su imali neku kroničnu bolest, bili pušači i imali simptome koji su odgovarali simptomima Q-groznice. Kontakt s drugim životinjama, kao što su psi, mačke i kunići nije se u ovom istraživanju pokazao kao rizični čimbenik za Q-groznicu, iako se u literaturi navode mačke i psi kao značajni rezervoari koksije u gradovima (11).

Multivarijatni logistički regresijski model je kao značajne prediktore za seropozitivne osobe izdvojio profesionalnu izloženost, pripadnost sjevernoj regiji, pušenje cigareta te prisutnost simptoma koji su bili karakteristični za Q-groznicu.

Drugi su autori također profesionalnu izloženost istakli kao jedan od najznačajnijih rizičnih čimbenika (35, 36, 38).

Iznenadjujući je podatak da su ispitanici sa sjevera bili prokuženiji u odnosu na ispitanike s južnog dijela Istre (69,1% : 55,9%), iako ta razlika u prokuženosti nije dosegla statističku značajnost (Tablica 5.3). Time nije potvrđena temeljna znanstvena pretpostavka (hipoteza) da će istraživanje pokazati statistički značajnu razliku u prokuživanju koksijelom između profesionalno eksponiranih osoba koje rade u endemskom južnom dijelu Istre u odnosu na osobe koje rade u sjevernom dijelu Istre.

Do tako značajne promjene u prokuženosti koksijelom na sjevernom dijelu Istre došlo je, najvjerojatnije, intenzivnijim razvojem stočarstva koji se bilježi od 1990. godine. Osim toga, došlo je do grupiranja većih stada ovaca i koza na jednom ograničenom području u blizini naseljenih mjesta, u sjeverozapadnom dijelu Istre, a ovim istraživanjem utvrdili smo i seropozitivnost tih stada. U pet velikih stada s tog područja registrirane su seropozitivne ovce, a u jednom stadu i seropozitivne koze. Upravo je to važan podatak koji pomaže boljem razumijevanju razlika u prokuženosti, osobito između osoba koje zbog prirode posla dolaze češće i duže u kontakt s ovcima i/ili kozama.

S obzirom da je ovo istraživanje potvrdilo prisutnost seropozitivnih stada ovaca i koza na sjevernom dijelu Istarske županije, smatramo da je potrebno intenzivirati mjere zaštite te educirati osobe o Q-groznici kako bi se bolest na vrijeme prepoznala i liječila. Bilo bi potrebno profesionalno izložene osobe Q-groznici jednom godišnje serološki testirati na *C. burnetii*, a osobito one osobe koje su u riziku da razviju kroničnu infekciju.

Važno je i naglasiti da je u ovom terenskom istraživanju sudjelovalo više ispitanika iz sjevernog dijela Istre te se postavlja opravdano pitanje koliko je to imalo utjecaj na dobivenu razliku u prokuženosti ispitanika s obzirom na pripadnost regiji (sjever/jug).

Svakako bi bilo dobro ponoviti ovo istraživanje kako bi se potvrdilo je li na sjevernom dijelu Istarske županije došlo do promjene u prokuženosti ljudi i životinja u odnosu na južni endemski dio te da je uzročnik Q-groznice prisutan na području cijele Istarske županije, ali ipak najviše u ruralnim područjima.

Linija kojom smo područje Istre podijelili na sjeverni i južni dio, prolazi geografskim središtem Istre kroz mjesto Trošti, a određeno je težištem trokuta koji spaja tri najudaljenije točke Istarskog poluotoka. Po toj podjeli područje Poreštine pripalo je sjevernoj regiji, a upravo je to područje bilo povezano s manjim epidemijama Q-groznice. Epidemiološkim

anketiranjem ispitanika, uz serološku potvrdu o njihovoj prokuženosti, opazili smo da su seropozitivni ispitanici uglavnom s područja Crvene Istre.

I podaci iz jedne analize hospitaliziranih bolesnika s potvrđenom dijagnozom Q-groznice u Općoj bolnici Pula u razdoblju od 1999. do 2008. godine, pokazali su da je od ukupno 38 hospitaliziranih osoba, većinom mlađih muškaraca, njih 24 bilo iz okolice Pule, 8 iz Vodnjana te 6 iz Poreča (49). Upravo ovi podaci potvrđuju da su na području Istarske županije registrirane manje epidemije samo na području Crvene Istre, dok ih na području Sive i Bijele Istre nije bilo. Za točnost ove tvrdnje trebalo je provjeriti u susjednoj Primorsko-goranskoj županiji je li bilo u KBC Rijeka hospitaliziranih osoba s područja Istarske županije s dijagnozom Q-groznice te je li u njihovom laboratoriju serološki potvrđena dijagnoza Q-groznice kod osoba s tog područja. Međutim, unatoč pokušaju da dođemo do tih podataka, nismo u tome uspjeli.

Osim toga nametnulo nam se opravdano pitanje imaju li tla u Istri neku povezanost s oboljenjem od Q-groznice ili su oboljenja na području Crvene Istre posljedica gušće naseljenosti, veće poljoprivredne aktivnosti te većeg broja stada ovaca i koza. Bilo bi zanimljivo provesti jedno takvo istraživanje. Moguće je da u zemlji crvenici spore koksije mogu duže opstati u odnosu na vodonepropusno flišno područje, lapor i pješčenjake u središnjoj Istri ili krško kameno tlo na sjeveroistoku Istre.

Binarnom logističkom regresijom je pušenje izdvojeno kao rizični čimbenik za seropozitivan nalaz kod ispitanika. Van der Hoek i suradnici su proučavajući rizične čimbenike u velikoj epidemiji Q-groznice u Nizozemskoj, došli do zaključka da su starija životna dob, muški spol i pušenje cigareta bili povezani sa seropozitivnim nalazom kod ispitanika (96). Ayres i suradnici su u svom istraživanju pokazali pozitivnu korelaciju Q-groznice i pušenja cigareta kod 71 bolesnika (73). Hatchette i suradnici su ustanovili, između ostalog, da pušači imaju veći rizik da obole od Q-groznice (66). I Wildman je potvrdio da je pušenje cigareta rizični čimbenik za Q-groznicu (72). Najvjerojatnije je razlog tome što se kontaminiranim rukama uzimaju cigarete što može dovesti do ingestije koksijela u organizam.

Mnogi su autori u svojim radovima naglasili važnu ulogu vjetra u obolijevanju od Q-groznice (44, 88, 101). Česti su primjeri velikog broja oboljelih ljudi na područjima izloženim vjetru koji donosi koksije s mjesta na kojem pasu zaražene domaće životinje, a nerijetko obolijevaju osobe koje žive uz puteve kojima prolaze životinje na ispašu (51). Medić i suradnici su opisali epidemiju Q-groznice među radnicima jedne tvornice u blizini

Zadra u kojoj je oboljelo 14 radnika od ukupno 110 zaposlenih. Oboljeli su samo oni radnici koji su se nalazili na sjevernom dijelu tvornice blizu prozora i u blizini ventilacijskih otvora te udisali koksijelama kontaminiran aerosol nošen sjevernim vjetrom s okolnih pašnjaka (101). Vjetrovito, toplo i suho vrijeme osobito je pogodno za širenje aerosola kontaminiranog koksijelama kojim se mogu zaraziti ljudi koji su od izvora zaraze udaljeni i više od 5 kilometara (88). Za urbane epidemije Q-groznice uvijek se navodi vjetar koji može koksije prenositi na veće udaljenosti.

U Istarskoj županiji se Q-groznicu najčešće manifestira kao blaža febrilna bolest, a rjeđe kao atipična upala pluća. Analizirajući hospitalizirane bolesnike u Općoj bolnici Pula kod kojih je potvrđena dijagnoza Q-groznice u razdoblju od 1999. do 2008. godine, Ševerdija je ustanovila da je 39% oboljelih s dokazanom Q-groznicom hospitalizirano zbog atipične upale pluća (49).

U Hrvatskoj se ističu određena područja gdje je Q-groznicu endemska, kao što su stočarski krajevi u Istri, Dalmaciji, na otocima, Gorskom kotaru i Lici, Posavini te njezinom sjeverozapadnom dijelu. Najčešće se prezentira kliničkom slikom atipične upale pluća (28).

Borčić i suradnici opisali su najveću do sada registriranu epidemiju Q-groznice u Hrvatskoj, koja se dogodila u proljeće 1983. godine na području sjeverne Hrvatske s oko 300 oboljelih. Izvor zaraze bile su ovce uvezene iz Bosne (102).

Mulić i suradnici su opisali epidemiološke karakteristike Q-groznice u Hrvatskoj analizirajući razdoblje prije i poslije Domovinskog rata. Zaključili su da je došlo do promjena u geografskoj distribuciji bolesti. Sisačko-moslavačka županija je prije rata imala najviši pobol, što je bilo povezano s ovčama koje su prelazile granicu zbog ispaše, dok je u poslijeratnom razdoblju najveći pobol zabilježen u Splitsko-dalmatinskoj županiji, najvjerojatnije zbog ilegalne ispaše ovaca u toj županiji (103).

Morović i suradnici analizirali su hospitalizirane bolesnike s dijagnozom Q-groznice u Zadru od 1994. do 2002. godine te zabilježili porast incidencije od 0,87/100 000 na 3,44/100 000 stanovnika uslijed dvije velike epidemije u sjevernoj i srednjoj Dalmaciji (104).

Do sada u Hrvatskoj nisu objavljene studije o seroprevalenciji Q-groznice kod profesionalno eksponiranih osoba te u tom pogledu zaostajemo za svjetskom literaturom u kojoj su mnogi autori istaknuli i opisali različite profesije kao rizične čimbenike za Q-groznicu (93, 94, 95, 97, 99).

U endemskom području sjeverne Italije je serološkom metodom ELISA ustanovljena seroprevalencija od 43,7% kod ovčara (93). Istom metodom je kod 39% poljoprivrednika

registrirana prisutnost protutijela na *C. burnetii* (94).

Whitney i suradnici su istražujući profesionalni rizik od infekcije koksijelom kod 508 američkih veterinara te rizične čimbenike povezane s njihovom seropozitivnošću, izvjestili o seroprevalenciji od 22,2% što je znatno više od stope prevalencije odraslih osoba u američkoj populaciji. Kao značajne rizične čimbenike uočili su sudjelovanje u liječenju goveda, svinja i divljih životinja, duži boravak na farmi, kontakt sa stajaćom vodom (bare, umjetna jezera, ribnjaci), srednju životnu dob (46 godina) te nekorištenje zaštitne maske i odjeće (99). Opisani su slučajevi oboljenja britanskih vojnika 1974. godine i švedskih vojnika u 1975./76. godini koji su bili razmješteni u mirovnoj misiji na Cipru, također endemskom području za Q-groznicu (105).

Loukaides i suradnici su u svom istraživanju na Cipru ustanovili visoku prevalenciju seropozitivnih među stanovnicima (44,4%) i domaćim životinjama (ovce, koze) (13,8%), kao i visoku proporciju subkliničkih slučajeva kod domaćeg stanovništva (105).

Wattian i suradnici su izvjestili o vrlo visokoj seroprevalenciji Q-groznice kod 69 radnika u jednoj tvornici u Belgiji, koji su tijekom pranja i obrade, bili direktno izloženi ovčjoj vuni i kozjim dlakama. Trogodišnja kumulativna seroprevalencija iznosila je 16,7%, što predstavlja nepobitan dokaz da se radi o tipičnoj profesionalnoj bolesti. Ovi rezultati ukazuju da kontinuirana izloženost patogenu kakav je koksijela može dati atipične imunosne odgovore koji mogu dovesti do kronične infekcije ili relapsa bolesti bez kliničke simptomatologije (106).

I u našem je istraživanju kontakt s vunom bio jedan od značajnijih rizičnih čimbenika za prokuženost koksijelom, iako nije posebno odvojen kontakt s vunom u odnosu na kontakt sa sijenom. Ispitanici koji žive i rade u južnom dijelu Istre više su bili u kontaktu s vunom i/ili sa sijenom.

Wilson i suradnici su opisali epidemiju Q-groznice među radnicima u klaonici iz godine 2006. kada je ustanovljeno 110 oboljelih (107).

Iz svega ovoga može se zaključiti da je potrebno provoditi godišnja serološka testiranja radnika koji su profesionalno izloženi koksijelama kako bi se na vrijeme otkrile promjene u serološkom statusu, a koje bi ukazivale na razvoj kronične infekcije koja može biti po život opasno stanje. S druge strane, na takvim radnim mjestima gdje su zaposlenici kontinuirano izloženi mogućoj infekciji koksijelama, ne bi se smijeje zapošljavati trudnice, osobe s oštećenim srčanim zaliscima, aneurizmom aorte, kao niti imunokompromitirane osobe.

Unazad nekoliko godina, zahvaljujući općem napretku medicine povećao se broj starijih

osoba, kroničnih bolesnika te imunokompromitiranih osoba. Te su osobe sklonije infekciji i u kontaktu s koksijelom mogu prije oboljeti u usporedbi s imunokompetentnim osobama. Rano postavljena dijagnoza i pravovremeni početak terapije vrlo su značajni za prognozu oboljelih od Q-groznice kako bi se prevenirao razvoj kronične infekcije, kao i komplikacije koje su čest pratilac infekcije koksijelom.

Ovo je istraživanje pokazalo da je infekcija koksijelom dosta proširena te da su u riziku od obolijevanja od Q-groznice profesionalno eksponirane osobe, ali i čitavo stanovništvo ovog područja. Moguće je obolijevanje i turista koji posjećuju područje Istre, a to uvijek predstavlja neugodnu situaciju za turizam u Istri.

Iako je ovo istraživanje obogatilo naša temeljna epidemiološka saznanja o ovoj bolesti, treba priznati da ono ima i određenih nedostataka. To se u prvom redu odnosi na serološki test (IFA) koji je korišten u istraživanju, koji je visoko osjetljiv i specifičan, no kako je vrijeme od uzorkovanja krvi do konačne analize seruma bilo dosta dugo, to je moglo utjecati na nižu pouzdanost dobivenih seroloških rezultata. Značenje serološkog nalaza kao potvrde infekcije treba pažljivo protumačiti u sklopu kliničke slike, anamnestičnih i epidemioloških podataka. Osim specifičnosti i osjetljivosti serološkog testa, njegovih referentnih vrijednosti, lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata, za pravilnu interpretaciju serološkog nalaza, važno je i vrijeme od uzorkovanja krvi do konačne analize seruma.

Osim toga, poznata je pojava imunoloških nereaktora, tj. osoba koje ne reagiraju stvaranjem protutijela, iako su došle u kontakt s koksijelom. To se moglo uočiti i kod nekih ispitanika koji su bili u vrlo visokom riziku obolijevanja od Q-groznice zbog čestog i dužeg izlaganja koksijeli, ali su tijekom ovog istraživanja ostali seronegativni.

Stvaranje specifičnih protutijela ovisi o sposobnosti osobe da reagira na infekciju, o različitoj antigenoj strukturi koksijela, te njezinoj različitoj geografskoj rasprostranjenosti.

Nadalje, u ovom terenskom istraživanju sudjelovalo je više ispitanika iz sjevernog dijela Istre, a također je bilo s tog područja i više ovaca i koza. Stoga se postavlja opravdano pitanje je li to bitno utjecalo na rezultat prokuženosti ispitanika, s obzirom da se sjeverni dio Istre pokazao prokuženijim bakterijom *C.burnetii*.

I serološko testiranje pojedine životinje unutar stada pokazuje određena ograničenja. Nalaz seronegativne životinje ne mora značiti da ona nije bila u kontaktu s koksijelom, kao što ni seropozitivan nalaz nije objektivan pokazatelj bolesti kod životinje. Neke životinje ostaju seropozitivne i dugi niz godina nakon akutne infekcije kao dokaz prijašnje infekcije,

dok neke uopće ne stvore protutijela. Od posebnog je značaja spoznaja da koksije mogu u okolinu izlučivati i seronegativne životinje (57).

Da bi se dokazala bolest u stadu, uz serološku dijagnostiku, uzročnika je potrebno dokazati i pomoću molekularne dijagnostike (108). PCR metoda, primijenjena na vaginalni bris, upotrebljava se za identifikaciju bakterije *C. burnetii* i daje pouzdan odgovor radi li se o aktualnoj ili prošloj infekciji. Serološke metode prikladne su za dijagnostiku na razini stada. Ako je jedna životinja u stadu pozitivna, onda se cijelo stado smatra pozitivnim.

Prisutnost specifičnih protutijela protiv bakterije *C. burnetii* nađena je u 34 uzoraka krvi ovaca od ukupno 548 testiranih te kod tri uzorka krvi koza od ukupno 86 testiranih, odnosno ustanovljeno je 6,2% pozitivnih ovaca i 3,5 % pozitivnih koza. Velik broj pozitivnih životinja (ovce, koze) nalazio se na području unutar 5 km od naseljenih mjesta.

Prevalencija seropozitivnih ovaca unutar pet pozitivnih stada bila je 1,3%; 3,2%; 2,3%; 1% i 0,5%. Statističkom analizom rizičnih čimbenika koji povećavaju vjerojatnost da životinje budu seropozitivne ustanovljeni su lošiji higijenski uvjeti na farmi, sjeverna regija Istre, veće stado te prisutnost koza koje pokazuju veću osjetljivost na infekciju koksijelama u odnosu na ovce.

Van den Brom i suradnici također su ustanovili da su koze podložnije infekciji koksijelom u odnosu na ovce, a isto zapažanje potvrdili su i drugi autori (59, 66). Loukaides sa suradnicima je dokazao da koze na Cipru imaju najveći postotak seropozitivnosti na bakteriju *C. burnetii* u odnosu na mnoge države u svijetu, ali da su epidemije u ljudi najčešće uzrokovane izloženosti ovcima (105).

Na sjevernom dijelu Istre ovce su bile zastupljenije u većim stadima, a koze u manjim stadima. Lošiji higijenski uvjeti na farmi prisutni su bili samo kod ovaca u 15,3% slučajeva i to samo na južnom dijelu Istre. Serološkim testiranjem ustanovljeno je da je 65 % vlasnika ovaca i 47,8% vlasnika koza bilo seropozitivno.

Ljudi koji su u kontaktu s domaćim životinjama na farmama imaju visoku stopu seroprevalencije, također i u zemljama gdje je Q-groznica rijetka bolest, kao što je to u Sjedinjenim Američkim Državama (99) ili gdje nikada nisu opisane epidemije Q-groznice, kao što je to u Danskoj (109).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su utjecaj pojedinih čimbenika životinja na seropozitivan nalaz vlasnika životinja, što može ukazivati na međuzavisnost prokuženosti u ljudi i životinja.

Istraživanje je pokazalo veću vjerojatnost zaražavanja ljudi koji žive na sjevernom dijelu Istre (OR=105,71), koji su u kontaktu sa životinjama iz većeg stada (OR=21,60), imaju lošije higijenske uvjete na farmi (OR=2,63) te češće dolaze u kontakt s ovcima starije životne dobi (> 6 godina) (OR=11,33). Veća stada predstavljaju veći rizik od kontakta s koksijelom jer je veća prisutnost osjetljivih jedinki životinja u stadu.

Ovce i koze kod kojih su nađena protutijela protiv *C. burnetii* bile su iz područja gdje su epidemije Q-groznice već bile registrirane. Seropozitivni nalazi kod ovaca zabilježeni su samo u dva područja (područje sjeverno od Poreča te područje oko Raše), dok je seropozitivan nalaz kod koza registriran samo na području sjeverno od Poreča.

S obzirom na otežan pristup i nemogućnost da se sve ovce i koze koje su bile obuhvaćene ovim istraživanjem ponovno testiraju nakon godine i pol dana te tako ustanovi eventualna dinamika titra protutijela, odlučili smo retestirati samo one ovce i koze sa seropozitivnim nalazima. Od 37 seropozitivnih životinja, uspjeli smo pronaći samo njih 11, i to 10 ovaca i jednu kozu, iako smo prethodno bili upozorili vlasnike da posebno obrate pozornost na te seropozitivne životinje. Serološko testiranje istom metodom pokazalo je kod 4 ovce značajnije povećanje koncentracije protutijela, što bi ukazivalo na ponovni kontakt s koksijelom, kod dvije ovce i i jedne koze zabilježen je značajniji pad količine protutijela, dok su četiri ovce imale istu količinu protutijela. Međutim, s obzirom na mali broj životinja koje su ponovno testirane, nije se mogao dati pouzdan zaključak o dinamici prirodno stečenog imuniteta tih životinja.

U Hrvatskoj je provedeno nekoliko istraživanja u kojima su izneseni podaci o seropozitivnim domaćim preživačima. Kovačić i Borčić su od 1984. do 1986. godine na području većeg dijela Hrvatske prikupili uzorke krvi domaćih preživača (ovce, koze i goveda) koji su ili pobacili ili su se uzorci krvi uzimali u sklopu godišnje kontrole na brucelozu te ih testirali na prisutnost protutijela protiv *C. burnetii*. Od ukupno 1001 uzorka krvi ovaca, 193 ili 19,2% je bilo pozitivno na *C. burnetii*, kod koza je od ukupno 1632 uzoraka krvi 335 ili 21,9% bilo pozitivno, a kod goveda je od 1316 uzoraka krvi 308 ili 23,6% bilo pozitivno na *C. burnetii* (31). Ovim istraživanjem nije bilo obuhvaćeno područje Istre.

Tijekom 2008. godine je na području Istarske županije metodom RVK na Q-groznicu pretražen 1161 uzorak seruma domaćih preživača (ovce, koze i goveda) te je ustanovljeno 9,16% pozitivnih ovaca i koza, dok kod goveda nisu nađena specifična protutijela na *C. burnetii*. To što su goveda bila negativna na Q-groznicu ne mora značiti da je došlo do

nestanka bolesti u ovih preživača. Objašnjenje može biti to da se stočari pridržavaju propisanih mjera o zabrani kohabitacije goveda i malih preživača, ili je uzorak od svega 69 seruma goveda bio suviše mali u odnosu na 1092 uzorka seruma ovaca i koza (41).

Slične studije u svijetu pokazale su prisutnost protutijela na *C.burnetii* kod ovaca. U Velikoj Britaniji seropozitivnost ovaca bila je 0,9% (110), u Švicarskoj 3,9% (111), u Crnoj Gori 5,03% (112), u istočnom dijelu Turske 10,5% (113), te 20,4% u sjevernoj Grčkoj (114).

Berri i suradnici su došli do zaključka da i seronegativne ovce izlučuju koksije u okoliš. Kao razlog tome navode oslabljen humoralni imunitet protiv koksijela uslijed lokalizacije bakterija u posteljici ili maternici ovce što nije aktiviralo sistemsku protutijela (57). Osim toga inficirane ovce mogu i tijekom normalne parturicije izlučivati koksije u velikom broju te tako kontaminirati okolinu (57). Stoga je od velike važnosti redovito provoditi higijenske mjere na farmama te koristiti zaštitna sredstva u kontaktu sa životinjama.

U nekoliko država je provedeno istraživanje seroprevalencije koksijela u koza. U sjevernoj Grčkoj je seroprevalencija *C. burnetii* u koza bila 6,5%, u Španjolskoj 8,7%, u Albaniji 8,8%, u sjevernoj Irskoj 9,3%, na Sardiniji 13% te 21,4% u Nizozemskoj (115).

Georgiev je sa suradnicima prikazao podatke o prevalenciji *C.burnetii* među domaćim preživačima koja se razlikovala ovisno o životinjskoj vrsti i geografskom području. U razdoblju od 1982. do 2010.godine seroprevalencija u goveda u četiri europske države bila je 20,8% u Bugarskoj, 19,3% u Njemačkoj, 15% u Francuskoj i 4% u Nizozemskoj, kod ovaca je bila 56,9% u Bugarskoj, 20% u Francuskoj, 8,7 % u Njemačkoj i 3,5% u Nizozemskoj, a kod koza 88,1% u Francuskoj, oko 40% u Bugarskoj, 7,8% u Nizozemskoj te 2,5% u Njemačkoj (116).

Guatteo i suradnici su dali metaanalizu radova o prevalenciji *C. burnetii* infekcije u domaćih preživača. Pregledavši 69 objavljenih radova na tu temu, ukazali su na neke nedostatke u provođenju pojedinih istraživanja, prvenstveno nedosljednosti u primjeni različitih seroloških testov te nemogućnosti uspoređivanja prevalencije između različitih životinja i područja gdje se one nalaze. Istaknuli su i nedostatak opisa strategije uzorkovanja, što sve zajedno otežava dobivanje točnije procjene prevalencije Q-groznice (115). Çetinkaya i suradnici su u svom radu pokazali statistički značajnu povezanost između seropozitivnih ovaca i podataka o pobačaju. Seropozitivne ovce bile su s područja istočnog dijela Turske (113).

Schimmer i suradnici su ustanovili veći rizik serokonverzije među kozama koje su bile na farmama s više od 800 jedinki u odnosu na farme s manjim brojem koza (117), što pokazuje kako se lako prenosi uzročnik Q-groznice među životinjama koje se nalaze u većem broju na jednom području, često zbijene u stadu i u neadekvatnim životnim uvjetima.

Vučemilo i suradnici istaknuli su značaj smještaja i dobrobiti životinja na farmama te njihov utjecaj na zdravlje životinja, vezano uz novi pravilnik o uvjetima kojima moraju udovoljavati farme te uvjetima za zaštitu životinja (Pravilnik o zaštiti životinja koje se uzgajaju u svrhu proizvodnje, NN 44/2010). Obveze vlasnika su svakodnevno hranjenje i napajanje životinja, držanje u optimalnim mikroklimatskim uvjetima i u prostoru koji im omogućava povoljne uvjete za život (118).

Na temelju čl. 37, stavka 4, Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06), Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donijelo je Pravilnik o uvjetima kojima moraju udovoljavati farme i uvjetima za zaštitu životinja na farmama. Tim pravilnikom propisano je da prostori u kojima borave životinje moraju biti odgovarajuće osvijetljeni, optimalne temperature i vlažnosti zraka uz omogućeno strujanje zraka kako bi koncentracija plinova i prašine bila u granicama koje nisu štetne za životinje. Životinje moraju imati dovoljno prostora za kretanje, a još važniji je postupak sa životinjama. Iako se ovim pravilnikom zabranjuju metode intenzivnog i ekstenzivnog uzgoja koje mogu životinjama prouzročiti nepotrebne patnje ili štetno djelovati na njihovo zdravlje, na žalost, to se u praksi ne poštuje.

Tijekom ovog istraživanja moglo se vidjeti da na nekim farmama životinje žive u neadekvatnim uvjetima. Prevelika napučenost na pojedinim farmama te loši higijenski i mikroklimatski uvjeti predstavljaju opasnost za zdravlje životinja. U tako skućenom prostoru životinje su u stresu, postaju nervozne i češće se ozlijeđuju, podložnije su bolestima, a i stopa smrtnosti životinja je veća.

Intenzivni uzgoj životinja se već dugo povezuje s velikim epizootijama, ali i sa pojavom epidemija Q-groznice u ljudi.

Velika epidemija Q-groznice u Nizozemskoj bila je povezana s intenzivnim uzgojem koza u blizini gusto naseljenih područja i ostala najbolji primjer kako je briga i adekvatna skrb o životinjama neophodna i značajna i zbog zdravlja ljudi, osobito ako se naseljena mjesta nalaze u blizini farmi i pašnjaka. Međutim i okolišni čimbenici su imali značajnu ulogu u ovoj epidemiji. Tamo gdje je bila veća gustoća vegetacije i podzemnih voda nije došlo do prijenosa koksijela na ljude (88). Poznato je da je dinamika širenja koksije kod preživača pod utjecajem okoliša, kao što su vegetacija, tlo, vlaga te otpadne vode.

Budući da je ovim istraživanjem uzeto svega 634 uzoraka krvi ovaca i koza slučajnim odabirom iz 66 stada, možemo pretpostaviti da je broj seropozitivnih životinja značajno veći, imajući u vidu da broj životinja obuhvaćenih ovim istraživanjem čini svega 3,27% od ukupnog broja ovaca i koza registriranih na području Istarske županije. Za nas je ovo jasna dimenzija problema Q-groznice na istraživanom području.

To da su stvarne dimenzije problema veće no što smo ovdje egzaktno uspjeli dokazati opravdava se i činjenicom da su i druge vrste poput goveda, pasa, mačaka, krpelja i drugih podložne ovoj infekciji, što svakako opravdava jedno buduće opsežnije istraživanje ovog problema.

Istraživanje je potvrdilo prisutnost uzročnika Q-groznice na cijelom području Istarske županije, a ne samo na njezinom južnom endemskom dijelu. Potvrđeno je da su na području Istre ovce najznačajniji rezervoar ove infekcije. S obzirom da se koksije ne mogu eradicirati s ovog područja, adekvatno znanje o ovoj zoonози te mjere zaštite uveliko će pomoći da se komplikacije ove bolesti svedu na najmanju moguću mjeru. U prevenciji i suzbijanju Q-groznice kod stoke značajnu ulogu imaju veterinarske mjere u smislu liječenja životinja antibioticima, s obzirom da se cijepljenje životinja kod nas još uvijek ne provodi.

Epidemiološka istraživanja infekcija u životinja su važna jer na taj način proširujemo spoznaje s ciljem spriječavanja infekcije u ljudi (112). Dobra suradnja veterinarske i zdravstvene struke posebno je značajna imajući u vidu cilj smanjenja širenja ove infekcije sa životinja na ljude, što se može postići, između ostalog, kontrolom infekcije kod životinja ali još više edukacijom profesionalno eksponiranih osoba.

Daljnja istraživanja Q-groznice trebala bi uključiti veći broj ispitanika te ustanoviti prokuženost stanovnika cijele Istarske županije kako bi se dobila prava slika prokuženosti koksijelom. Svakako je važno da se diferencijalno dijagnostički isključi Q-groznica u endemskom području kod svakog slučaja neobjašnjive povišene temperature, osobito ako se javlja nakon kontakta s domaćom životinjom.

Sa stanovišta kako klinike, tako i patogeneze te imunološkog odgovora inficiranog domaćina Q-groznica još uvijek predstavlja svojevrsni mistični medicinski entitet koji zahtjeva daljnja istraživanja.

7. ZAKLJUČAK

1. Na sjevernom dijelu Istre ispitanici su prokuženiji u odnosu na ispitanike s južnog dijela, no razlika se nije pokazala statistički značajnom. Time je opovrgnuta polazna hipoteza ovog istraživanja.

2. Prokuženost na uzročnika Q-groznice ustanovljena je kod ispitanika na području cijele Istarske županije, a ne samo na endemskom južnom dijelu.

3. Kumulativna incidencija, tj. apsolutni rizik za razvoj infekcije s *C. burnetii* u ovoj prospektivnoj studiji je 16,67% za profesionalno izložene osobe, dok je kod ispitanika koji nisu profesionalno izloženi 3,33%. Relativni rizik (RR) u odnosu ove dvije skupine je 5,1, što znači da su profesionalno izložene osobe u 5 puta većem riziku od obolijevanja u odnosu na drugu skupinu ispitanika.

4. Statistički značajni rizični čimbenici za prokuženost koksijelom kod ispitanika su profesionalna izloženost, boravak na farmi više od 20 godina, pripadnost muškom spolu, kontakt s ovčama, pridružena kronična bolest te pušenje.

5. Iz multivarijatnog logističkog regresijskog modela se kao značajni prediktori za seropozitivne osobe na području Istre izdvajaju profesionalna izloženost, pušenje, boravak na farmi više od 20 godina te pripadnost sjevernoj regiji Istarske županije.

6. Značajni prediktori za seropozitivne životinje su loši higijenski uvjeti na farmi, veća stada, sjeverna regija Istarske županije te vrsta životinje (koza). Koze pokazuju veću osjetljivost na infekciju *C.burnetii*.

7. Preboljenje Q-groznice ne stvara doživotni imunitet. Moguće su reinfekcije, osobito u uvjetima duže i češće profesionalne izloženosti.

8. Granica između južnog endemskog i sjevernog dijela Istre ne postoji, te se kod bolesnika s nespecifičnom febrilnom bolešću, osobito u sezoni kasne zime, proljeća i početka ljeta na području cijele Istarske županije treba uvijek diferencijalno dijagnostički misliti i na Q-groznicu, osobito kod profesionalno izloženih osoba.

8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

Cilj ovog prospektivnog seroepidemiološkog istraživanja bio je istražiti dinamiku prokuživanja bakterijom *C. burnetii* kod profesionalno izloženih osoba u južnom endemskom području Istre u odnosu na sjeverni dio Istarske županije te utvrditi moguću međuzavisnost pojavnosti infekcije koksijelom u ljudi ovisno o prokuženosti u životinja (ovce i koze).

U razdoblju od 2014. do 2016. godine, 156 ispitanika smo jednom godišnje testirali na prisutnost specifičnih protutijela IgG faze II *C. burnetii* metodom indirektna imunofluorescencije (IFA). Prisutnost protutijela protiv *C. burnetii* kod 634 ovaca i koza s različitih područja Istarske županije utvrđena je imunoenzimskim indirektnim testom (ELISA).

Sveukupna seroprevalencija ispitanika bila je 64,1%. Na južnom dijelu bilo je 33 (55,9%) seropozitivnih ispitanika, a na sjevernom 67 (69,1%). Praćenjem dinamike titra protutijela kod 88 (88%) seropozitivnih osoba nije došlo do značajnijih promjena u visini titra, dok je kod 9 (9%) ispitanika došlo do gubitka rezidualnog titra, a kod 3 (3%) je zabilježena reinfekcija. Od 59 (38%) seronegativnih osoba, tijekom istraživanja zabilježeno je kod 3 (5%) ispitanika primoinfekcija koksijelom. Na sjevernom dijelu Istre ispitanici su bili prokuženiji u odnosu na ispitanike iz južnog dijela (69,1% : 55,9%), čime je opovrgnuta hipoteza ovog istraživanja. Najznačajni rizični čimbenici za obolijevanje od Q-groznice na području Istre su *profesionalna izloženost* s omjerom izgleda OR=6,37 (95% CI 2,04-19,86; p=0,001), *pušenje cigareta* OR=4,97 (95% CI 1,66-14,87; p=0,004), *više od 20 godina boravka na farmi* OR=3,63 (95% CI 1,34-9,80; p=0,011) te *pripadnost sjevernoj regiji Istre* OR=3,22 (95% CI 1,24-8,40; p=0,016). Binarni logistički model seropozitivnog nalaza u ispitanika s obzirom na kontakt sa životinjama (ovce/koze) pokazuje da su veći izgledi za infekciju koksijelom kod onih ljudi koji žive u sjevernom dijelu Istre (OR=3,09), koji su u kontaktu sa životinjama iz većeg stada (OR=2,73), koji rade na farmama s lošijim higijenskim uvjetima (OR=2,56) te koji su u kontaktu s ovcama (OR=2,11).

Granica između južnog endemskog i sjevernog dijela Istre, što se Q-groznice tiče, ne postoji, te se kod bolesnika s nespecifičnom febrilnom bolešću, osobito u kasnu zimu, proljeće i početak ljeta na području cijele Istarske županije treba uvijek diferencijalno dijagnostički misliti na Q-groznicu, osobito kod profesionalno izloženih osoba.

9. SUMMARY

Title: Dynamics of naturally acquired immunity against *Coxiella burnetii* in professionally exposed persons in the endemic part of Istria

Author: Branka Sep-Severdija

Year: 2022

The aim of this prospective sero-epidemiological study was to investigate the dynamics of naturally acquired immunity to *C. burnetii* in professionally exposed subjects in the southern endemic part of Istria compared to those from the northern part of the Istrian Region. The second aim was to determine the interdependence of *Coxiella* infection in humans by reference to immunity in animals (sheep and goats).

156 participants were tested once yearly in the period 2014 – 2016 for the presence of IgG phase II specific antibodies to *C. burnetii* using the indirect immunofluorescence method (IFA). The presence of antibodies to *C. burnetii* in 634 sheep and goats from different parts of the Istrian Region was determined by the indirect enzyme immunoassay (ELISA).

The overall seroprevalence of participants was 64,1%. In the southern part there were 33 (55,9%) seropositive subjects and in the northern one there were 67 (69,1%). The monitoring of the dynamics of antibody titres showed no significant changes in titre in 88 (88%) seropositive persons, whereas in 9 (9%) persons the loss of residual titre has been proven and 3 (3%) had reinfection. Of the 59 (38%) seronegative persons, in the course of the study 3 (5%) had a *Coxiella* primo-infection. In the northern part of Istria acquired immunity was more prevalent compared to the southern part (69,1%:55,9%). Thereby the hypothesis of this study was rejected. The most important risk factors for contracting Q fever in Istria are *professional exposure* with a OR=6,37 (95% CI 2,04-19,86; p=0,001), *cigarette smoking* OR=4,97 (95% CI 1,66-14,87; p=0,004), *more than 20 years stay on the farm* OR= 3,63 (95% CI 1.34-9,80; p=0,011) and *residence in the northern part of Istria* OR=3,22 (95% CI 1,24-8,40; p=0,016). The binary logistical model of seropositive findings in study subjects with respect to contact with animals (sheep/goats) shows greater probability of *Coxiella* infection in persons living in the northern part of Istria (OR=3,09), those in contact with animals from a larger herd (OR=2,73), those working on the farms with poor hygienic conditions (OR=2,56) and those being in contact with sheep (OR=2,11).

There is no clear boundary between the southern, endemic part and the northern part of Istria regarding the current local epidemiology of Q fever. Therefore, for patients with nonspecific febrile illness, especially during the late winter, spring and at the beginning of summer, the possibility of Q fever should always be considered in the entire Region of Istria. The risk for disease among humans is especially pronounced among professionally exposed persons.

10. LITERATURA

1. Hilbnik F, Penrose E, Kovacova E, Kazar J. Q fever is absent from New Zealand. *Int J Epidemiol.* 1993;22:945-9.
2. Marrie TJ, Raoult D. *Coxiella burnetii* (Q fever). U: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, ur. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Inc; 2015. Str. 2208-16.
3. Byrne WR. Q fever. U: Sidell FR, Takafugi ET, Franz DR, ur. Medical aspects of chemical and biological warfare. Washington: DC:TMM Publications; 1997. Str. 523-37.
4. Kuzman I. *Coxiella burnetii* (Q-groznica). U: Begovac J, Božinović D, Lisić M, Barišić B, Schönwald S, ur. Infektologija. Zagreb: Profil; 2006. Str. 546-50.
5. Arsić B. Q-groznica. U: Birtašević B, Dorđević D, Arsić B, Obradović M, Drndarević D, Ropac D i sur., ur. Vojna epidemiologija. Beograd: Vojnoizdavački i novinski centar; 1989. Str. 307-18.
6. Spicer J. Military significance of Q fever. *J R Soc Med.* 1978;71:762-7.
7. Maretic Z, Borovečki I, Ogrizek M. Un epidemia di febbre Q a Pola e dintorni nel 1969. *G Mal Infett Parass.* 1971;23:950-4.
8. Williams JC, Thompson HA, ur. Q fever: the biology of *Coxiella burnetii*. Boston: CRC Press Boca Raton; 1991.
9. Gürtler L, Bauerfeind U, Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, i sur. *Coxiella burnetii*-pathogenic agent of Q (query) fever. *Transfus Med Hemother.* 2014;41:60-72.
10. Tan CK, Owens L. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis Aquat Org.* 2000;41(2):115-22.
11. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:518-53.
12. Porter SR, Czaplicki G, Mainil J, Guattéo R, Saegerman C. Q fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *Int J Microbiol.* 2011; 2011:1-22.
13. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.

14. Miller JD, Shaw EI, Thomson HA. *Coxiella burnetii*, Q Fever and Bioterrorism. U: Anderson B, Friedman H, Bendinelli M, ur. Microorganisms and Bioterrorism. New York: Springer; 2006. Str. 181-208.
15. Hrabar, A. Prilog epidemiologiji Q-groznice u Hrvatskoj [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 1967.
16. Eldin C, Melenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, i sur. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. Clin Microbiol Rev. 2017;30:115-90.
17. Raoult D, Marrie TJ, Mege JL. Natural history and pathophysiology of Q fever. Lancet Infect Dis. 2005;5(4):219-26.
18. Southwick FS. Emerging bacterial infections: including zoonotic pathogens and biological weapons. U: Southwick FS, ur. Infectious diseases: a clinical short course. New York: McGraw-Hill Education; 2014. Str. 350-2.
19. Roman MJ, Coriz PD, Baca OG. A proposed model to explain persistent infection of host cells with *Coxiella burnetii*. J Gen Microbiol. 1986;132:1415-22.
20. Raoult D, Mege JL, Marrie T. Q fever: queries remaining after decades of research. U: Scheld MW, Craig WA, Huges JM, ur. Emerging Infections 5. Washington: DC. ASM Press; 2001. Str. 29-56.
21. Fiset P, Woodward TE. Q fever. U: Evans AS, Feldman HA, ur. Bacterial infections of humans. New York: Plenum Medical Book Company; 1982. Str. 435-48.
22. Tissot-Dupont H, Vaillant V, Rey S, Raoult D. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. Clin Infect Dis. 2007;44(2):232-7.
23. Harris RJ, Storm PA, Lloyd A, Marmion BP. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. Epidemiol Infect. 2000;124:543-9.
24. Dellacasagrande J, Ghigo E, Hammami SM, Toman R, Raoult D, Capo C, i sur. Alpha (α) beta (β) integrin and bacterial lipopolysaccharide are involved in *Coxiella burnetii*-stimulated production of tumor necrosis factor by human monocytes. Infect Immun 2000;68: 5673-78.
25. Chen C, Banga S, Martens K, Weber MM, Gorbaslieva I, Tan Y, i sur. Large- scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii*. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107(50):21755-60. doi:10.1073/pnas.1010485107
26. Sandoz KM, Popham DL, Beare PA, Sturdevant DE, Hansen B, Nair V, i sur. Transcriptional profiling of *Coxiella burnetii* reveals extensive cell wall remodeling in the

- small cell variant developmental form. PloS One [Internet]. 2016 Feb 24 [pristupljeno 14.07.2018.];11(2):e0149957. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149957>
27. Salmon MM, Howells B, Glencross E, Evans A, Palmer S. Q fever in an urban area. Lancet. 1982;1:1002-4.
 28. Ropac D. Zoonoze. U: Ropac D, Puntarić D, Aleraj B, Gjenero- Margan I, Vodopija I, Bakašun V. i sur.,ur. Epidemiologija zaraznih bolesti. Zagreb: Medicinska naklada; 2003.Str. 306-10.
 29. Marrie TJ, Durant H, Williams JC, Mintz E, Waag DM. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. J Infect Dis. 1988;158:101-8.
 30. Fishbein DB, Raoult D. A cluster of *C. burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. Am J Trop Med Hyg. 1992;47:35-40.
 31. Kovačić H, Borčić B. Q-groznica u domaćih životinja i ljudi. Veterinarska stanica. 1988; 19:466-71.
 32. Borčić B. Epidemiologija zaraznih bolesti. Zagreb: Odabrana poglavlja; 1998.
 33. Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. Emerg Infect Dis. 2001;7:789-796.
 34. Leone M, Honstetter A, Lepidi H, Capo C, Bayard F, Raoult D, i sur. Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17 β -estradiol. J Infect Dis. 2004;189(2):339-45.
 35. Van Woerden HC, Mason BW, Nehaul LK, Smith R, Salmon RL, Healy B, i sur. Q fever outbreak in industrial setting. Emerg Infect Dis. 2004;10:1282-9.
 36. Reid A, Malone J. Q fever in Ireland. A seroprevalence study of exposure to *Coxiella burnetii* among Department of agriculture workers. Occup Med (Lond). 2004;54:544-7.
 37. Dorko E, Kalinová Z, Weissová T, Pilipčinec E. Seroprevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among employees of the Veterinary University in Košice, eastern Slovakia. Ann Agric Environ Med. 2008;15:119-24.
 38. Alonso E, Lopez-Etxaniz I, Hurtado A, Liendo P, Urbaneja F, Aspritzaga, i sur. Q fever outbreak among workers at a waste-sorting plant. PloS One [Internet]. 2015 Sep 3 [pristupljeno 20.07.2018.];10(9):e0138817. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138817>
 39. Abe T, Yamaki K, Hayakawa T, Fukuda H, Ito Y, Kume H, Komiya T, i sur. A seroepidemiological study of the risks of Q fever infection in Japanese veterinarians. Eur J Epidemiol. 2001;17:1029-32.
 40. Pruknet-Radovčić E, i sur. Godišnje izvješće o zoonozama u Hrvatskoj za 2015./16. godinu [Internet]. Hrvatska agencija za hranu (HAH) [pristupljeno 13.07.2018.]. Dostupno na: <https://www.hah.hr/>

<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/godisnje-izvjesce-o-zoonozama-u-hrvatskoj/>

41. Nemarić N. Pojavnost Q-groznice u Sjevernom hrvatskom primorju i Gorskoj Hrvatskoj u 2008. godini [diplomski rad] Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet; 2009.
42. Hengl B, Špičić S, Duvnjak S, Reil I, Kazačinski L, Humski A, i sur. Prisutnost *Coxiella burnetii* u sirovom mlijeku iz mljekomata u Republici Hrvatskoj. Veterinarska stanica. 2017;48:393-8.
43. Signs KA, Stobierski MG, Gandhi TN. Q fever cluster among raw milk drinkers, Michigan, 2011. Clin Infect Dis. 2012;55:1387- 9.
44. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. Emerg Infect Dis. 2004;10:1264-9.
45. Bertoša M, Matijašić R, ur. Istarska enciklopedija. Zagreb: Leksikografski zavod "Miroslav Krleža"; 2005. Geomorfologija Istre; str. 249.
46. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001-Istarska županija; [ažurirano 18.07.2018; pristupljeno 12.8.2018.]. Dostupno na: (https://hr.wikipedia.org/wiki/Istarska_županija)
47. Maretić Z, Vesenjanić J. Q-groznica u južnoj Istri. Zdravstvene novine. 1962;15:134-46.
48. Mioč B, Prpić Z, Barać Z, Vručec I. Istarska ovca hrvatska izvorna pasmina. Zagreb: Hrvatski savez uzgajivača ovaca i koza; 2012.
49. Sep-Ševerdija B. Q-groznica. Javnozdravstveni glas. 2009; 37:4-15.
50. European Centre for Disease Prevention and Control. Q fever. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC; 2017. [citirano August 21, 2018] Dostupno na: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2015-Q-fever.pdf.
51. Dupuis G, Petite J, Péter O, Vouilloz M. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. Int J Epidemiol. 1987;16:282-7.
52. Schneeberger PM, Wintenberger C, van der Hoek, Stahl JP. Q fever in the Netherlands, 2007- 2010: what we learned from the largest outbreak ever. Med Mal Infect. 2014;44:339-53.
53. Dijkstra F, van der Hoek W, Wijers N, Schimmer B, Rietveld A, Wijkman CJ. The 2007-2010 Q fever epidemic in the Netherlands: characteristics of notified acute Q fever

patients and the association with dairy goat farming. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;64:3-12.

54. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Definicije zaraznih bolesti koje se obvezno prijavljuju. EU revizija 2012. [Internet]. Hrvatski zavod za javno zdravstvo [pristupljeno 28.01.2018.]. Dostupno na: https://hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/definicije_zb_12.pdf.

55. Toledo A, Jado I, Olmeda AS, Casado-Nistal MA, Gil H, Escuder R, i sur. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from central Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008;9:465-8.

56. Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q fever. Zoonoses Public Health. 2012;59:69-75.

57. Berri M, Souriau A, Crosby M, Crochet D, Lechopier P, Rodolakis A. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. Vet Rec. 2001;48:502-5.

58. Roest HJ, van Gelderen B, Dinkla A, Frangoulidis D, van Zijderveld F, Rebel J, i sur. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. PloS One [Internet]. 2012 Nov 9 [pristupljeno 22.08.2017.];7(11):e48949. Dostupno na: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048949>.

59. Van den Brom R, Vellema P. Q fever outbreaks in small ruminants and people in the Netherlands. Small Ruminant Res. 2009;86:74-9.

60. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet Res. 2005;36:327-49.

61. Rodolakis A, Berri M, Hechard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, i sur. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine and ovine herds. J Dairy Sci. 2007; 90:5352-60.

62. Woldehiwet Z. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. Res Vet Sci. 2004;77:93-100.

63. Angelakis E, Raoult D. Q fever. Vet Microbiol. 2010;140:297-309.

64. Aitken ID. Clinical aspects and prevention of Q fever in animals. Eur J Epidemiol. 1989;5:420-4.

65. Krt B, Sočan M. Q-groznica u Republici Sloveniji. U: Željko Cvetnić, ur. Zbornik radova; Klasične bakterijske i parazitske zoonoze-što nas očekuje?; 2015 Oct 22; Zagreb, Hrvatska. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Hrvatski veterinarski institut; 2015.
66. Hatchette T, Campbel N, Hudson R, Raoult D, Marrie TJ. Natural history of Q fever in goats. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2003;3:11-5.
67. Marrie TJ. Q fever-a review. *Can Vet J* 1990;31:555-63.
68. Bernit F, Pouget J, Janbon F, Dutronc H, Martinez P, Brouqui P, i sur. Neurological involvement in acute Q fever: a report of 29 cases and review of the literature. *Arch Intern Med.* 2002;162:693-700.
69. Reilly S, Northwood JL, Caul EO. Q fever in Plymonth, 1972-1988. A review with articular reference to neurological manifestations. *Epidemiol Infect.* 1990;105:391-408.
70. Bonetti B, Monaco S, Ferrari S, Tezzon F, Rizzuto N. Demyelinating polyadiculoneuritis following *Coxiella burnetii* infection (Q fever). *Ital J Neurol Sci* 1991;12:415-7.
71. Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, Gouvernet J, Fournier PE, Bernit E, i sur. Q fever 1985.-1998: clinical and epidemiologic features of 1383 infections. *Medicine (Baltimore).* 2000;79:109-23.
72. Wildman MJ, Smith EG, Groves J, Beattie JM, Caul EO, Ayres JG. Chronic fatigue following infection by *Coxiella burnetii* (Q fever): 10-y follow-up of the 1989 outbreak cohort. *Qual Manag J.* 2002;95:527-38.
73. Ayres JG, Flint N, Smith EG, Tunnicliffe WS, Fletcher TJ, Hammond K, i sur. Post-infection fatigue syndrome following Q fever. *QJM.* 1998;91:105-23.
74. Ledina D, Bradarić N, Milas I, Ivić I, Brnčić N, Kuzmičić N. Chronic fatigue syndrome after Q fever. *Med Sci Monit.* 2007;13:88-92.
75. Fenollar F, Fournier P.E, Carieri M.P, Habib G, Messana T, Raoult D. Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2001;33:312-6.
76. Heard SR, Ronalds CJ, Heath RB. *C. burnetii* infection in immunocompromised patients. *J Infect* 1985;11:15-8.
77. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, i sur. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1211-17.
78. Raoult D, Fenollar F, Stein A. Q fever during pregnancy. *Arch Intern Med.* 2002;162:701-4.

79. Fournier TJ, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol. 1998;36:1823-34.
80. Puljiz I, Kuzman I, Đaković-Rode O. Kliničke i epidemiološke značajke Q- groznice u hospitaliziranih bolesnika. Infekt glasnik 2005;25:75-80.
81. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. ur. Harrison's manual of medicine: infectious diseases. New York: McGraw-Hill Companies; 2013.
82. Stein A, Raoult D. Detection of *C. burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. J Clin Microb 1992;30:2462-6.
83. Dupuis G, Péter O, Peacock M, Burgdorfer W, Haller E. Immunoglobulin responses in acute Q fever. J Clin Microbiol. 1985;22:484-7.
84. Van den Brom R, van Engelen E, Roest HIJ, van der Hoek W, Wellema P. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. Vet Microbiol. 2015;181:119-29.
85. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and management of Q fever-United States, 2013. MMWR Recommendations and Reports. 2013;62(3) <https://www.cdc.gov/q-fever/prevention/index.html>.
86. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. Vaccine. 2005;23:4392-402. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.04.010
87. Eibach E, Bothe F, Runge M, Fischer SF, Philipp W, Ganter M. Q fever: baseline monitoring of a sheep and goat flock associated with human infections. Epidemiol. Infect. 2012; 140:1939-49. doi: 10. 1017/ S095 0268 811002846
88. Roest HIJ, Bossers A, van Zijdervelt FG, Rebel ML. Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for diagnosis and control of the zoonotic diseases Q fever. Vet Quart. 2013; doi: org/ 10.1080/ 001652176. 2013.843809
89. Astobiza I, Tilburg J, Piñero A, Klaassen C, Hurtado A, Garcia-Pérez AL, Nabuuns-Franssen MH, i sur. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. BMC Vet Res. 2012 Dec 10;8:241 doi: 10.1186/1746-6148-8-241
90. Roest H, Ruuls RC, Tilburg JJ, Nabuurs-Franssen Mh, Klaassen CH, Vellema P, i sur. Molecular epidemiology of *C. burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2011;17:668-75.
91. Račić I, Špičić S, Galov A, Duvnjak S, Zdelar-Tuk M, Vujnović A, i sur. Identification of *Coxiella burnetii* genotypes in Croatia using multi-locus VNTR analysis. Vet Microbiol. 2014;173:340-7.

92. Vilibić-Čavlek T, Kučinar J, Ljubin-Sternak S, Kolarić B, Kaić B, Lazarić-Stefanović L, i sur. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies among febrile patients in Croatia, 2008-2010. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;12:293-6.
93. Tabibi R, Baccalini R, Barassi A, Bonizzi L, Brambilla G, Consonni D, i sur. Occupational exposure to zoonotic agents among agricultural workers in Lombardy region, northern Italy. *Ann Agr Environ Med.* 2013; 20:676-81.
94. Szymańska- Czerwińska M, Galinska EM, Niemczuk K, Knap JP. Prevalence of *C. burnetii* infection in humans occupationally exposed to animals in Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015; 15:261-7.
95. Van den Brom R, Schimmer B, Schneeberger PM, Swart WA, Van der Hoek W, Vellema P. Seroepidemiological survey for *Coxiella burnetii* antibodies and associated risk factors in Dutch livestock veterinarians. *Plos One* [Internet]. 2013 Jan 16 [pristupljeno 25.07.2018.];8(1):e54021.
96. Van der Hoek W, Schneeberger PM, Oomen T, Wegdam-Blans MC, Dijkstra F, Notermans DW, I sur. Shifting priorities in the aftermath of a Q fever epidemic in 2007 to 2009 in the Netherlands: from acute to chronic infection. *Euro Surveill.* 2012;17(3):pii=20059
97. Monno R, Fumarola L, Trerotoli P, Cavone D, Massaro T, Spinelli L, i sur. Seroprevalence of Q fever, brucellosis and leptospirosis in farmers and agricultural workers in Bari, Southern Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(Suppl 2):S142-3. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02151.x>
98. Jajou R, Henrica Wielders CC, Leclercq M, van Leuken J, Shamelian S, Renders N, i sur. Persistent high antibody against *C. burnetii* after acute Q fever not explained by continued exposure to the source of infection: a case- control study. *BMC Infect Dis.* 2014;14.
99. Whitney EA, Massung RF, Candee AJ, Ailes EC, Myers LM, Patterson NE, i sur. Seroepidemiologic and occupational risk survey for *Coxiella burnetii* antibodies among US veterinarians. *Clin Infect Dis.* 2009;48(5):550-7.
100. Eldin C, Angelakis E, Renvoisé A, Raoult D. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. *Am J Trop Med. Hyg.* 2013;88:765-9
101. Medić A, Dželalija B, Punda-Polić V, Gjenero-Margan I, Turković B, Gilić V. Q fever epidemic among employees in a factory in the suburb of Zadar, Croatia. *Croat Med J.* 2005;46(2):315-19.

102. Borčić B, Galinović-Weisglass M, Aleraj B, Šoić-Košić N, Delimar N. Epidemija Q-groznice u sjevernoj Hrvatskoj 1983. godine (epidemiološko-serološka odličja). Lijec Vjesn. 1984;106:353-7.
103. Mulić R, Petričević J, Kljajić Z. Q fever in Croatia: war induced changes in epidemiological characteristics. Coll Antropol. 2010;34:859-88.
104. Morović M, Babić Milutin N, Grgić D, Rode O. Q fever in Dalmatia. Clin Microbiol Infect. 2009;15(Suppl 2):S181-2.
105. Loukaides F, Hadjichristodoulou C, Soteriades ES, Kolonia V, Ioannidou MC, Psaroulaki A, i sur. Active surveillance of Q fever in human and animal population of Cyprus. BMC Infect Dis. 2006; 6:48. doi: 10.1186/1471-2334-6-48.
106. Wattiau P, Boldisova E, Toman R, Van Esbroek M, Quoilin S, Hammadi S, i sur. Q fever in woolsorters, Belgium. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2368-9.
107. Wilson LE, Couper S, Prempeh H, Young D, Pollock KG, Stewart WC, i sur. Investigation of a Q fever outbreak in a Scottish co-located slaughterhouse and cutting plant. Zoonoses Public Health. 2010;57:493-8. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01251.x.
108. Roest HIJ, Tilburg JJ, Van der Hoek W, Wellema P, Van Zijderveld FG, Klaassen H, i sur. The Q fever epidemic in the Netherlands: history, onset, response and reflection. Epidemiol Infect. 2011;139:1-12. doi: 10.1017/S0950268810002268.
109. Nielsen SY, Molbak K, Nybo Andersen AM, Brink Henriksen T, Kantso B, Krogfelt KA. Prevalence of *Coxiella burnetii* in women exposed to livestock animals, Denmark, 1996 to 2002. Euro Surveill. 2013b;18(28)pii:20528.
110. Lambton SL, Smith RP, Gillard K, Horigan M, Farren C, Pritchard GC. Serological survey using ELISA to determine the prevalence of *Coxiella burnetii* infection (Q fever) in sheep and goats in Great Britain. Epidemiol Infect. 2016;144:19-24.
111. Metzler AE, Nicolet J, Bertschinger HU. et al. Distribution of *Coxiella burnetii*: a seroepidemiological study of domestic animals and veterinarians. Schweiz Arch Tierheilkd. 1983;25:507-17.
112. Laušević D. Prevalence of *C. burnetii* antibodies in sheep in the territory of Montenegro. Acta Veterinaria. 2001;149-50.
113. Çetinkaya B, Kalender H, Ertas H.B. et al. Seroprevalence of Coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. Vet Rec. 2000;146:131- 6.

114. Pape M, Bouzalas EG, Koptopoulos GS, Mandraveli K et al. The serological prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep and goats in northern Greece. Clin Microb Infect. 2009;15:146-7.
115. Guatteo R, Seegers H, Taurel A.F, Joly A, Beandeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. Vet Microbiol. 11;149:1-16.
116. Georgiev M, Afonso A, Neubauer G, Needham H, Thiery R, Rodolakis A, i sur. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982–2010. Euro Surveill. 2013;18(8): pii=20407. Dostupno na: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.18.08.20407-en>
117. Schimmer B, Luttikholt S, Hautvast JL, Graat EA, Vellema P, van Duynhoven YT. Seroprevalence and risk factors of Q fever in goats on commercial dairy goat farms in the Netherlands, 2009-2010. BMC Vet Res. 2011;7:81-94. doi: 10.1186/1746-6148-7-81
118. Vučemilo M, Vinković B, Matković K. Smještaj i dobrobit životinja na farmama, te uvjeti kojima moraju udovoljavati farme u svijetlu novog pravilnika. Krmiva. 2006;48(1):43-7.

11. BIOGRAFIJA

Branka Sep-Ševerdija rođena je 22. kolovoza 1964. godine u Puli gdje je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1989. godine. Po završetku pripravničkog staža radi na Hitnoj medicinskoj pomoći u Puli.

U razdoblju od 1992. do 2006. godine učesnica je Domovinskog rata kao vojni liječnik, a nakon rata nastavlja s radom u Hrvatskoj vojsci u vojnim ambulantama u Puli, Zagrebu, Samoboru i Jastrebarskom.

Poslijediplomski znanstveni studij „Biomedicina i zdravstvo“ završila je 1999. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i stekla akademski naziv magistra znanosti biomedicine i zdravstva obranom teme „Prokuženost vojnika novaka protiv zaušnjaka u Hrvatskoj vojsci“.

Početkom 2007. godine započinje specijalizaciju iz epidemiologije u Zagrebu koju uspješno završava krajem 2009. godine. Trenutno radi kao epidemiolog u Službi za epidemiologiju Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije u Puli kao voditelj Odjela za operativnu epidemiologiju.

Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog epidemiološkog društva. Licencirani je predavač i ispitivač prve pomoći za vozače te liječnik pri Hrvatskom ronilačkom savezu.

Izradom doktorskog rada želi dati doprinos boljem poznavanju utjecaja rizičnih čimbenika na Q-groznicu te skrenuti pozornost liječnicima da pravovremeno postave dijagnozu ove bolesti, osobito kod osoba koje su u većem riziku ukoliko obole.

Radovi

- Sep-Ševerdija B. Prokuženost vojnika novaka protiv zaušnjaka u Hrvatskoj vojsci [magistarski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 1999.
- Leppée M, Sep-Ševerdija B, Polić-Vižintin M, Štimac D, i sur. Bolnički bolesnici liječeni od raka tijela maternice u Zagrebu. 2. Hrvatski epidemiološki kongres, Rovinj, 26-29. listopada 2005.

- Leppée M, Grgić M, Polić-Vižintin M, Sep-Ševerdija B, Čulig J. Conducting reduction diets-relationship between genders. Knjiga sažetaka 2. Hrvatski kongres o debljini s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, 7-9. travnja 2006.
- Grgić M, Polić-Vižintin M, Sep-Ševerdija B. Patients with acute ischemic heart diseases in Zagreb. Book of abstracts 2nd Croatian Gerontological Congress with International Participation, Opatija 9-12. ožujka 2006. Supplement 1, LV 128, Zagreb.
- Štimac D, Sep-Ševerdija B, Grgić M, Polić-Vižintin M, Marić-Bajs M, Leppée M, Čulig J. Multiple sclerosis in Zagreb from 1996 to 2003. U: Zbornik Hrvatski dani primarne zdravstvene zaštite Labin 2005. str. 386.-92. (objavljeni rad, znanstveni).
- Ferencić N, Polić-Vižintin M, Sep-Ševerdija B, Leppée M, Grgić M, Štimac D, Čulig J. Patients suffering from dementia in Zagreb hospitals Book of abstracts 2nd Croatian gerontological congress with international participation, Opatija 9-12.ožujka 2006. Supplement 1, LV 128, Zagreb.
- Leppée M, Štimac D, Grgić M, Sep-Ševerdija B, Ožić S, Polić-Vižintin M, Čulig J. Inpatient morbidity in school children and students at Zagreb hospitals 1996-2004. Abstract book 13 th Congress of European Union for School and University Health and Medicine, Dubrovnik, 12-15 listopada. 2005. (međunarodna recenzija, objavljeni rad).
- Leppée M, Sep-Ševerdija B, Grgić M, Štimac D, Polić-Vižintin M, Ožić S, Čulig J. Acute ischemic heart disease in Zagreb. (poster, domaća recenzija, znanstveni).
- Leppée M, Sep-Ševerdija B, Grgić M, Štimac D, Polić-Vižintin M, Ožić S, Čulig J. Threat of acute heart disease in hospital of Zagreb. (predavanje, domaća recenzija, stručni).
- Leppée M, Grgić M, Polić-Vižintin M, Sep-Ševerdija B, Čulig J. Urogenital infections in Zagreb. 23rd /UST/ Europe conference on sexually transmitted infections and HIV/AIDS. Abstracts (predavanje, međunarodna recenzija, stručni).
- Sep-Ševerdija B. Epidemiološke karakteristike Q-groznice u Istarskoj županiji u razdoblju od 1968. do 2008. godine [specijalistički rad]. Zagreb; Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2009.
- Sep-Ševerdija B. Q-groznica. Javnozdravstveni glas Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije. 2009; 37:6-15.

- Sep-Ševerdija B. Prisutnost protutijela protiv *Coxiella burnetii* kod ovaca i koza na području Istarske županije 3. Hrvatski epidemiološki kongres 7-9. svibnja 2015. Šibenik (poster prezentacija).
- Sep-Ševerdija B, Lazičić-Putnik Lj. Newly discovered hypertension as possible risk factor in persons under medical supervision in Pula. 10th Croatian Congress on atherosclerosis 18-20. June 2015. Zagreb (poster presentation).
- Sep-Ševerdija B, Pušelja Ž, Lazičić-Putnik Lj, Alambašić K. Epidemiological characteristics of influenza in Istria County in period 2000-2015. 1st Croatian Conference on travel, tropical, migration medicine & HIV with international participation 1-4. October 2015. Dubrovnik (poster presentation).
- Radošević S, Družetić-Božić K, Sep-Ševerdija B, Lazičić-Putnik Lj. Drowning of tourists during the summer season in the Istria County in 2013 and 2014. 1st Croatian Conference on travel, tropical, migration medicine & HIV with international participation 1-4 october 2015. Dubrovnik (poster presentation).
- Sep-Ševerdija B, Alambašić K. Influenca u Istarskoj županiji u razdoblju od 1996.-2015. godine. 79. stručni sastanak Hrvatskog epidemiološkog društva 13-14. svibnja 2016. Supetar, Brač (poster prezentacija).
- Sep-Ševerdija B, Stojanović A, Lazičić-Putnik Lj. Hipertenzija u osoba starijih od 60 godina pod zdravstvenim nadzorom u Puli. 9. Hrvatski internistički kongres s međunarodnim sudjelovanjem 23.-25. rujna 2016. Opatija (poster prezentacija).
- Sep-Ševerdija B. Q-groznica kao uzrok senzorne polineuropatije - prikaz slučaja pacijenta iz Istre. 11. Hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 8. Hrvatski kongres o infektivnim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem 20.-23. listopada 2016. Poreč (poster prezentacija)
- Sep-Ševerdija B, Lazičić-Putnik Lj. Foreign tourists in to risky contacts with animals in the Istria County from 2012-2016. 1st South-East European Conference on travel, tropical, migration medicine and HIV and 2nd Croatian Conference on travel, tropical, migration medicine & HIV with international participation 28 sept-1.october 2017. Dubrovnik (oral presentation).
- Lazičić-Putnik Lj, Radošević S, Sep-Ševerdija B. Causes of death of foreign tourists in the Istrian Region during the summer seasons from year 2013. up to 2016. 1st South-East European Conference on travel, tropical, migration medicine and HIV and 2nd

Croatian Conference on travel, tropical, migration medicine & HIV with international participation 28 sept-1.october 2017. Dubrovnik (oral presentation).

- Sep-Ševerdija B. *Coxiella burnetii* (Q fever)-an ideal biological weapon? 1st Croatian Conference on Biosecurity and Biosafety with International Participation. 7-9 december 2017.CROBIB Zagreb (poster presentation).
- Radošević S, Lazičić-Putnik Lj, Sep-Ševerdija B, Stojanović A. The use of alcohol and drugs in foreign tourists in interventions of Institute of emergency medicine of County of Istria from 2016-2018. 2st South-East European Conference on travel, tropical, migration medicine and HIV and 3rd Croatian Conference on travel, tropical, migration medicine & HIV with international participation 4-7 april 2019. Dubrovnik (poster presentation).
- Sep-Ševerdija B, Lazičić-Putnik Lj, Stojanović A. Vaccination before traveling of adult residents of Istria to the world destinations in the period 2014-2018. 2st South-East European Conference on travel, tropical, migration medicine and HIV and 3rd Croatian Conference on travel, tropical, migration medicine & HIV with international participation 4-7 april 2019. Dubrovnik (poster presentation).
- Sep-Ševerdija B. Epidemije crijevnih zaraznih bolesti u hotelima i domovima za starije i nemoćne osobe u Istarskoj županiji u razdoblju od 2009-2018. godine. 4. Hrvatski epidemiološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem 16.-18. svibnja 2019. Opatija (poster prezentacija).
- Sep-Ševerdija B, Špičić S, Tešović G. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in the Istrian Region, Croatia. Vet.arhiv, 2022. (rad prihvaćen).
- Sep-Ševerdija B.Seroprevalencija Q-groznice u profesionalno eksponiranih osoba na području Istre. 13. Hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 10. Kongres o infektivnim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem 20.-23. Listopada 2022. Šibenik (poster prezentacija).

PRILOG 1.

IME I PREZIME _____

MOBITEL _____

Prilog 1.

Suglasnost za sudjelovanje u istraživanju

Nakon upoznavanja s ciljem i načinom provođenja istraživanja "Istraživanje dinamike prokuživanja *C. burnetii* kod profesionalno eksponiranih osoba" koje provodi mr. sc. Branka Sep-Ševerdija, dr.med. epidemiolog Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije, suglasan/na sam da se uzorak krvi (serum) koristi u svrhu navedenog istraživanja te se neće koristiti bez naknadnog pristanka u druge svrhe i/ili istraživanja.

Svjestan/na sam mogućnosti pojave mogućeg podljeva prilikom vađenja krvi. Odričem se svih materijalnih i drugih prava koja bi mogla proizaći iz ovog istraživanja, a u svakom trenutku imam pravo odustati od sudjelovanja u istraživanju.

Bez prisile pristajem na sudjelovanje u ovom istraživanju.

Potpis ispitanika: _____

Potpis svjedoka: _____

Datum _____

PRILOG 2.

ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO ISTARSKE

ŽUPANIJE

ISTITUTO DI SANITÀ PUBBLICA DELLA

REGIONE ISTRIANA

ETIČKO POVJERENSTVO

Obavijest za ispitanika

(informirani pristanak)

Poštovani/poštovana,

Pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju čiji je glavni cilj istražiti koliko je česta izloženost, a time i mogućnost infekcije koksijelom među ljudima koji se profesionalno bave uzgojem ovaca i/ili koza, kao i onih koji dolaze poslovno u kontakt s tim životinjama (veterinari, veterinarski tehničari).

Istraživanje nosi naslov **“Dinamika prokuživanja *Coxiellom burnetii* kod profesionalno eksponiranih osoba“** čiji je voditelj mr.sc.Branka Sep-Ševerdija, specijalist epidemiolog iz Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije u Puli. Predviđeno trajanje istraživanja je od 31. ožujka 2012. do 31. ožujka 2014. godine.

Vaše sudjelovanje u ovom istraživanju treba se temeljiti na jasnom razumijevanju ciljeva istraživanja i postupaka za njegovo provođenje te mogućih rizika za ispitanika. Stoga Vas molimo da, prije donošenja odluke, pažljivo pročitate i proučite ovu obavijest, a ako u njoj nađete na bilo kakve nejasnoće ili nepoznate riječi i izraze da o tome pitate istraživača koji Vam je dužan i spreman odgovoriti na svako pitanje.

OPIS KLJUČNOG PROBLEMA I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

U ovom istraživanju istražuje se izloženost uzročniku Q-groznice (*Coxiella burnetii*) među ljudima koji su zbog posla kojim se bave posebno izloženi mogućoj zarazi. Bakterija

Coxiella burneti može biti prisutna u ovcama, kozama, govedima i nekim drugim životinjama. Iako je Q-groznica u životinja najčešće bez simptoma, kod ljudi ta bolest može uzrokovati različite zdravstvene problema, kao što su povišena temperatura, upala pluća, hepatitis te kronične infekcije od kojih je posebno opasna Q-groznica endokarditis. Ljudi koji su kronični plućni bolesnici, koji imaju već oštećenu jetru te srčani bolesnici (posebno oni koji imaju ugrađene umjetne srčane zalistke) u daleko su većem riziku ako dođu u kontakt s uzročnikom ove bolesti. U ovom istraživanju pretpostavili smo da će biti statistički značajnija razlika u prokuženosti između ljudi koji su profesionalno izloženi zarazi, a žive u južnom dijelu Istre, u odnosu na one koji žive sjevernije (područje Buzeta, Umaga, Buja).

CILJI SVRHA ISTRAŽIVANJA

Podatke koje ćemo dobiti iz krvi ispitanika i domaćih životinja prikupljat će jedan istraživač (mr.sc Branka Sep-Ševerdija) i oni će se voditi pod određenim brojem.

ULOGA VAS KAO ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU

Ovim bi se istraživanjem došlo do vrlo zanimljivih podataka. Obzirom da su podaci o dinamici prokuživanja bolesti u literaturi oskudni, a ne postoji ni jedno istraživanje ovakvog tipa u našoj regiji za koju se zna da je endemična za Q- groznicu, Vaše sudjelovanje u ovoj studiji zasigurno će doprinijeti boljem razumijevanju ove bolesti.

Ispitanici će biti podvrgnuti vađenju krvi tijekom kojeg će se uzeti uzorak krvi od 5 mL krvi za provođenje istraživanja. S obzirom da se ispituje dinamika prokužavanja koksijelom, krv ćemo vaditi 1 x godišnje kroz dvije godine koliko će i trajati ovo istraživanje. Što se tiče životinja (ovca i koza) njima ćemo vaditi krv 1 x godišnje.

KOJE SU ZA VAS MOGUĆE PREDNOSTI I KORISTI OD SUDJELOVANJA?

Konkretna prednost ili koristi od ovog istraživanja su da ćete saznati da li imate protutijela na *Coxiella burnetii* uzročnika Q-groznice ili ne, tj, da li ste bili u kontaktu s uzročnikom Q-groznice.

KOJI SU ZA VAS MOGUĆI RIZICI SUDJELOVANJA U ISTRAŽIVANJU?

U istraživanje će se uključiti samo oni ispitanici koji će za to dati informirani pristanak. Istraživanje će biti u skladu sa svim primjenjivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju.

MORATE LI SUDJELOVATI U ISTRAŽIVANJU?

Vi ćete u potpunosti slobodno i samostalno odlučiti hoćete li u ovom istraživanju sudjelovati ili ne. Sudjelovanje u istraživanju je dragovoljno što znači da u njemu ne morate sudjelovati.

POVJERLJIVOSTI PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU

Svi Vaši osobni podaci bit će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditelj istraživanja je dužan u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. Sve podatke u bazu podataka unosit će jedan istraživač (mr.sc.Branka Sep-Ševerdija,dr.med.).U bazu podataka Vaši podaci bit će uneseni prema inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo istraživač i njegov mentor, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno drugim osobama. Pristup dokumentaciji mogu imati i predstavnici Etičkog povjerenstva Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije te predstavnici Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta, koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog istraživanja.

ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI PODACI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU?

Podaci dobiveni u ovom znanstvenom istraživanju mogu biti korisni u svrhu daljnjeg razvoja i unapređenja znanosti. Očekuje se da se ti podaci objave u odgovarajućim znanstvenim časopisima i publikacijama.

TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA OVO ISTRAŽIVANJE?

Istraživanje provodi Branka Sep-Ševerdija, dr.med. specijalist epidemiolog iz Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije u Puli, koji će jednim dijelom financirati ovo istraživanje, dok će većinu troškova pokriti Upravni odjel za zdravstvo i socijalnu skrb Istarske županije. Od drugih izvora financiranja su vlastita novčana sredstva istraživača.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Zavoda za javno zdravstvo Istarske županije te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući «Osnove dobre kliničke prakse» i «Helsinšku deklaraciju».

KOGA MOŽETE KONTAKTIRATI ZA DODATNE OBAVIJESTI I UPITE?

Ako su Vam potrebne bilo kakve dodatne informacije, ili imate dodatnih pitanja, slobodno se obratite istraživaču.

Ime i prezime istraživača: mr.sc. Branka Sep-Ševerdija, dr.med.

Adresa istraživača: Zavod za javno zdravstvo Istarske županije, Nazorova 23, Pula

Broj telefona istraživača: 098/883 165, 052/529 047

E-mail istraživača: branka.sep@gmail.com

TKO ĆE JOŠ BITI OBAVIJEŠTEN O OVOM ISTRAŽIVANJU?

O sudjelovanju u ovom znanstvenom istraživanju može biti obaviješten i Vaš obiteljski liječnik.

O VAŠOJ PISANOJ SUGLASNOSTI ZA SUDJELOVANJE U OVOM ISTRAŽIVANJU

Preslik dokumenta (potpisne stranice) koji trebate potpisati ako pristajete sudjelovati u ovom istraživanju dobit ćete Vi i voditelj istraživanja (istraživač). Izvorni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati voditelj istraživanja.

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili mogućnost sudjelovanja u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima bolesnika Republike Hrvatske (NN 169/04).

Voditelj istraživanja

mr.sc. Branka Sep-Ševerdija, dr.med.

specijalist epidemiolog

PRILOG 3.

br. protokola_____

ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO

tel. kontakt_____

ISTARSKE ŽUPANIJE

ISTITUTO DI SANITÀ PUBBLICA

ANKETA I

Ime i prezime_____ **spol** m / ž **dob**_____ **adresa**
stanovanja_____ **selo /grad , zanimanje**_____ **pušač** DA NE

1. Što točno radite na farmi? _____

2. Da li se sjećate kada ste prvi put došli na farmu? DA (kada?) _____ NE 3. Da li imate kontakt sa životinjama (ovce, koze, goveda)? DA NE

4. Da li konzumirate sirovo mlijeko i sir od nepasteriziranog mlijeka DA NE 5. Da li ste u kontaktu sa vunom, kožom i/ili krznom tih životinja?

DA NE

6. Da li ste bili u kontaktu sa životinjama u doba "poroda"?

DA 1. ovce 2. koze 3. goveda 4. ostale životinje NE

7. Da li imate u svom kućanstvu kontakt s nekim drugim životinjama?

DA 1. pas 2. mačka 3. kunić 4. ostale životinje NE

8. Da li ste preboljeli upalu pluća? DA (kada?) _____ NE

9. Da li ste primjetili ubod krpelja na tijelu? DA (kada?) _____ NE

10. Da li bolujete od neke kronične bolesti? DA NE

11. Imate li problema sa srč. zaliscima ili ugrađene umjetne zaliske? DA NE

12. Da li ste negdje putovali u posljednjih godinu dana? DA gdje? _____

Datum_____ **Anketirao**_____

ANKETA II (s ciljanim pitanjima za zdravstvene tegobe karakteristične za primoinfekciju koksijelom)

1. Da li ste od posljednjeg anketiranja do danas imali neke od ovih zdravstvenih smetnji?

- povišena temperatura	DA	NE
- čeona glavobolja	DA	NE
- suh kašalj, kasnije sa iskašljajem	DA	NE
- bol u prsima	DA	NE
- mučnina	DA	NE
- povraćanje	DA	NE
- proljev	DA	NE
- druge zdr.tegobe	DA	NE

2. Da li je netko od vaših ukućana imao gore navedene smetnje? DA NE

3. Da li ste se od posljednjeg anketiranja do danas javili svom liječniku zbog gore navedenih smetnji? DA NE

4. Da li ste u navedenom razdoblju bili na bolovanju?

DA (zbog čega?)_____ NE

5. Da li ste bili u navedenom razdoblju liječeni u bolnici?

DA (zbog čega?)_____ NE

Datum_____

Anketirao_____

PRILOG 4.

ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO

ISTARSKE ŽUPANIJE

br. protokola_____

ISTITUTO DI SANITÀ PUBBLICA

DELLA REGIONE ISTRIANA

Laboratorijski podaci

Ime i prezime_____

datum uzimanja uzorka krvi

nalaz serološke pretrage (IFA)

IgG (faza II C.burnetii)

1. _____

2. _____

3. _____

IgM protutijela mogu perzistirati jedno duže vrijeme. Za dijagnozu akutne Q-groznice, CDC koristi IFA IgG(cutoff >1:128) testirajući parne serume i ne koriste IFA IgM za rutinsko serološko testiranje. Rezultati serološkog testiranja moraju se interpretirati s određenim oprezom jer stečena protutijela mogu biti rezultat prijašnje ekspozicije koksijelama, osobito u ruralnim područjima i u područjima gdje se ljudi bave stočarstvom.

ANKETA ZA VLASNIKE OVACA I KOZA

Ime i prezime vlasnika_____

Broj ušne markice ovce/koze_____

Starost ovce/koze _____

Pasmina ovce/koze_____

Podrijetlo ovce/koze: autohtona sorta importirana

Datum vađenja krvi _____

Serološka pretraga krvi ovce/koze na Q-groznicu (EIA)

1. datum pretrage _____

negativan nalaz

pozitivan nalaz (utvrđen titar protutijela)

2. datum pretrage _____

negativan nalaz

pozitivan nalaz (utvrđen titar protutijela)

POPIS TABLICA

Tablica 1.1 Broj oboljelih od Q-groznice u razdoblju od 1968. do 2019. godine u RH	17
Tablica 5.1 Prikaz učestalosti rizičnih čimbenika za prokuženost koksijelom.....	45
Tablica 5.2 Prikaz učestalosti pojedinih seroloških nalaza među ispitanicima: <i>Fisherov egzaktni test</i>	50
Tablica 5.3 Razlike u učestalosti rizičnih čimbenika, dinamici prokuživanja i serološkom statusu u endemskom južnom dijelu u odnosu na sjeverni dio Istre: <i>X² test ili Fisherov egzaktni test</i>	51
Tablica 5.4 Razlike u dobi ispitanika, broju godina provedenih na farmi te titru protutijela prikazanim kroz kontinuirane numeričke vrijednosti: <i>Mann-Whitney U test</i>	56
Tablica 5.5 Stopa asimptomatske serokonverzije s obzirom na izloženost pojedinim rizičnim čimbenicima: <i>X² test ili Fisherov egzaktni test</i>	57
Tablica 5.6 Stopa reinfekcije s obzirom na pojedine regije.....	58
Tablica 5.7 Razlike u učestalosti rizičnih čimbenika za prokuženost koksijelom među ispitanicima: <i>X² test ili Fisherov egzaktni test</i>	59
Tablica 5.8 Multivarijatni logistički regresijski model predikcije za <i>Coxiella burnetii</i> seropozitivne osobe	64
Tablica 5.9 Kumulativna incidencija u ispitanika prema intenzitetu izloženosti (ovce, koze)	65
Tablica 5.10 Kumulativna incidencija u ispitanika s obzirom na pripadnost regiji	66
Tablica 5.11 Deskriptivni i serološki pokazatelji na ispitivanom uzorku ovaca i koza.....	68
Tablica 5.12 Razlike između sjeverne i južne regije s obzirom na pasminu ovaca, higijenske uvjete, seropozitivne vlasnike ovaca, veličinu stada ovaca i serološki nalaz (ELISA) u ovaca: <i>X² test ili Fisherov egzaktni test</i>	69
Tablica 5.13 Razlike između sjeverne i južne regije s obzirom na pasminu koza, higijenske uvjete na farmama koza, seropozitivne vlasnike koza, veličinu stada koza te serološki nalaz (ELISA) u koza: <i>X² test</i>	70
Tablica 5.14 Binarni logistički model predikcije seropozitivnog nalaza u životinja.....	71
Tablica 5.15 Binarni logistički model seropozitivnog nalaza u ljudi s obzirom na životinje	72