

## ZBULIMI I ANTITRUPAVE IgG SPECIFIKË TË CCHFV-SË, NËPËRMJET TESTIT ELISA INDIREKTE, TEK DHENTË NË RAJONIN E LEZHËS, SHQIPËRI

ARTA LUGAJ.<sup>1</sup>, BLERTA LAZE.<sup>2</sup>, KRISTAQ BËRXHOLI.<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Universiteti "Ismail Qemali" Vlorë, Fakulteti i Shkencave Teknike, Departamenti  
i Biologjisë

<sup>3</sup>Universiteti Bujqësor i Tiranës, Fakulteti i Mjekësisë Veterinare, Departamenti i  
Shëndetit Publik Veterinar

e-mail: [lugajarta@gmail.com](mailto:lugajarta@gmail.com)

### Përmbledhje

Ethja Hemorragjike Krime-Kongo (CCHF) është një sëmundje virale endemike e pickimit të rriqave e përhapur në Afrikë, Ballkan, Lindjen e Mesme dhe në disa zona të Azisë. Virus mund të transmetohet kryesisht nëpërmjet kontaktit të drejtpërdrejtë me gjakun, indeve të kafshëve bujqësore ose nëpërmjet pickimit të rriqave *Hyalomma*. Në këtë studim janë realizuar vëzhgime seroepidemiologjike me qëllim përcaktimin e prevalencës së infeksionit CCHF dhe identifikimin e faktorëve rrisues të lidhura me përhapjen e sëmundjes në dhen në rajonin Lezhë-Shqipëri. Mostrat e gjakut janë marrë nga vena jugulare e 9 dhenve në Lezhë-Ishull-Shëngjin, 9 dhenve në Lezhë-Torovicë, 10 dhenve në Lezhë-Kolojak dhe 10 dhenve në Lezhë-Ishull-Lezhë. Totali prej 38 mostra serumesh të grumbulluara nga dhentë u skrinuan për identifikimin e antittrupave IgG duke përdorur kitin e antitruave të dhenve IgG-CCHF të testit Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) në Institutin Friedrich-Loeffler-Institute (FLI), Greifswald, Gjermani. Pozitiviteti i antittrupave të dedektuar në kafshët e rajonit të Lezhës arriti vlerën 34.2%. Rezultati i studimit tonë thekson se dhentë mund të klasifikohen si indikatorë të përshtatshëm për monitorimin e studimeve të mëtejshme seroepidemiologjike për të përcaktuar prezencën apo mungesën e virusit CCHF në rajonin përkatës.

**Fjalëkyçe:** Virusi i etheve hemorragjike Krime-Kongo, *Hyalomma*, dhen, ELISA indirekte, FLI.

### Abstract

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a tick-borne viral disease endemic to Africa, the Balkans, the Middle East, and parts of Asia. The virus can be transmitted mainly through direct contact with blood or tissues from infected livestock or through bites of *Hyalomma* ticks. In the present study, a seroepidemiological survey was conducted to determine the prevalence of CCHF infection and to identify the potential risk factors associated with the disease among sheep in Lezhë district of Albania. Blood samples were taken from the jugular vein of 9 sheep in Lezhë-Ishull-Shëngjin, 9 sheep in Lezhë-Torovice, 10 sheep in Lezhë-Kolojak and 10 sheep in Lezhë-Ishull-Lezhë. A total of 38 serum samples from sheep were screened for IgG antibodies using a CCHF animal IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit at Friedrich-Loeffler-Institute (FLI), Greifswald Germany. Antibodies were detected in Lezha district of Albania with positivity of 34.2% in sheep. The results of our study highlight the suitability of sheep as indicator animals for CCHFV

seroepidemiological monitoring studies to determine the presence or absence of CCHFV in a given region.

**Keywords:** Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Hyalomma, sheep, Indirect ELISA, FLI.

## Hyrje

Ethja hemorragjike e Krime-Kongos (CCHF) është një sëmundje e pickimit të riqnave, e shkaktuar nga virusi i etheve hemorragjike të Krime-Kongos (CCHFV) Swanepoel *et al.* (1994). Ethja hemorragjike e Krime-Kongos (CCHF) është një sëmundje virale zoonotike, asimptomatike në kafshët e infektuara, por me rrezikshmëri të lartë në njerëz. Karakterizohet me dëmtim të sistemit vaskular si dhe ç'rregullim të aftësisë rikuperuese të organizmit. Këto simptoma shpesh shoqërohen me hemorragji, që në shumicën e rasteve janë edhe shkaktarët kryesorë të vdekjes. Infeksioni te njerëzit fillon me shenja të një etheje jo specifike, por që përparon në drejtim të një sindromi hemorragjik me nivel të lartë fataliteti. Virusi i CCHF-së është një agjent me potencial bioterrorist dhe është listuar në listën C. Ethja hemorragjike e Krime Kongos (CCHF) në Gadishullin e Ballkanit është e shprehur me sinjifikancë të lartë, me një shkallë fataliteti të rasteve (CFR) deri në 40% dhe me një prirje shumë të lartë për përhapjen spitalore. Riqnat *Hyalomma marginatum* janë të përfshira në ekologjinë e CCHF-së dhe shërbejnë si vektorë kryesorë të virusit në rajonin e Ballkanit, por edhe disa specie të gjinisë *Dermacentor* dhe *Rhipicephalus* kanë treguar që janë të aftë për të transmetuar virusin e etheve hemorragjike të Krime Kongos (CCHFV).

Virusi i etheve hemorragjike të Krime-Kongos CCHFV është pjesëtar i gjinisë *Orthonairovirus* dhe familjes *Nairoviridae*. Si të gjithë Orthonairoviruset e tjerë dhe virusi i CCHFV-së është i përbërë nga një molekulë e vetme ARN-je një zinxhirëshe me drejtim të kundërt 3'-5' dhe është e ndarë në tre gjenoma (segmentet S, L dhe M) Marriott & Nuttall *et al.* (1996a). Njerëzit janë të vetmit bujtës të virusit CCHFV, me përjashtim të minjve të porsalindur, ku zhvillohet sëmundja e CCHF-së Whitehouse *et al.* (2004). Përshkrimi i parë i sëmundjes së etheve hemorragjike të Krime-Kongos CCHF në Shqipëri i përket vitit 1986. Sëmundja e CCHF-së ka një përhapje të gjerë në pjesën veri-perëndimore të vendit, por ka pasur dhe raste sporadike të raportuar në Tiranë, Mirëditë, Lezhë, Gjirokastër dhe Skrapar. Në vitet 1985-1987, shkalla e letalitetit ka qënë përafërsisht 17% Avšič-Zupanc *et al.* (2008). Midis vitit 2001 dhe vitit 2006 është raportuar një mesatare prej 5 raste njerëzish në vit. Zonat endemike janë provincat Has dhe Kukës në kufi me Republikën e Kosovës. Në vitin 2003 në provincën e Hasit u përcaktua në dhi, nëpërmjet testit të imunofluoreshencës (IFA) një shkallë e seroprevalencës prej 20% (2/10) ndërsa në vitin 2005 në Kukës u mundësua testimi i riqnave me RT-PCR dhe rezultoi në një prevalencë prej 3% (1/31 riqna positive RT-PCR) Papa *et al.* (2009). Gjatë shpërthimit të infeksionit CCHF në vitin 2001, popullata e riqnave ishte jashtëzakonisht e lartë, për shkak të kushteve klimatike optimale, si dimër i butë, i cili u

mundëson riqnave mbijetesën, pranverë e hershme, që përshpejton aktivitetin e riqnave dhe verë e nxehtë.

### Materiali dhe metodat

#### Grumbullimi i serumeve

U realizua grumbullimi i serumeve nga kafshët bujqësore të dheneve, në rajonin e Lezhës në Shqipëri. Në dhen në total u mundësua grumbullimi i 38 serumeve në katër zona (rurale) të Lezhës, në Lezhë-Ishull-Shëngjin (9), Lezhë-Torovicë (9), Lezhë-Kolonjak (10) dhe Lezhë-Ishull-Lezhë (10). Në tabelën e mëposhtme janë paraqitur të dhënat gjeografike të rajonit të Lezhës.

**Tabela nr. 1:** Të dhënat gjeografike për zonën e studimit (Ogimet.com).

Zona e studimit	Të dhënat gjeografike				
	Lartësia	Gjerësia gjeografike	Gjatësia gjeografike	Temp	
				Max	Min
Lezhë	45 m	41 <sup>0</sup> 47'9,86" N	19 <sup>0</sup> 38'45,87" E	18.6 <sup>0</sup> C	10.7 <sub>0</sub> C

#### Metoda ELISA indirekte

Totali prej 38 mostra serumesh të grumbulluara nga dhentë u skrinuan për identifikimin e antitropave IgG duke përdorur kitin e antitruave të dhenve IgG-CCHF të testit Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) në Institutin Friedrich-Loeffler-Institute (FLI), Greifswald, Gjermani. Enzyme Linked Immunosorbent Assay ELISA, është ndër metodat serologjike, ndryshe metodat diagnostike të bazuara në dedektimin e komplekseve antigjen-antitrop. ELISA është një metodë cilësore, që shërben për dedektimin e pranisë së antigjeneve dhe njëherësh sasiore, pasi falë matjes së intensitetit të ngjyimit gjykohet mbi përqëndrimin e antigjenëve në mostrën e analizuar. Në studimin tonë është përdorur teknika ELISA indirekte për dedektimin e antitropave specifike IgG. Kitet e përdorur janë kiti i prodhuar nga Biologët e Institutit Friedrich-Loeffler në Greifswald të Gjermanisë, Prof. Dr Martin Groschup dhe Dr. Marc Mertens dhe kiti Vektor Best i prodhuar në Rusi. Arsyeja pse u testuan me dy kitet e sipërpërmendura totali prej 38 mostra serumesh ishte për të mundësuar një pasqyrim sa më të saktë të rezultateve.

Protokolli i përgjithshëm i teknikës ELISA indirekte ndjek disa faza kryesore si: Shtimi i antigenit Kosovo Hoti në pusetat e pjatës së ELISA, i holluar në tretësirën e parë buferike PBS (pH=11). Vendosja e pjatës së ELISA në termostat në temperaturë 37°C për 2 orë (fiksohet antigjeni me suportin e ngurtë), më pas realizohet shpëlarja e pjatës së ELISA. Bllokimi i siteve që nuk kanë antigen. Ky proces realizohet duke shtuar tretësirën e dytë buferike 3%

BSA (Fraksioni V, pH=7.0, Serva) në PBS pH=7.2-Tween 20 0.05%) dhe tretësirën e tretë buferike 1%BSA (Fraksioni V, pH=7.0, Serva) në PBS pH=7.2-Tween 20 0.05%). Hollimi i serumeve me tretësirën e tretë buferike 1%BSA (Fraksioni V, pH=7.0, Serva) në PBS pH=7.2-Tween 20 0.05%) realizohet në aparatin Laminar Flor. Vendosja e pjatës së ELISA për 1 orë në temperaturë dhome. Shpëlarja e pjatës së ELISA pas 1 ore realizohet me tretësirën washing buffer në makinerinë larëse Tecan të ELISA. Shtohet konjugati  $\alpha$ -bovine-IgG-HRP (horse-raddish peroksidazë) dhe më pas inkubohet për 1 orë në temperaturë 37°C në termostat.

Shpëlarja e pjatës së ELISA pas 1 ore realizohet me tretësirën washing buffer në makinerinë larëse Tecan të ELISA. Shtohet substrati i përgatitur Trimetilbenzidinë TMB (9ml solucion A+1ml solucion B). Vendoset pjata e ELISA për 10 minuta në errësirë, në temperaturë dhome dhe më pas ndalohet reaksioni duke shtuar acidin sulfurik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 ml për pusetë). Vendoset pjata e ELISA në makinerinë lexuese, duke absorbuar fillimisht dritën në 450nm (me diferencë 9 nm). Vlerësimi bazohet mbi kufirin e OD (densiteti optik), ku për çdo mostër llogaritet përqëndrimi i (S/N): vlera e densitetit optik të mostrës përmbi vlerën e kontrollit negativ (OD)<sub>nk</sub> shumëzuar me 100.  $S/N = OD_{(mostrës)} / OD_{(negativ\ kontroll)} \times 100$ . Për vlerat më të vogla se 15% mostra konsiderohet negative ndërsa për vlera më të mëdha se 25% mostra konsiderohet pozitive (Protokolli i institutit FLI, Greifswald, Gjermani).

### Rezultatet dhe diskutimi

Rezultatet e matjes së antitropave anti-CCHFV IgG në kafshët bujqësor nëpërmjet tekinkës ELISA indirekte janë paraqitur në mënyrë të përmbledhura në tabelën 2, Në funksion të vlerave të rezultateve u mundësua përcaktimi i prevalencës për secilën zonë për të dhënë një informacion të përgjithshëm për përhapjen e shkallës së infeksionit CCHFV në dhen, Lezhë.

**Tabela 2:** Rezultatet e përmbledhura dhe përcaktimi i prevalencave në % në dhen në Lezhë.

Qytet-Fshat	Nr	Raste pozitive	Raste negative	Gjinia				Prevalenca %
				F		M		
				+	-	+	-	
Ishull-Shëngjin	9	0	9	0	9	0	0	0%
Torovicë	9	2	7	2	5	0	2	22.2%
Kolonjak	10	9	1	9	1	0	0	9%
Ishull	10	2	8	2	8	0	0	20%

Në tabelën e mësipërme, paraqiten të dhënat për prezencën e infeksionit CCHFV në dhen. Theksojmë se përqindja më e lartë e infeksionit është vërejtur në Lezhë-Torovicë dhe në Lezhë-Ishull-Lezhë përkatësisht me prevalencë

22,2% dhe 20%. Duhet të theksojmë se pavarësisht rasteve pozitive në meshkuj, nuk mund të konkludojmë se kemi diferencë në ndjeshmërinë e seksit në kafshë. Kjo për arsien e thjeshtë sepse numri i meshkujve në raport me femrat në kafshë është jashtëzakonisht i ulët. Megjithatë të dhënat e autorëve të literaturave të huaj theksojnë se nuk ka ndryshim në drejtim të seksit, lidhur me ndjeshmërinë kudrejt këtij infeksioni Ibrahim A Adam *et al.* (2013). Kushtet ekologjike të zonave në fjalë janë shumë të përshtatshme për prezencën e riqnave, pasi kanë toka të papunuara me prezencë gurësh e shkuresh, me reshje të shumta shiu (komunikim personal me banorët e zonës) si dhe temperatura jo shumë të ulta në muajt e dimrit, bëjnë të mundur ruajtjen e larvave për periudhën pasardhëse. Në tokat e punuara, prezenca e riqnave *Hyalomma* është më e pakët, ku shpesh edhe mungon (komunikim personal me Prof. Zati Vatasever) ndërsa tokat e lëna dierrë për vite me radhë favorizojnë rritjen e riqnave.

Duhet të theksojmë se edhe lufta kundër riqnave nuk ka qënë aktive dhe nuk realizohet në të gjitha zonat, pasi në zonat me prevalencë të lartë të infeksionit lufta kundër riqnave nuk bëhet e programuar. Duke parë këto momente, prezencën e infeksionit në dhen dhe faktin e mundësisë së rritjes së përqindjes së infeksionit në riqna, mendojmë dhe këmbëngulim se këto të dhëna duhet të jenë sinjal alarmi për shërbimin human, po ashtu dhe për shërbimin veterinar, ku të dy së bashku të rrisin në një nivel më të lartë punën për parandalimin e përhapjes së këtij infeksioni në njerëz. Mosinformimi i popullatës njerëzore për sëmundjet virale të ndryshme, të transmetuara nga riqnat, ndikon negativisht në përhapjen e shkallës së infeksionit si rezultat i pakujdesisë ndaj riqnave Marc Mertens *et al.* (2013). Gjithashtu theksojmë se një faktor tjetër i cili ndikon në përhapjen e infeksionit CCHF është e lidhur ngushtësisht me kujdesin që paraqesin banorët e zonave për luftën kundër riqnave.

Në katër zonat e marra në studim kemi qënë dëshmitarë të mos kujdesit për eliminimin e riqnave kur ato largoheshin nga trupi i kafshëve, pasi si rregull është e detyrueshme që riqnat mbas largimit nga trupi i kafshëve duhet të grumbullohen dhe të eliminohen me djegie. Në këtë rast bëhej e kundërta sepse riqnat hidheshin në terren në mënyrë të pakujdesshme, duke krijuar kushte të favorshme për përhapjen e mëtejshme të popullatës së riqnave. Të dhënat tona përputhen dhe me të dhënat e autorëve të huaj të cilët japin shifra të larta për prezencën e këtij infeksioni në dhen Isolde Schuster *et al.* (2016). Në Kosovë gjatë hulumtimeve serologjike është përcaktuar se kafshët shtëpiake janë rezervuar të rëndësishëm të infeksionit CCHF, me pozitivitet prej 14% në gjedh dhe 32.6% në dhen, Isme Humolli *et al.* (2010). Në tre zona të ndryshme të Irakut, u grumbulluan serume nga 2.205 kafshë dhe u gjendën antitrupe të virusit CCHFV në 443/769 (57.6%) dhen, 279/562 (49.6%) dhi, 122/411 (29.3%) gjedh Swanepoel R *et al.* (1987). Gjithashtu, në një studim të vitit 1975 nga Irani, 277/728 (38%) dhen, 49/135 (36%) dhi dhe 23/130 (18%) gjedh kishin prezencë të antitrupeve IgG ndaj virusit CCHFV Obradovic *et al.* (1981).

### **Rekomandime**

-Të zgjerohet studimi për kërkime të etheve hemorragjike Krime Kongo në

Shqipëri.

-Të mundësohet kontrollimi i rriqave për prezencë të virusit CCHFV.

-Të tregohet kujdes për mirë-informimin e popullatës njerëzore (në vendet endemike) për prezencën e infeksionit CCHF në Shqipëri.

-Të tregohet kujdes në pastrimin e kafshëve bujqësore nga rriqat, kryesisht fermerët dhe veterinerët.

### Literatura

Avšič-Zupanc, T. (2008): Epidemiology and current geographical distribution of Crimean-Congo haemorrhagic fever. [http://www.arbo-oo.net/\\_data/arbozoonet-news\\_No2.pdf](http://www.arbo-oo.net/_data/arbozoonet-news_No2.pdf). 8–15

Humolli, I., Dedushaj, I., Zupanac, T.A., Mucaj, S. (2010): Epidemiological, serological and herd immunity of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Kosovo. *Med.Arch.* 64, 91–93

Ibrahim A Adam., Mubarak AM Mahmoud, and Imadeldin E Aradaib et al. (2013): A seroepidemiological survey of Crimean Congo hemorrhagic fever among Cattle in North Kordufan State, Sudan. *Virology Journal.* 2013; 10: 178. Jun 5. doi: 10.1186/1743-422X-10-178

Marriott, A.C., Nuttall, P.A. (1996): Molecular biology of nairoviruses. In: Elliott, R.M. (Ed.), *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York. pp. 91–104

Mertens M., Schmidt K., Ozkul A., Groschup M. (2013): The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Research* 6 March 2013. No. of Pages 13, 98:248–260

Obradovic M, Gligic A. (1981): Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibodies in people living in natural reservoirs. *Vojnosanit Pregl.* 38:342–346

Obradovic M., Gligic A., Stojanovic R., Stamatovic L., Boskovic R. (1978): Serological and arachno-entomological investigation of natural foci of Crimean hemorrhagic fever in various regions of Yugoslavia. *Vojnosanit Pregl.* 35:253–256

Ogimet.com <http://www.ogimet.com/resynops.phtml.en>

Papa, A., Velo, E., Papadimitriou, E., Cahani, G., Kota, M., Bino, S. (2009): Ecology of the Crimean-Congo hemorrhagic fever endemic area in Albania. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9, 713–716

Schuster I., Mertens M., Mrenoshki S., Staubach C, Mertens C, Bruning F, Wernike K., Hechinger S., Berxholi K., Mitrov D., Groschup M. (2016): Sheep and goats as indicator animals for the circulation of CCHFV in the environment. *Springer Exp Appl Acarol* 68:337–346

Swanepoel R et al. (1987): Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 36:120–132

Whitehouse, C. A. (2004): Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 64(3):145-160

Whitehouse, C.A. (2004): Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 64, 145–160