

# Analiza zakażeń lentiwirusami małych przeżuwaczy u owiec w województwie podkarpackim i małopolskim

MONIKA OLECH, JACEK KUŹMAK, ZBIGNIEW OSIŃSKI\*, MIROSŁAW WELZ\*\*

Zakład Biochemii, \*Zakład Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

\*\*Wojewódzki Inspektorat Weterynarii, ul. ks. Piotra Ściegiennego 6 A, 38-400 Krosno

Olech M., Kuźmak J., Osiński Z., Welz M.

## Analysis of small ruminant lentivirus infection in sheep from the Małopolska and Podkarpackie voivodeships

### Summary

The aim of the present study was to determine the seroprevalence of small ruminant lentiviruses (SRLV) infection in sheep from the Małopolska and Podkarpackie voivodeships in Southern Poland. A total of 1015 serum samples from sheep from 180 flocks were examined. The presence of SRLV antibodies was determined using a diagnostic ELISA kit from Institut Pourquier (Montpellier, France). Out of the 180 flocks investigated, specific antibodies to SRLV were found in 93 flocks (51.7%). When these data were approximated by using beta distribution, the seroprevalence varied from 44.4 to 58.9%. Furthermore, the probability of SRLV seroprevalence was higher in large flock size (>21 animals) (95% CI: 52.5, 89.8) than in flocks with less than 10 animals (95% CI: 4.7, 34.7). Specific antibodies were found in 286 (28.2%) individual sheep out of 1015 tested. The mean true seroprevalence – calculated by the Bayesian method – was 26.5% (95% CI: 23.6, 29.4). The probability of the incidence of SRLV seropositivity was higher with a large flock size (>21 animals) (95% CI: 21.5, 41.6) than in flocks with less than 10 animals (95% CI: 0.0, 13.6).

This study showed a high prevalence of SRLV infection in sheep flocks from both voivodeships at both animal and herd level. Large flocks had higher seroprevalence than smaller ones. The appearance of high seroprevalence of large herd size may be due to horizontal transmission by respiratory secretions when there is a high animal density.

**Keywords:** Small ruminant lentiviruses, true prevalence, ELISA test

Według obowiązującej klasyfikacji, lentiwirusy małych przeżuwaczy (SRLV) stanowią odrębną grupę w obrębie rodzaju *Lentivirus*, rodziny *Retroviridae*, która uwzględnia wirus choroby maedi visna owiec (VMV) i wirus zapalenia stawów i mózgu kóz (CAEV). Jedną z podstawowych cech tych patogenów jest zdolność pokonywania bariery gatunkowej (*cross species infection*), bowiem, jak wykazano, w warunkach naturalnych owce mogą być gospodarzem dla wirusa choroby maedi visna owiec (VMV), ale także wirusa zapalenia stawów i mózgu kóz (CAEV). Dało to podstawę do nowej klasyfikacji SRLV, z podziałem na sześć grup genetycznych (A-E). Ostatnio przeprowadzone badania wykazały, że lentiwirusy izolowane od owiec w Polsce zaliczane są do dwóch nowych podgrup, określanych jako A12 i A13 (8).

Zakażenia SRLV notowane są na całym świecie, ze szczególnym nasileniem w krajach Europy Zachodniej i Ameryki Północnej, a podstawą identyfikowania zakażonych osobników jest wykrywanie swoistych

przeciwciał w surowicy. Zakażenia te u owiec wiążą się z wymiernymi skutkami ekonomicznymi. Wprawdzie forma kliniczna choroby najczęściej występuje u owiec starszych (5) i stałą tendencją na świecie jest występowanie zakażeń bezobjawowych, w stadach, w których stwierdza się zakażenia, notuje się pogorszenie kondycji zwierząt, obniżenie przyrostów masy ciała, rodzenie słabszych jagniąt (6). Obecność wirusa u starszych osobników wiąże się z częstszym występowaniem zapaleń gruczołu mlekowego i zmianami zapalnymi w stawach. W niektórych przypadkach zakażeniom towarzyszą zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym (2).

W Polsce, podobnie jak w innych krajach, nie stosuje się powszechnych programów zwalczania, stąd wiedza o stopniu występowania zakażeń SRLV jest ograniczona. Wyrównkowe badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały zróżnicowany odsetek zakażonych owiec w poszczególnych stadach. W Polsce hodowla owiec związana jest ściśle z poszczególnymi

regionami, głównie z województwami małopolskim i podkarpackim, w których stanowią znaczący odsetek pogłównia utrzymywanego w kraju.

Celem badań była ocena występowania zakażeń SRLV u owiec na terenie województwa małopolskiego i podkarpackiego, przeprowadzona w oparciu o wykrywanie swoistych przeciwciał.

### Materiał i metody

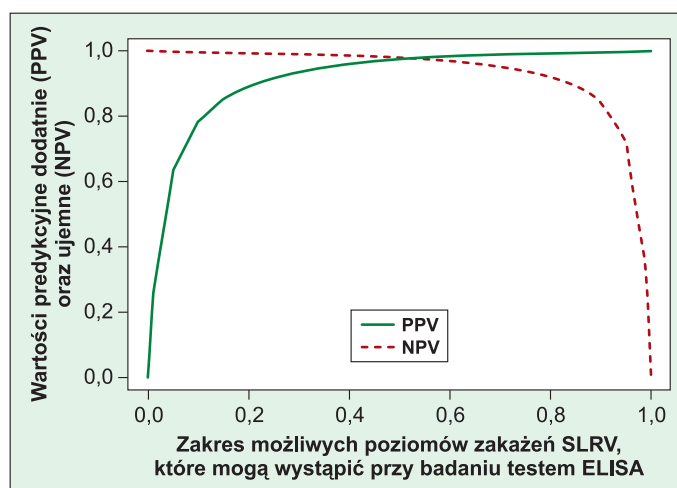
Badania przeprowadzono na terenie województwa małopolskiego i podkarpackiego, wykorzystując próbki surowicy krwi pobrane od owiec w ramach badań monitoringowych w kierunku brucelozы owiec i kóz, zgodnie z Rozp. MRiRW z 22.02.2006 r. Probki dostarczano do PIWet-PIB z poszczególnych ZHW. Ogółem zbadano 1015 próbek surowicy uzyskanych od zwierząt pochodzących ze 180 stad. Z terenu województwa małopolskiego badaniami objęto 391 zwierząt ze 126 stad, a z terenu województwa podkarpackiego 624 owce pochodzące z 54 stad. Obecność przeciwciał dla SRLV oznaczono testem ELISA, wykorzystując zestaw diagnostyczny firmy Institut Pourquier® (Montpellier, Francja), zgodnie z zaleceniami producenta.

Możliwości diagnostyczne testu ELISA oceniono poprzez obliczenie wartości predykcyjnych, czyli obliczenie prawdopodobieństwa, że zwierzęta z dodatnim wynikiem testu rzeczywiście są zakażone SRLV (wartość predykcyjna dodatnia PPV), a zwierzęta z ujemnym wynikiem testu, rzeczywiście są niezakażone (wartość predykcyjna ujemna NPV). Wyniki testu ELISA analizowano przy założeniu czułości testu wynoszącej 98% i swoistości 97%. Wartości te określono na podstawie danych literaturowych (10).

W przeprowadzonych badaniach analizie poddano występowanie swoistych przeciwciał na poziomie stad i na poziomie zwierząt. W analizie sytuacji epidemiologicznej na poziomie stad, ze względu na ich różną liczebność, zastosowano modelowanie z wykorzystaniem rozkładu beta. Obliczenia wykonano za pomocą programu BetaBuster. W badaniach dotyczących występowania zakażeń u indywidualnych osobników, w celu uwzględnienia wpływu niedoskonałości testu ELISA oraz możliwych błędów związanych z różną liczbą badanych próbek na wiarygodność wyników, zastosowano modelowanie z wykorzystaniem metody Bayesa (4, 9). W efekcie uzyskano wartości odnoszące się do rzeczywistego poziomu występowania swoistych przeciwciał tzw. *true prevalence* (TP) (4).

### Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania wykazały obecność swoistych przeciwciał w 156 (39,9%) próbkach z województwa małopolskiego, natomiast w materiale uzyskanym z województwa podkarpackiego obecne były one w 130 (20,8%). Ogółem obecność przeciwciał stwierdzono w 286 (28,2%) próbkach surowicy krwi. W województwie małopolskim liczba stad z obecnością przynajmniej jednego osobnika serologicznie dodatniego wynosiła 74 (58,7%), a w województwie podkarpackim 19 (35,2%). Ogółem osobniki serologicznie dodatnie zanotowano w 93 (51,7%) stadach, spośród 180 badanych.



Ryc. 1. Wartości predykcyjne dodatnie (PPV) i ujemne (NPV) wyznaczające możliwości diagnostyczne zastosowanej metody ELISA

Podstawowym pytaniem odnoszącym się do interpretacji takich wyników jest pytanie o ich wiarygodność. Wiarygodność ta limitowana jest zasadniczo niedoskonałością testu diagnostycznego oraz problemami związanymi z zastosowanym systemem pobierania próbek i liczbą badanych próbek. W pierwszej kolejności analizowano możliwości diagnostyczne testu ELISA, biorąc pod uwagę zróżnicowany poziom zakażenia i różną liczebność stad. Na ryc. 1 przedstawiono rozkłady prawdopodobieństwa wystąpienia wyników dodatnich oraz ujemnych i, jak wykazała analiza, badając grupy zwierząt o niskim ( $TP < 5\%$ ) oraz wysokim ( $TP > 97\%$ ) współczynniku prevalencji rzeczywistej, istnieje niskie prawdopodobieństwo otrzymania wiarygodnych wyników. Wyniki badań wykazały, że przeważająca część analizowanych stad (128/180) mieściła się w zakresie tych wartości, zatem trudno było wyciągnąć wniosek o rzeczywistym poziomie zakażenia w tych stadach. Sytuacja taka wynikała z faktu uwzględniania w badaniach jedynie niewielkiego odsetka stad (6,65%) spośród wszystkich występujących na terenie obydwu województw. Wyniki, które odzwierciedlałyby rzeczywisty stan zakażenia, możliwe byłyby do otrzymania przy stopniu zakażenia stad w zakresie od 10% do 90%.

W prezentowanych badaniach przeważająca większość stad mieściła się w zakresach o niskim prawdopodobieństwie otrzymania wiarygodnych wyników, dlatego przy wykorzystaniu rozkładu beta dokonano analizy wpływu systemu pobierania próbek na wyniki. Ocena taka, uwzględniająca wszystkie 2688 stad (dane z IRZ ARiMR) występujących na terenie obydwu województw wykazała, że odsetek stad, które należałoby zakwalifikować jako „dodatnie” mieściłaby się w zakresie od 44,4% do 58,9%. Ponieważ badane stada reprezentowały zróżnicowaną liczebność i element ten nie był uwzględniony przy ich doborze, parametr ten poddano również analizie rozkładem beta. W tym celu wśród wszystkich badanych stad wyszczególnio-

Tab. 1. Współczynnik prewalencji dla stad w zależności od ich liczebności

Liczebność stada	Liczba zbadanych stad	Stada dodatnie w teście ELISA (AP)	Oszacowany poziom stad dodatnich (TP)
1-5	35	4 (11,4%)	(4,7%-26,1%)
6-10	17	2 (11,8%)	(3,6%-34,7%)
11-20	23	11 (47,8%)	(29,1%-67,2%)
21-50	50	36 (72,0%)	(58,3%-82,5%)
51-100	33	23 (69,7%)	(52,5%-82,6%)
> 100	22	17 (77,3%)	(56,3%-89,8%)

no sześć grup o liczebności, kolejno: 1-5, 6-10, 11-20, 21-50, 51-100 i powyżej 100 zwierząt. Odsetek stad, w których wykryto obecność zwierząt serologicznie dodatnich w poszczególnych grupach, wahał się w zakresie od 11,4% do 77,3% i wartości te przedstawiają dane zaobserwowane (apparent prevalence – AP), otrzymane w badaniu testem ELISA (tab. 1). Dane te poddano następnie szacowaniu, przedstawiając prawdopodobny, maksymalny odsetek stad, które mogłyby być uznane za „dodatnie”, z uwzględnieniem 95% przedziału ufności. Wartości tych zakresów dla poszczególnych grup wahały się od (4,7-26,1%) do (56,3-89,9%) (tab. 1). Na ryc. 2a przedstawiono graficzną reprezentację tych wyników wskazującą, że w grupie stad małych, o liczebności do 10 zwierząt, oszacowana wartość wskazująca na stada, które mogłyby być wykryte jako „dodatnie”, nie przekraczała 34,7%. Natomiast w grupie stad o liczebności powyżej 21 osobników odsetek ten zawierał się w przedziale od 52,5% do 89,8%.

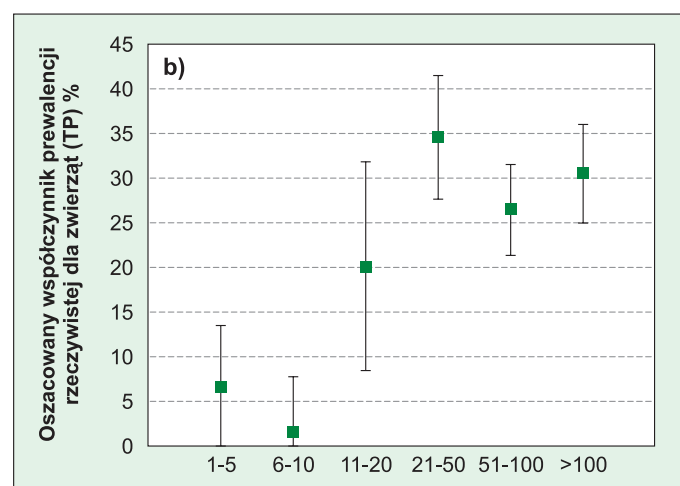
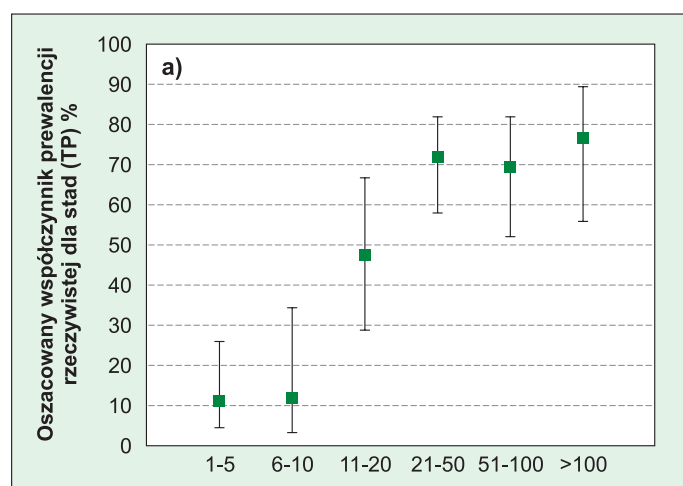
W kolejnym etapie pracy weryfikacji poddano dane dotyczące indywidualnych zwierząt, analizując wiarygodność otrzymanych wyników w aspekcie liczby próbek użytych do badań. Do badań użyto próbek surowicy krwi z badań monitoringowych w kierunku brucelozы owiec i kóz, jednak ze względów organiza-

Tab. 2. Współczynnik prewalencji dla zwierząt w stadach o różnej liczebności

Liczebność stada	Liczba zbadanych zwierząt	Współczynnik prewalencji obliczony na podstawie wyników testu ELISA (AP)	Oszacowany współczynnik prewalencji rzeczywistej (TP)
1-5	75	7 (9,3%)	6,7% (0,0%-13,6%)
6-10	45	2 (4,4%)	1,5% (0,0% - 7,9%)
11-20	54	12 (22,2%)	20,2% (8,6%-31,9%)
21-50	203	73 (36,0%)	34,7% (27,7%-41,6%)
51-100	333	94 (28,2%)	26,6% (21,5%-31,6%)
> 100	305	98 (32,1%)	30,7% (25,1%-36,2%)

cyjnych możliwe było skorzystanie jedynie z 1,14% takich próbek. Uwzględniając wyniki otrzymane przy pomocy modelowania z wykorzystaniem metody Bayesa należy przyjąć, że prawdopodobny poziom występowania zwierząt serologicznie dodatnich, przy uwzględnieniu 88 748 zwierząt (dane z IRZ ARiMR), wynosiłby 26,5%, z zakresem od 23,6% do 29,4%. Wyniki takie porównywalne są wynikami uzyskanymi w oparciu o faktyczne badanie testem ELISA, które potwierdziło obecność przeciwciał u 28,2% próbek. Podobnie jak przy analizie stad, wyniki te odnoszono do poszczególnych grup stad, jako funkcję ich liczebności (tab. 2). Wartości te wahały się od 6,7% (0,0-13,6%) do 30,7% (25,1-36,2%), z uwzględnieniem 95% przedziału ufności. Rycina 2a przedstawia prezentację tych wyników wskazującą, że odsetek zwierząt zakażonych w stadach małych nie przekroczyłby 13,6%, podczas gdy w stadach bardziej licznych (więcej niż 21 zwierząt) wartości te wahałyby się od 21,5% do 41,6%.

Prezentowane badania potwierdziły dość wysoki odsetek osobników serologicznie dodatnich w kierunku zakażeń SRLV. W badaniach przeprowadzonych na początku lat 90. przez Kołodzieja i wsp. w grupie 1000 dorosłych owiec z terenu województwa dolno-



Ryc. 2. Oszacowany współczynnik prewalencji (true prevalence) a) dla stad zwierząt, b) dla zwierząt w stadach o różnej liczebności

śląskiego średni odsetek zwierząt serologicznie dodatnich wynosił 54% i wahał się od 30% do 73%, w poszczególnych stadach. Natomiast badania serologiczne przeprowadzone w 2001 r. na terenie województw: małopolskiego, pomorskiego i dolnośląskiego, wykazały występowanie swoistych przeciwciał w 173 (49,1%) próbkach spośród 352 zbadanych, a odsetek zwierząt serologicznie dodatnich wahał się w przedziale od 0,5% do 96,1%.

Analizowane wyniki wskazują na częstsze występowanie choroby w dużych stadach. Teza ta była przytaczana w pracach innych autorów (1), którzy oceniając czynniki ryzyka związane z występowaniem choroby maedi visna, główną rolę przypisali elementowi liczebności stada. Bardziej liczne stada charakteryzowały się zdecydowanie większą liczbą zwierząt serologicznie dodatnich. Zwiększonej częstości zakażeń, będącej głównie rezultatem areogennej transmisji wirusa, sprzyjają tradycyjne systemy odchowu zwierząt (3). Dodać można, że jakkolwiek czynnikiem etiologicznym zakażeń jest lentiwirus, to, jak wynika z licznych badań i obserwacji terenowych, występowanie i rozprzestrzenianie się zakażeń SRLV, jak i skłonność zwierząt do rozwoju klinicznej formy choroby związana jest z innymi elementami, jak: rasa, wiek, system utrzymania zwierząt, sposób odchowu jagniąt.

### Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały wysoki stopień występowania zakażeń SRLV u owiec na terenie obu badanych województw, tak w odniesieniu do stad, jak i poszczególnych osobników. Zastosowane metody

analizy statystycznej pozwoliły na oszacowanie danych otrzymanych z badań serologicznych, przeprowadzonych na ograniczonej populacji zwierząt i stosunkowo niewielkiej liczbie stad. Dane te mogą być przydatne do oceny sytuacji epizootycznej i mieć znaczenie w opracowywaniu strategii programów zwalczania zakażeń SRLV.

### Piśmiennictwo

1. *Alba A., Allepuz A., Serrano E., Casal J.*: Seroprevalence and spatial distribution of maedi-visna virus and pestiviruses in Catalonia (Spain). *Small Rum. Res.* 2008, 78, 80-86.
2. *Benavides J., García-Pariente C., Fuertes M., Ferreras M. C., García-Marín J. F. R., Juste A., Perez V.*: Maedi-Visna: the Meningoencephalitis in Naturally Occurring Cases. *J. Comp. Path.* 2009, 140, 1-11.
3. *Berriatua E., Alvares V., Extramiana B., Gonzales L., Daltaubuit M., Juste R.*: Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* 2003, 60, 265-279.
4. *Branscum A. J., Gardner I. A., Johnson W. O.*: Bayesian modeling of animal- and herd-level prevalences. *Prev. Vet. Med.* 2004, 66, 101-112.
5. *Brodie S., Concha-Bermejillo A., Snowden G., Demartini J.*: Current concepts in the epizootiology, diagnosis and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America. *Small Rum. Res.* 1998, 27, 1-17.
6. *Calavas D., Bugnard F., Ducrot C., Sulpice P.*: Classification of clinical types of udder disease affecting nursing ewes. *Small Rum. Res.* 1998, 29, 21-31.
7. *Juganaru M., Reina R., Bertolotti L., Stella M. C., Profiti M., Armentano M., Bollo E., Amorena B., Rosati S.*: In vitro properties of small ruminant lentiwirus genotype E. *Virology* 2011, 410, 88-95.
8. *Olech M., Rachid A., Croise B., Kuźmak J., Valas S.*: Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res.* 2012, 163, 528-536.
9. *Rogan W. J., Gladen B.*: Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 1978, 107, 71-76.
10. *Toft N., Akerstedt J., Tharaldsen J., Hopp P.*: Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Vet. Microbiol.* 2007, 120, 77-86.

Adres autora: mgr Monika Olech, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;  
e-mail: monika.olech@piwet.pulawy.pl