

比較酵素結合免疫吸附法與巢式聚合酶連鎖反應 對山羊關節炎腦炎之檢測⁽¹⁾

章嘉潔⁽²⁾⁽³⁾ 吳昇陽⁽²⁾

收件日期：104 年 7 月 28 日；接受日期：105 年 2 月 2 日

摘 要

本試驗旨在進行山羊關節炎腦炎 (Caprine arthritis encephalitis, CAE) 血清監控及比較酵素結合免疫吸附法 (ELISA) 與巢式聚合酶連鎖反應 (nested polymerase chain reaction, nested PCR) 篩檢法，以提供控制本病方法之參考。試驗地點為臺東某羊場共 129 頭努比亞山羊，分別採集受檢羊隻之頸靜脈血樣 10 mL，經離心取得血清後進行 CAE 抗體檢測。本研究第一階段使用 ELISA，監測山羊 CAE 狀況，血清學評估採 CAEV/MVV Antibody Test Kit (CHEKIT) 商業套組，檢測結果所示 CAE 檢出率 71.3% (92/129)，在 3 至 12、13 至 24 及 24 月齡以上之不同年齡層，CAE 檢出率分別為 77.9% (88/113)、54.5% (6/11) 及 0% (0/5)。另羊隻依性別分類檢測 CAE 結果所示，其中母羊檢測陽性反應檢出率為 72.6 % (45/ 62)，公羊檢測陽性反應為 70.1% (47/ 67)，結果顯示 CAE 檢出率與性別無關。第二階段採血萃取 DNA，利用 nested PCR 檢測山羊關節炎腦炎病毒 (Caprine arthritis encephalitis virus, CAEV) 之 *pol* 片段並定序確認，檢測 129 頭羊呈陽性反應 97 (75.2%)，增加 5 頭陽性羊隻，進行卡伯統計 (Kappa statistic) 分析結果 $\kappa = 0.70$ ，證實 ELISA 和 nested PCR 兩檢測結果呈現之高度一致性。

關鍵詞：山羊、山羊關節炎腦炎、酵素結合免疫吸附法、巢式聚合酶連鎖反應。

緒 言

山羊關節炎腦炎是一種山羊慢性進行性疾病，由反轉錄病毒科 *Retroviridae* 中之慢病毒 *Lentivirus* 屬引發 (Cork *et al.*, 1974)。CAEV 主要標的細胞為單核細胞 (monocytes) 和巨噬細胞 (macrophages) (Narayan *et al.*, 1983)，病毒感染以原病毒的形式將基因組整合到細胞染色體中，經反轉錄過程才會形成嵌入型原病毒 DNA (integrated proviral DNA)，使得 CAEV 長期滯留在單核細胞內 (Zink *et al.*, 1987)，此病呈持續性感染狀態，感染初期並無大量病毒產生，而感染後誘發抗體產生時間因個體會有所差異，大部份感染羊隻都不會有臨床症狀，但會呈持續性感染狀態，造成長期傳播帶原狀態 (Gendelman *et al.*, 1985; Hanson *et al.*, 1996)，而病毒感染可引起多種不同臨床表現，除造成關節炎外，亦導致間質性肺炎、腦脊髓炎及硬結性乳腺炎等不同綜合病症 (Adams *et al.*, 1983; Narayan and Cork, 1985)。

目前已知 CAE 傳播的途徑，主要為垂直傳染，即 CAEV 藉由初乳或乳汁餵飼傳給仔羊 (Pisoni *et al.*, 2007)，另一感染方式為水平傳播，機制尚不明確，可能通過同欄舍羊隻間長期接觸而造成感染，使各年齡的羊隻染病 (Rowe and East, 1997; Blacklaws, 2012)。本疾病因感染後至症狀出現警覺不易，尚無藥物或疫苗可治療，為養羊業造成了相當嚴重的經濟損失 (Luengo *et al.*, 2004; Peterhans *et al.*, 2004; Reina *et al.*, 2009)。在 CAE 的診斷中，通常根據臨床症狀、病理變化可作出初步診斷，但確切診斷還需要借助於實驗室技術，先進行病毒的分離，隨後用免疫組織化學、核酸探針 / 原位雜交、PCR 及其衍生技術等及動物試驗再驗證。目前檢測方式以血清學抗體診斷為主，如瓊脂膠體免疫擴散反應 (agargel immunodiffusion, AGID)、比較酵素結合免疫吸附法 (ELISA) 等，AGID 是用於檢測血清中 CAE 抗體常用的方法，也是國際獸醫組織 (OIE) 所推薦；但敏感度較差，且在檢測中存在一定的假陽性，於 2004 年 OIE 會議將 ELISA 訂為 CAE 檢測的標準方法，相較 AGID 檢測，ELISA 更敏感、更經濟、方便購得診斷試劑套組，

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2352 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所台東種畜繁殖場。

(3) 通訊作者，E-mail：janices@mail.tlri.gov.tw。

能夠大規模的血清學檢測 (Herrmann-Hoesing *et al.*, 2003; de Andrés *et al.*, 2005)。經檢測呈抗體陽性之羊隻，大致可確定已受病毒感染，但未檢測出抗體羊隻，尚不能認定其未受感染，原因是感染至抗體產生有所延遲，致有些仍無法檢測得抗體，實際上該羊隻可能已受到感染 (East *et al.*, 1987; Rimstad *et al.*, 1993)。本研究使用 CAE ELISA 診斷試劑套組及 nested PCR 檢測技術進行比較，透過檢疫診斷與控制，逐年降低帶有 CAE 羊隻並採隔離飼養，促進養羊產業的健康發展提供改善方式。

材料與方法

I. 血清樣品採集

自臺東某一羊場之外觀健康無病徵之努比亞種羊 129 頭，記錄動物年齡及性別。由頸靜脈採集血樣，俟其凝固後，經 1,200 × g 離心 20 分鐘，分離血清，保存於 -20°C 備測。

II. 血清中 CAE 抗體分析

抗體評估以市售 CAE ELISA 商業套組 (CHEKIT CAEV/MVV Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories, Inc. USA) 依其操作方法進行檢測。其血清抗體之陽、陰性標準依下列公式計算後判定。

$$\text{Value (\%)} = (\text{OD sample} - \text{OD negative} / \text{OD positive} - \text{OD negative}) \times 100\%$$

Negative < 30%, Suspect ≥ 30 to < 40%, Positive ≥ 40%

其中：OD sample 為樣品測出吸光值，OD negative 為陰性控制組測出吸光值，OD positive 為陽性控制組測出吸光值，Negative 為判定陰性，Suspect 為判定疑似，Positive 為判定陽性。

III. CAE 之 nested PCR 檢測

(i) DNA 萃取：

ELISA 檢測陰性羊隻進一步採取 3 至 5 mL 全血，1,500 rpm 離心 30 min，可見血液明顯分層，吸取中間雲霧層細胞，即為外周血單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)，將收集的 PBMCs 用 10 mL PBS (Invitrogen) 洗滌一次，3,000 rpm 離心收集細胞，再洗滌一次，即可用於樣品 DNA 的提取。利用 DNA 純化套組 (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) 依照其操作步驟進行 DNA 之提取及純化，之後進行 nested PCR，檢測病毒核苷酸。

(ii) CAEV *pol* 序列引子設計：

參考 Leroux *et al.* (1997) 等提供 *pol* 引子之序列，由生工有限公司合成 (MDBio, Taiwan)，第一組 PCR 使用 CAEV *pol* 序列引子 5374 (5'-aca gaa gag aaa tta aaa gg -3') 及 5376 (5'-atc atc cat ata tat gcc aaa ttg -3') 預期產物 476 bp，第二組 PCR 反應，使用引子序列為 5375 (5'-cag gga agt gga gaa tgt taa t -3') 及 5377 (5'-ggg ata gta aaa tat gca tct cct -3')，nested PCR 方式確認 *pol* 區域之部份片段，預期產物 153 bp。

(iii) PCR 及電泳：

提取 DNA 做為樣本進行 nested PCR。PCR 反應液含有 2 μM DNA，10 μM 的第一組引子各 1 μL，Taq DNA 聚合酶 (MDBio, Taiwan) 0.4 μL (5 U/μL)，10 × PCR buffer 5 μL，10 mM dNTP 1 μL 及 2dH₂O 38 μL，PCR 反應總體積約為 50 μL。PCR 條件為 94°C 5 min; 94°C 30 sec、50°C 1 min 與 70°C 1 min，循環 30 次最後為 70°C 5 min，完成第一組 PCR。取 2 μL 第一組 PCR 產物當模版，進行第二組 PCR 反應，使用引子第二組濃度為 10 μM 各取 1 μL，PCR 條件為 94°C 5 min; 94°C 30 sec、52°C 40 sec 與 72°C 45 sec，循環 30 次。電泳分析取 7 μL 產物並加入 2 μL 的 6 × Loading buffer，置入 1.5% 瓊脂糖膠片內，於 1 × Tris-acetate-EDTA (TAE) 緩衝液中進行電泳，條件為 70 Volt 45 min，電泳後將膠片染色，並於紫外燈箱上觀察記錄結果。

IV. DNA 序列分析與比對

取 PCR 產物送至核苷酸定序服務公司定序確認，再進行序列分析。序列分析的資料利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 進行 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對，以瞭解序列的正確性與比對網路資料庫中的相似序列。

V. 統計分析

相關數據利用 SAS 套裝軟體 (Statistical Analysis System; SAS, 2005) 進行統計分析，並以卡方檢定 (Chi-square Test) 比較因子間之相關性。另以 Kappa 係數確定的不同檢測的結果之間信度，κ 值的結果可分為五組不同等級的吻合程度：0.0 – 0.20 極低的吻合度 (slight)、0.21 – 0.40 一般的吻合度 (fair)、0.41 – 0.60 中等的吻合度 (moderate)、0.61 – 0.80 高度的吻合度 (substantial) 和 0.81 – 1 幾乎完全吻合 (almost perfect)。

結果與討論

本研究第一階段使用 ELISA 方式，監測山羊 CAE 病毒狀況，CAE 之血清病毒抗體檢測以半年為一間隔，將 7 月齡以上陰性並與陽性成羊分棟隔離飼養，血清學評估採 CAEV/MVV Antibody Test Kit (CHEKIT) 商業套組，結果總共 129 頭羊 CAE 檢出率 71.3% (92/129)，在 3 至 12、13 至 24 及 24 月齡以上之不同年齡層，CAE 檢出率分別為 77.9 % (88/113)、54.5 % (6/11) 及 0 % (0/5)。將吳等 (2012) 未隔離方式飼養 CAE 檢出率與本次 2013 年 CAE 檢出率相比較，3 至 12 月齡檢出率分別 85.7 % (72/84) 與 77.9 % (88/113)、13 至 24 月齡陽性率分別 92.5% (25/27) 與 54.5% (6/11) 及 24 月齡以上陽性率分別 100% (20/20) 與 0% (0/5)，顯示隔離分開飼養阻斷病原之成效，之前學者研究飼養族群大小和動物的年齡，與個別血清陽性率增加呈顯著相關 (Simard and Morley, 1991; Arsenault *et al.*, 2003)，推測水平感染隨 CAE 抗體陽性羊隻接觸之曝露時間，增加 CAE 感染之機會提高的可能性 (Dawson, 1980; Keen *et al.*, 1997; Blacklaws *et al.*, 2004; Ghanem *et al.*, 2009)，適時的隔離與淘汰措施，有助於降低 CAE 水準感染之機會 (Leginagoikoa *et al.*, 2006; Leitner *et al.*, 2010)。另實驗依羊隻性別分類檢測 CAE 結果，其中母羊檢測陽性反應為 72.6 % (45/ 62)，公羊檢測陽性反應為 70.1% (47/ 67)，結果顯示羊隻之陽性率與性別無關。此結果與學者提出性別並未影響 CAE 抗體檢出率 ($P = 0.71$) 之結論一致 (Lara *et al.*, 2005; Ghanem *et al.*, 2009)。

關於 CAE 感染羊隻經長期飼養後才會陸續出現臨床症狀，而在感染初期並無可辨識之症狀，市面上可購得 CAE ELISA 套組，其操作方便且可檢測大量血清樣本，在診斷應用上更廣泛、普遍，每半年進行監測隔離，但 ELISA 血清反應檢測結果呈陽性的羊隻，被認為是已受病毒之感染；但陰性結果尚不能判定未受感染，原因是受病毒感染羊隻，剛開始不會大量複製病毒，但隨著年齡增加其血清轉陽性比率會逐漸被表現 (Rowe *et al.*, 1991; Rimstad *et al.*, 1993, 1994)，故早期研究必須經一段時間再重複檢測以確認感染情形 (Mackenzie *et al.*, 1987; Rowe *et al.*, 1992)。PCR 技術是目前應用最廣泛的分子生物學檢測技術，該方法特異性高，操作簡單，快速 (Elfahal *et al.*, 2010; Hermann-Hoesing, 2010)，但 PCR 應用於 CAEV 檢測仍存在一些困難，在於 CAEV 屬反轉錄病毒，在複製過程中由於反轉錄酶缺乏校對功能，因此病毒株極易發生突變，約 10^5 個鹼基中就存在 1 個鹼基配對錯誤的機率。其次在感染動物體內，病毒的濃度很低，目前大部分進行 PCR 檢測，收集外周血單核細胞 (PBMCs) 做為目標細胞，然而大約只有 $1/10^6$ 個白血球細胞 (leukocytes) 中藏病毒，如低於 PCR 的檢測限度可能會出現假陰性 (Peterhans *et al.*, 2004; de Andrés *et al.*, 2005; Reina *et al.*, 2006)。故建立之檢測條件要普遍並具適用性，為了預防引子錯誤配對而出現假陰性，設計 PCR 檢測引子序列應選擇相對較保守的區域。

第二階段以 ELISA 分析血清陰性反應羊隻，進一步採血萃取 DNA，透過 nested PCR 利用兩組專一性引子，去偵測 *pol* 基因片段，而 β -actin 大小片段產物，用以表示研究中所用血液樣品抽取的 DNA 樣品品質一致，經完成第二組 PCR 反應，電泳可得二條 153 bp CAEV *pol* 及 393 bp β -actin 大小片段產物，檢測 PCR 產物回收，進行定序分析與比對以作為確認 (圖 1)。序列分析資料利用 NCBI 進行 DNA BLAST 比對 (圖 2)，結果使用 nested PCR 的方式確實可增幅出 CAEV 之 *pol* 片段，進行定序與序列分析證實。

CAEV 基因體是由線性單股 RNA 組成，大小約 9,000 至 10,000 bp，Saltarelli 等分析 CAEV-CO 病毒核酸序列，顯示基因組由 *gag*、*pol* 及 *env* 等 3 個結構基因和一些附加基因所排列組成 (Saltarelli *et al.*, 1990)。*gag* 基因，特異性抗原基因，含 p25 套殼蛋白 (capsid protein; CA)、p14 核套殼蛋白 (nucleocapsid protein; NC) 及 p17 基質蛋白 (matrix protein; MA) (Barbara and Blacklaws, 2012)。CAEV 感染初期，羊即產生抗 p14 套殼蛋白之抗體，且穩定存在於整個感染過程中，因此常被用來作為診斷病毒主要的抗原 (Kwang *et al.*, 1996; de Andrés *et al.*, 2005)。*pol* 基因編碼病毒核酸轉錄及複製過程中所需蛋白 (Saltarelli *et al.*, 1990)，包括反轉錄酵素 (reverse-transcriptase or RNA dependent DNA polymerase, RTase)、嵌合酵素 (integrase, IN)、蛋白分解酵素 (protease, PR)、RNase 及 dUTPase (Berger *et al.*, 2001; Payne and Elder, 2001; Desrosiers, 2007)，不同病毒株的 *pol* 基因同源性較高，比較序列發現也較為保守 (Leroux *et al.*, 1995)。*env* 基因編碼病毒封套醣蛋白 (envelop glycoprotein or surface protein; SU) gp135，及轉移膜蛋白 (transmembrane protein; TM) gp46 (Vigne *et al.*, 1982)。病毒封套醣蛋白與宿主細胞接受體結合而進入到宿主細胞內進行感染 (Hullinger *et al.*, 1993)。*env* 基因序列比其他基因變異度大 (Knowles *et al.*, 1991)，因此用此辨認不同病毒株的特性、抗原變異性及中和病毒的能力 (Valas *et al.*, 2000)。目前試驗以 *pol* 序列設計 PCR 引子，考量較 *gag* 更為保守，不選擇 *env* 因其變異度高。

Clavijo and Thorsen (1996) 等根據 *gag* 基因序列建立 PCR 診斷方法，以 40 頭山羊進行檢測，其中 31 件為 PCR 陽性，而 ELISA 檢測僅 12 件為陽性，推測 PCR 檢測方法的敏感性高於 ELISA。Celer *et al.* (2000) 以 *gag* 序列設計 PCR 引子，針對 30 件血清檢測陽性羊進行 semi nested PCR 檢測，結果 21 件 PCR 檢測呈陽性；對 68 件血清檢測陰性羊進行 semi nested PCR 檢測，結果 62 件血清檢測陰性 PCR 檢測呈陰性，而另 6 頭羊最終證實感染 CAE，因

本研究結合相關研究建立 ELISA 及 nested PCR 方法，用以 CAE 病原及其感染的檢疫診斷與控制，CAE 歸類動物乙類疫病，為出、入境必檢項目，建立有效的檢測方法，加強檢疫，即時隔離和撲殺檢測陽性羊隻，對於養羊產業的健全發展深具意義。由於本病在臺灣血清陽性率極高，迄今尚無控制 CAE 感染的有效策略可運用，唯一可行之控制措施，可採用本試驗 ELISA 血清檢測方式及 nested PCR 法篩選羊群，並隔離或淘汰血清呈陽性反應的羊隻，逐步建立陰性羊群，以降低陽性率，減少經濟上的損失。

誌 謝

本試驗承農業委員會科技計畫 (103 農科 -2.1.6- 畜 -L1(1)) 經費補助，試驗期間同仁陳威成、孫明德及陳正宏先生協助工作，特此誌謝。

參考文獻

- 吳昇陽、林正鏞、章嘉潔。2012。山羊關節炎腦炎監測之研究。畜產研究 45：331-340。
- Adams, D. S., A. P. Klevjer, J. L. Carlson, T. C. McGuine and J. R. Gorham. 1983. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. Am. J. Vet. Res. 44: 1670-1675.
- Arsenault, J., P. Dubreuil, C. Girard, C. Simard and D. Bélanger. 2003. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). Prev. Vet. Med. 59(3): 125-137.
- Berger, N., A. E. Heller, K. D. Störmann and E. Pfaff. 2001. Characterization of chimeric enzymes between caprine arthritis-encephalitis virus, maedi-visna virus and human immunodeficiency virus type 1 integrases expressed in *Escherichia coli*. J. Gen. Virol. 82 (Pt 1): 139-148.
- Blacklaws, B. A. 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 35(3): 259-269.
- Blacklaws, B. A., E. Berriatua, S. Torsteinsdottir, N. J. Watt, D. de Andres, D. Klein and G. D. Harkiss. 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. Vet. Microbiol. 101(3): 199-208. (Review)
- Celer, V. J., V. Celer, E. Nejedla, G. Bertoni, E. Peterhans and R. G. Zanoni. 2000. The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech maedi-visna isolates based on *gag* gene sequences. J. Vet. Med. 47: 203-215.
- Clavijo, A. and J. Thorsen. 1996. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis encephalitis. Small Ruminant Res. 22(1): 69-77.
- Cork, L. C., W. J. Hadlow, T. B. Crawford, J. R. Gorham and C. Piper. 1974. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. J. Infect. Dis. 129: 134-141.
- Dawson, M. 1980. Maedi/visna: a review. Vet. Rec. 106 (10): 212-216.
- de Andrés, D., D. Klein, N. J. Watt, E. Berriatua, S. Torsteinsdottir, B. A. Blacklaws and G. D. Harkiss. 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. Vet. Microbiol. 107: 49-62.
- Desrosiers, R. C. 2007. Nonhuman lentiviruses. In: Knipe, D. M. and P. M. Howley, editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, William & Wilkins; pp. 2215-2243.
- East, N. E., J. D. Rowe, B. R. Madewell and K. Floyd. 1987. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190(2): 182-186.
- Elfahal, A. M., A. M. Zakia and A. M. El-Hussien. 2010. First report of caprine arthritis encephalitis virus infection in Sudan. J. Anim. Vet. Adv. 9(4): 736-740.
- Gendelman, H. E., O. Narayan, S. Molineaux, J. E. Clements and Z. Ghotbi. 1985. Slow persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7086-7090.
- Ghanem, M., S. A. El-Khodery, A. A. Saad, S. A. Elragaby, A. H. Abdelkader and A. Heybe. 2009. Prevalence and risk factors of caprine arthritis encephalitis virus infection (CAEV) in Northern Somalia. Small Ruminant. Res. 85: 142-148.
- Gonzales, J. C. V., C. Y. Domingo, N. S. Abes, C. A. Gutierrez, M. A. Villanueva and C. N. Mingala. 2013. Concordance of competitive enzyme linked immunosorbent assay and nested-polymerase chain reaction in the detection of caprine

- arthritis-encephalitis virus. *Small Ruminant. Res.* 115: 134-139.
- Hanson, J., E. Hydbring and K. Olsson. 1996. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta. Vet. Scand.* 37: 31-39.
- Herrmann-Hoesing, L. M., W. P. Cheevers, T. C. McGuire, S. D. Adams, M. M. Hutton, W. G. Gavin and D. P. Knowles. 2003. Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 10: 267-271.
- Herrmann-Hoesing, L. M. 2010. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22: 843-855.
- Hullinger, G. A., D. P. Knowles, T. C. McGuire and W. P. Cheevers. 1993. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology* 192: 328-331.
- Keen, J. E., L. L. Hungerford, T. E. Wittum, J. Kwang and E. T. Littledike. 1997. Risk factors for seroprevalence of ovine lentivirus in breeding ewe flocks in Nebraska, USA. *Prev. Vet. Med.* 30(2): 81-94.
- Knowles, D. P., W. P. Cheevers, T. C. McGuire, A. L. Brassfield, W. G. Harwood and T. A. Stem. 1991. Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *J. Virol.* 65(11): 5744-5750.
- Kwang, J., S. Yang, R. A. Juste and A. de la Concha-Bermejillo. 1996. Recognition of ovine lentivirus *gag* gene products by serum from infected sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55(1-3): 107-114.
- Lara, M. C. C. S. H., E. H. Birgel Junior and E. H. Birgel. 2005. Possibility of vertical transmission of caprine arthritis-encephalitis virus in neonate kids. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57: 553-555.
- Leginagoikoa, I., M. Daltabuit-Test, V. A. Ivarez, J. Arranz, R. A. Juste, B. Morena, D. de Andrés, L. L. Luja, J. J. Badiola and E. Berriatua. 2006. Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. *Res. Vet. Sci.* 80: 235-241.
- Leitner, G., O. Krifucks, L. Weisblit, Y. Lavi, S. Bernstein and U. Merin. 2010. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet. J.* 183: 328-331.
- Leroux, C., S. Vuillermoz, J. F. Mornex and T. Greenland. 1995. Genomic heterogeneity in the *pol* region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *J. Gen. Virol.* 76: 1533-1537.
- Leroux, C., C. Lerondelle, J. Chastang and J. F. Mornex. 1997. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet. Res.* 28: 115-121.
- Luengo, C., A. Sánchez, J. C. Corrales, C. Fernández and A. Contreras. 2004. Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. *J. Dairy Res.* 71: 169-174.
- Mackenzie, R., R. Oliver, J. Rooney and H. Kagei. 1987. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in an endemically infected goat herd. *New Zeal. Vet. J.* 35: 184-186.
- Narayan, O., S. Kennedy-Stoskopf, D. Sheffer, D. E. Griffin and J. E. Clements. 1983. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect. Immun.* 4: 67-73.
- Narayan, O. and L. C. Cork. 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats. Chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev. Infect. Dis.* 7: 89-98.
- Payne, S. L and J. H. Elder. 2001. The role of retroviral dUTPases in replication and virulence. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2(4): 381-388.
- Peterhans, E., T. Greenland, J. Badiola, G. Harkiss, G. Bertoni, B. Amorena, M. Eliazewicz, R. Juste, R. Krassnig, J. Lafont, P. Lenihan, G. Petursson, Pritchard, J. Thorley, C. Vitu, J. Mornex and M. Pepin. 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 35: 257-274.
- Pisoni, G., P. Moroni, L. Turin and G. Bertoni. 2007. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology* 369(1): 119-130.
- Reina, R., M. J. Mora, I. Glaria, I. Carcia, C. Solano, L. Lujan, J. J. Badiola, A. Contreras, E. Berriatua, R. Juste, R. Z. Mamoun, M. Rolland, B. Amorena and D. de Andrés, 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of maedi visna and caprine arthritis encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res.* 121(2): 189-198.
- Reina, R., E. Berriatua, L. Lujan, R. Juste, A. Sanchez, D. de Andres and B. Amorena. 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet. J.* 182: 31-37.
- Rimstad, E., N. East, M. Torten, J. Higgins, E. DeRock and N. Pedersen. 1993. Delayed seroconversion following naturally

- acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1858-1862.
- Rimstad, E., N. E. East, E. DeRock, J. Higgins and N. C. Pedersen. 1994. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant *gag* proteins. *Arch. Virol.* 134(3-4): 345-356.
- Rowe, J. D. and N. E. East. 1997. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis encephalitis virus infection. *Rev. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 13: 35-53.
- Rowe, J. D., N. E. East, C. E. Franti, M. C. Thurmond, N. C. Pedersen and G. H. Theilen. 1992. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *Am. J. Vet. Res.* 53: 2396-2403.
- Rowe, J. D., N. E. East, M. C. Thurmond and C. E. Franti. 1991. Risk factors associated with caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on California dairies. *Am. J. Vet. Res.* 2: 510-514.
- Saltarelli, M., G. Querat, D. A. Konings, R. Vigne and J. E. Clements. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179(1): 347-364.
- SAS. 2005. User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA.
- Simard, C. and R. S. Morley. 1991. Seroprevalence of maedi-visna in Canadian sheep. *Can. J. Vet. Res.* 55(3): 69-73.
- Valas, S., C. Benoit, C. Baudry, G. Perrin and R. Z. Mamoun. 2000. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J. Virol.* 74(13): 6178-6185.
- Vigne, R., P. Filippi, G. Querat, N. Sauze, C. Vitu, P. Russo and P. Delori. 1982. Precursor polypeptides to structural proteins of visna virus. *J. Virol.* 42: 1046-1056.
- Zink, M. C., O. Narayan, P. G. Kennedy and J. E. Clements. 1987. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15: 167-180.

Comparsion of ELISA and nested PCR assays for detection of Caprine arthritis encephalitis ⁽¹⁾

Chia-Chieh Chang ^{(2) (3)} and Sheng-Yang Wu ⁽²⁾

Received: Jul. 28, 2015; Accepted: Feb. 2, 2016

Abstract

The objectives of this experiment are to perform CAE (CAE) monitoring using competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and nested polymerase chain reaction (nested PCR) assay Blood samples of 129 Nubian goats from a Taitung goat farm were used for test. CAE antibodies were detected in 71.3% (92/129) of serum samples using ELISA, In the results, the frequency of positive results in 3 to12 mons, 13 to 24 mons and above 24 mons were 77.9% (88/113), 54.5% (6/11) and 0% (0/5), respectively. The frequency of positive results in does and bucks were 72.6% (45/62) and 70.1% (47/67), respectively. There were no correlation between does and bucks in the CAE positive results ($P > 0.05$). DNA samples were extracted from the blood and used nested PCR assay targeting the CAEV proviral *pol* region, then nested PCR results were confirmed by sequence analysis, 97 (75.2%) goats were positive which increased the number of positive animals detected to 5, Kappa statistic showed substantial agreement between ELISA and nested PCR ($\kappa = 0.70$).

Key words: Goat, Caprine arthritis encephalitis, Enzyme linked immunosorbent assay, Nested PCR.

(1) Contribution No. 2352 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Taitung Animal Propagation Station COA-LRI, Taitung, 954, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author, E-mail: janices@mail.tlri.gov.tw.