

山羊關節炎腦炎病毒於公羊精液之監測⁽¹⁾

章嘉潔⁽²⁾⁽³⁾ 吳昇陽⁽²⁾

收件日期：104 年 12 月 23 日；接受日期：105 年 3 月 28 日

摘 要

人工授精為家畜生產性能改良之必要技術；雖然該技術已降低病原傳播風險，仍有研究持續進行確認風險評估，本試驗旨在確認種公羊精液感染山羊關節炎腦炎病毒 (caprine arthritis encephalitis virus, CAEV) 狀況及巢式聚合酶連鎖反應 (nested polymerase chain reaction, nested PCR) 監測技術之建立，以提供控制本病方法之參考。以臺東某羊場所飼養努比亞種羊 13 頭進行檢測，血清樣品採 CAEV/MVV Antibody Test Kit (CHEKIT) 商業套組，酵素結合免疫吸附試驗原理 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 進 CAEV 抗體檢測，另將採集之血液及精液抽取 DNA 進行 nested PCR 檢測。精液樣品經離心分三部分：精漿 (seminal plasma, SP)、非精細胞 (non spermatic cells, NSC) 及精細胞 (spermatozoa, SPZ)，血液與精液樣品利用 nested PCR 檢測 CAEV 之 proviral DNA 片段，結果血清 ELISA CAEV 抗體檢測 10 頭陽性反應，血液樣品 nested PCR CAEV 之 proviral DNA 同樣有一致性檢測出，6 件精液樣品 CAEV proviral DNA 於 SP 及 NSC 分別被檢測出，另於 SPZ 部份 CAEV proviral DNA 均未檢測出，目前檢測 CAEV proviral DNA 存在精液非細胞部分及精漿，這研究證實 CAEV 存在於感染公羊的精液。

關鍵詞：山羊、山羊關節炎腦炎、巢式聚合酶連鎖反應。

緒 言

山羊關節炎腦炎病毒屬反轉錄病毒科 Retroviridae 中之慢病毒 Lentivirus 屬，是一種山羊慢性傳染病 (Peterhans *et al.*, 2004; Reina *et al.*, 2009)。CAEV 主要標的細胞為單核細胞 (monocytes)，病毒會長期滯留而不被其他免疫細胞發現，當感染 CAEV 的單核細胞成為巨噬細胞 (macrophage) 時，CAEV 染色體組才被轉錄 (Zanoni *et al.*, 1990; Gorrell *et al.*, 1992)，故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 (Rimstad *et al.*, 1993; Hanson *et al.*, 1996)。病毒感染可引起關節炎，亦導致慢性間質性肺炎，腦脊髓炎及頑固性乳腺炎等多種不同臨床症狀 (Robinson and Ellis, 1986; Woodard *et al.*, 1982; Zink and Narayan, 1989)，導致產乳量下降、因此嚴重影響養羊業的發展及經濟損失 (Smith and Cutlip, 1988)。

目前已知 CAE 病毒傳染的方式，主要為垂直感染，即 CAE 病毒藉由初乳或乳汁而造成傳播 (Adams *et al.*, 1983; Belanger and Leboeuf, 1993; Rowe and East, 1997)，次要為水平感染，同欄舍羊隻間長期接觸而造成感染 (Phelps and Smith, 1993)，造成傳染確切途徑還不清楚，可能包括直接接觸或經呼吸道分泌物、唾液、尿或糞 (McGuire *et al.*, 1990; Blacklaws *et al.*, 2004; Peterhans *et al.*, 2004; Reina *et al.*, 2009)，研究自然感染公羊證實 CAEV 存在精液及生殖系統 (睪丸、附睪、輸精管) (Andrioli *et al.*, 1999; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008)。學者推論 CAEV 存在精液，可能會經由配種造成病毒傳播 (Andrioli *et al.*, 2006; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008)，精液具潛在病菌存在之風險，且同時將眾多致病微生物保存之中，透過人工生殖技術而擴大影響範圍，引起疫病的暴發流行不可不慎 (Van Rijn *et al.*, 2004)。

因此，如何確保公畜生殖系統及精液安全，特別是種羊進行人工授精應避免精液傳播疾病，診斷監測病毒技術建立必不可少，故建立檢測精液中存在 CAEV proviral DNA，免除病毒的污染是非常必要。PCR 方法不僅可以準確檢測血清陰性動物的 CAEV 感染情況，還可以直接對來自感染山羊的外周血單核細胞、乳汁細胞、滑膜液細胞、位於腦部之細胞，進行 CAEV 核苷酸序列檢測 (Daltabuit *et al.*, 1993; Clavijo and Thorsen, 1996; Extramiana *et al.*, 2002;

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2382 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所臺東種畜繁殖場。

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

De Andres *et al.*, 2005; Adebayo *et al.*, 2010)，如此不僅可排除血清學檢測的不準確性，還增加直接檢測細胞中 CAEV 方法，目前研究先進行確認 CAEV 是否存在於血清陽性公羊精液，使用 ELISA 方式進行公羊血液 CAEV 抗體檢測，和採用 PCR 方式檢測血液、精液樣品之 CAEV proviral DNA，藉此建立 PCR 檢測技術於精液樣品篩檢並評估檢驗方式，做為推動種羊場辦理 CAE 病原清除或建立無 CAE 病原羊群之重要參考依據。

材料與方法

I. 血清樣品採集

採用 13 頭外觀健康無病徵之努比亞種羊年齡約 2 至 4 歲，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. 精液之收集與分離處理

採用 13 頭年齡約 2 至 4 歲之努比亞公羊以假陰道法採取新鮮精液，採集後之精液經離心分三部分：精漿、非精細胞及精細胞。精液以 800 ×g 離心 10 分鐘後，上層懸浮液即為精漿 (seminal plasma, SP)，取出後供後續實驗使用。沉澱部分含非精細胞 (non spermatic cells, NSC) 及精細胞 (spermatozoa, SPZ) 稀釋於 5 ml PBS，於 5 ml Ficoll 濃度梯度 (Ficoll-Paque™ Plus, GH Healthcare, Sweden) 進行分離，離心條件為 500 ×g、30 分鐘，吸取中間雲霧層細胞，將收集的細胞用 PBS 洗滌二次離心收集保存在 -80°C，此部分為 NSC。留下管內沉澱物為 SPZ，PBS 洗滌 700 ×g、10 分鐘，待後續 DNA 提取分析用。

III. 血清中 CAE 抗體評估

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。

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

$$\text{Negative} < 30\%, \text{Suspect} \geq 30 \text{ to } < 40\%, \text{Positive} \geq 40\%$$

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。

IV. CAE 之 nested PCR 檢測

(i) DNA 萃取

ELISA 檢測羊隻進一步採取 3 至 5 mL 全血，於 5 ml Ficoll 濃度梯度 (Ficoll-Paque™ Plus, GH Healthcare, Sweden) 進行分離，離心條件為 500 ×g 30 分鐘，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 cell, PBMC)，將收集的 PBMCs 用 10 mL PBS 洗滌，以 3,000 rpm 離心條件進行細胞收集，完成後再洗滌一次，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 之萃取及純化，之後進行 nested PCR 檢測病毒核苷酸。

(ii) 序列引子設計

所用的 nested PCR 引子的位置是依據 CAEV Cork 的公開序列 (Saltarelli *et al.*, 1990)，引子序列皆由生工公司合成 (MD Bio, Inc., Taiwan)。確認 gag 區域之部份片段，第一組 PCR 使用 CAEV gag 序列引子 P1 (5'-caa gca gca gga ggg aga agc tg-3') 及 P2 (5'-tcc tac ccc cat aat ttg atc cac-3') 預期產物長度 296 bp，第二組 PCR 反應，使用引子序列為 P3 (5'-gtt cca gca act gca aac agt agc aat g-3') 及 P4 (5'-acc ttt ctg ctt ctt cat tta att tcc c-3') 預期產物長度 184 bp，參考 Rimstad *et al.* (1993) 所建立之方法。pol 區域之部份片段，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') 預期產物長度 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') 預期產物長度 153 bp 參考 Travassos *et al.* (1999) 方法。Internal control 檢測參考 Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 之方法確認 human β-actin 區域之部份片段，第一組 PCR 使用 external 序列引子 ES30 (5'-tca tgt ttg aga cct tca aca ccc cag-3')、ES32 (5'-cca ggg gaa ggc ttg aag agt gcc-3')，第二組 PCR 反應，使用 internal 引子序列為 ES31 (5'-ccc cag cca tgtacg ttg cta tcc-3')、ES33 (5'-gcc tca ggg cag cgg aac cgc tca-3') 預期產物長度 393 bp。

(iii) PCR 及電泳

提取 DNA 做為樣品進行 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 (MD Bio, Inc., Taiwan) 0.4 μL (5 U/ μL), 10 \times PCR buffer 5 μL , 10 mM dNTP 1 μL 及 2 dH₂O 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、1min, 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、5min; 94°C、30 sec、52°C、40 sec 與 72°C、45sec, 循環 30 次。電泳分析取 7 μL 產物並加入 2 μL 的 6 \times Loading buffer, 置入 1.5% 瓊脂糖膠片內, 於 1 \times 之 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, 並置於紫外燈箱上觀察紀錄結果。

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 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。

結果與討論

本試驗旨在檢測種公羊精液感染山羊關節炎腦炎病毒狀況及 nested PCR 監測技術之建立, 以提供控制本病方法之參考。血清學評估採 ELISA 方式, 結果 13 頭公羊檢出陽性 10 頭、陰性 3 頭, 另採血樣檢測 CAEV proviral DNA, 結果 13 頭公羊檢出陽性 10 頭、陰性 3 頭, 兩種 CAEV 檢測方式結果呈一致性。進一步公羊採取新鮮精液, 並將精液分為精漿、非精細胞及精細胞等三部分, 透過 nested PCR 進行檢測擴增 CAEV proviral DNA 片段, 資料分析利用 NCBI 進行定序與序列分析證實結果如圖 1 與 2。

```

Query 5   GCATGGCCTCGTGTCTGAGGA-TTTGAA-GGCAGCTGGCATATTATGCCACTACCTGGAC 62
          |||
Sbjct 1027 GCATGGCCTCGTGTCTGAGGACTTTGAAAGGCAGTTGGCATATTATGCTACTACCTGGAC 1086

Query 63   AAGTAAAGATATACTAGAAAGTATTGGCCATGATGCCTGGGAATAGAGCTCAGAAGGAGCT 122
          |||
Sbjct 1087 AAGTAAAGACATACTAGAAAGTATTGGCCATGATGCCTGGAAATAGAGCTCAAAGGAGTT 1146

Query 123   AATTCAAGGGAAATTAAATGCACAAGCAGAA 153
          |||
Sbjct 1147 AATTCAAGGGAAATTAAATGAAGAAGCAGAA 1177

```

圖 1. 山羊 CAEV_{gag} 基因的序列比對。

Fig. 1. Alignment and comparison of goat CAEV *gag*-DNA sequences.

```

Query 28   CAGAAGCACAACTAGGACTTCCTCATCCGGGAGGACTACAAAAGAAAAAACATGTTACCA 87
          |||
Sbjct 2417 CAGAAGCGCAGTTAGGACTCCCGCATCCGGGAGGACTACAAAAGAAAAAACATGTTACAA 2476

Query 88   TATTAGATATAGGAGATGCATATTTTACTATACC 121
          |||
Sbjct 2477 TATTGGACATAGGAGATGCATATTTTACTATACC 2510

```

圖 2. 山羊 CAEV_{pol} 基因的序列比對。

Fig. 2. Alignment and comparison of goat CAEV *pol*-DNA sequences.

檢測公羊精液 13 樣品結果如表 1 所示, 10 頭 CAEV 血清檢測呈陽性反應 (羊號 1 至 10), 和 3 頭 CAEV 血清檢測呈陰性反應 (羊號 11 至 13), 羊號 1、2 精液樣品 CAEV proviral DNA 呈陽性於 SP 及 NSC 部分, 羊號 1 如圖 3 所示, 羊號 3、4 精液樣品 CAEV proviral DNA 呈陽性於 SP, 羊號 5、6 精液樣品 CAEV proviral DNA 呈陽性於 NSC 部分, 羊號 7、8、9、10 精液樣品 CAEV proviral DNA 未檢測出, 另 3 頭血清檢測陰性, 於精液不同部分病

毒均不存在。Andrioli 等採用 nested PCR 證實自然感染公羊的精液 CAEV proviral DNA 存在 (Andrioli *et al.*, 1999)，後續學者檢測病毒存在精液之 NSC 和 SP 部分 (Travassos *et al.*, 1998; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2009)，另於副睪、精液和睪丸、壺腹、水炮、前列腺和尿道球腺均被檢測出 CAEV proviral DNA，證實公畜性器官可能含病毒，並存在於射出之精液 (Peterson *et al.*, 2008)。我們檢測 CAEV proviral DNA 存在精液 NSC 部分，可能是單核細胞 / 巨噬細胞或其他細胞如上皮細胞，攜帶 CAEV proviral DNA 於精液中。相關研究推測 CAEV proviral DNA 存在精液，病毒於體內主要目標細胞為單核細胞及巨噬細胞，這些細胞存在於精液生成過程之生殖組織中，當病毒濃度達足夠濃度即被檢測出 (Narayan *et al.*, 1982, 1983)。另外 CAEV proviral DNA 可以感染其它種類上皮細胞如副睪上皮細胞 (Lamara *et al.*, 2013)，及其他非生殖組織上皮細胞也可被感染 (Barlough *et al.*, 1994; Zink *et al.*, 1990; Mselli-Lakhal *et al.*, 1999)。

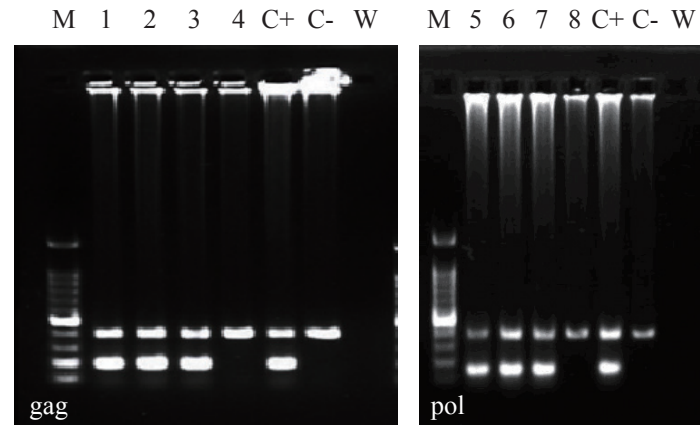


圖 3. 羊號 1 以 nested PCR 方式，進行專一寡核苷酸引子擴增 CAEV184 bp *gag* (1-4)，CAEV153 bp *pol* (5-8) 和 393 bp 的 β 肌動蛋白片段表現。M: 100 bp ladder marker; Lane 1 與 5 為血球細胞; Lane 2 和 Lane 6 精漿為檢測樣品; Lane 3 和 Lane 7 非精細胞部分為檢測樣品; Lane 4 和 Lane 8 精細胞部分為檢測樣品; C+: 陽性對照; C-: 陰性對照; W: 蒸餾水。

Fig. 3. Example 1 of nested PCR using specific sets of oligonucleotide primers to amplify both the 184 bp CAEV *gag* (1-4), 153 bp CAEV *pol* (5-8) and 393 bp β -actin fragments. M: 100 bp Ladder marker. Lane 1, 5: blood cells. Lane 2, 6: seminal plasma Lane 3, 7: non-spermatic cells. Lane 4, 8: spermatozoa. C+: positive control. C-: negative control. W: distilled water.

表 1. 檢測 13 頭公羊外周血單核細胞和精液不同部分之樣品，Nested PCR 分析 CAEV proviral DNA *gag* 和 *pol* 序列 (5 頭 CAEV 血清檢測呈陽性反應 (羊號 1 至 5)，和 3 頭 CAEV 血清檢測呈陰性反應 (羊號 6 至 8))

Table 1. Analysis of peripheral blood mononuclear cells and fractionated semen from 13 bucks (5 CAEV seropositive, 1-5, and 3 seronegative, 6-8) for the presence of CAEV proviral DNA *gag* and *pol* sequence by nested PCR

Buck	Serum	PBMC		NSC		SP		SPZ	
		<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>gag</i>	<i>pol</i>
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	-	+	+	-	-
4	+	+	+	-	-	+	+	-	-
5	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; SP: Seminal plasma; NSC: Non spermatozoa cells; SPZ: Spermatozoa; (+) positive sample ; (-) negative sample.

本實驗結果偵測到 CAEV proviral DNA 存於精液中 SP，目前相關研究對此解釋仍不明確，可能全身或局部病毒感染，病毒顆粒脫落於生殖系統各不同部位，反轉錄病毒屬除 CAEV、人類免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 和貓科免疫缺陷病毒 (feline immunodeficiency virus, FIV) 均於精液非細胞部分檢測出病毒 (Mermin *et al.*, 1991; Hamed *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 1999)。另 10 頭血清檢測陽性，4 頭精液樣本 CAEV proviral DNA 均未檢測出，相同現象於其他文獻感染公羊精液也有未檢出 CAEV proviral DNA (Travassos *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2008)，也有學者證實 CAEV proviral DNA 出現精液呈現間歇性，未必被檢測出 (Andrioli *et al.*, 2006; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Paula *et al.*, 2009)。目前血清檢測呈陽性反應，精液樣品 SPZ 部分 PCR 均未檢出，至今文獻未有顯示在 SPZ 部分 CAEV proviral DNA 被檢測出呈陽性) 樣本公羊精液。推測 CAE 病毒未感染 SPZ 可能副睪蛋白保護所致，這些蛋白質封住 SPZ 穩定其質膜，限制其他逆轉錄病毒的進入細胞基因組和複製，並影響增值及代謝等因素 (Mselli-Lakhal *et al.*, 1999; Payne and Elder, 2001)，但此解釋尚未獲得充分證實，另 Ali Al Ahmad *et al.* (2008) 推測病毒無法感染 SPZ，因缺乏 SPZ 質膜受體，故病毒顆粒無法進入細胞。

CAEV proviral DNA 檢測採樣仍以外周血單核細胞為其主要標的細胞，如檢測乳、精液和滑膜液其他樣品，結果呈現較低的靈敏度、較不具可靠性 (Extramiana *et al.*, 2002; De Andres *et al.*, 2005)。Chebloune *et al.* (1996) 探討 PCR 結果呈明顯可判別片段，至少有 10 個感染細胞存在於 10^6 至 10^7 細胞的樣品中，因此如取樣不足恐影響檢測可信度。另檢測 CAEV 為防引子錯配，而出現假陰性的狀況，PCR 引子設計必須選擇高度保守序列 (Herrmann-Hoesing *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2008)。

CAEV 是由線性單股 RNA 所組成基因，兩端長末端重複序列 (LTR)、結構基因 *gag*、*pol*、*env* 和調控基因 *tat* 和 *rev*，以及輔助蛋白編碼基因 *vif* 所排列組成 (Saltarelli *et al.*, 1990)。*gag* 基因主要編碼病毒套殼蛋白，套殼蛋白可誘導宿主體內強烈的抗體反應，且穩定存在於整個感染過程中，因此常被用來作為診斷試劑主要的病毒抗原 (Kwang *et al.*, 1996)。*pol* 基因位於 *gag* 基因之後，主要編碼病毒核酸轉錄所需蛋白 (Saltarelli *et al.*, 1990)，不同毒株的 *pol* 基因同源性較高，且序列比較發現，*pol* 基因最為保守 (Leroux *et al.*, 1995)。*env* 基因位於 *pol* 基因之後，*env* 基因編碼病毒封套糖蛋白 (envelope glycoprotein or surface protein, SU) p135，及轉移膜蛋白 (transmembrane protein, TM) p42；病毒封套糖蛋白與宿主細胞接觸後，會與宿主細胞的接受體結合而進入到宿主細胞內進行感染 (Hullinger *et al.*, 1993)。*env* 基因比其他基因的序列變異度高 (Knowles *et al.*, 1991)，因此可用來辨認不同分離株的特性與抗原變異性 (Valas *et al.*, 2000)。通常 CAEV 的研究以 *pol* 和 *gag* 基因為目標序列，*pol* 比 *gag* 更為保守，*env* 的變異性最高，在該區出現了較多的核苷酸的插入和缺失。但也有例外，如 Travassos 等以 *env* 基因為目標序列設計的進行檢測，對 15 頭感染羊進行 PCR 檢測，14 頭檢測結果呈陽性率為 93.2%，而從 *gag* 基因為目標序列的檢測 9 頭檢測結果呈陽性率為 60%，顯然 *env* 變異程度很高，但仍然可以作為 PCR 檢測的目標序列 (Travassos *et al.*, 1999)。*pol* 序列設計引子進行 PCR 檢測已感染羊隻，陽性率為 92.8% (Brodie *et al.*, 1992)。Celer *et al.* (1998) 以 *gag* 為目標序列對 68 頭血清學陰性羊進行半巢式 PCR 檢測，結果 62 頭血清學陰性羊 PCR 檢測呈陰性，而 6 隻羊最後被證實是 CAEV 陽性羊；由此可見 PCR 特異性高達 100%，特別是對血清學陰性羊進行的檢測，其結果可信。Travassos *et al.* (1999) 根據 *env* 和 *pol* 基因設計雙重 PCR 檢測精液不同部分，結果出現不一致現象，推測可能與不同基因擴增表現效率有關。而目前檢測結果檢測公羊精液樣品，如表 1 所示 6 頭精液樣品 CAEV proviral DNA 呈陽性於 SP 及 NSC 部分，以 *pol* 和 *gag* 基因為目標序列均被檢測出，並無不一致狀況。

目前相關文獻皆清楚表明，生殖器官可能藏有病毒並存在於精液，造成精液具傳染性，不論於實驗和自然感染的公羊，強烈暗示精液造成病毒傳播是可能的；但透過配種接觸所造成 CAEV 傳染、存在於精液或能夠引發感染的病毒量在文獻中仍無確切數據。但學者仍強調人工授精危險性，透過感染 CAEV 精液人工授精，實驗證實母畜仍感染病毒 (Andrioli *et al.*, 1999; Paula *et al.*, 2009)，主因於人工授精進行配種，精液濃縮更具高濃度的感染顆粒，和缺乏天然的屏障如子宮頸和陰道分泌物保護 (Eggert-Kruse *et al.*, 2000)，病毒深入子宮頸或子宮內，如透過腹腔鏡人工授精更深入子宮腔內，完全繞過宿主防禦；另外，透過人工授精技術，許多母畜可與單一公羊精液進行授精配種，更加重傳染風險，故加強公畜生殖系統健康監測，以及定期進行精液檢測於人工授精程式前是必要 (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008)。洗滌公羊精液可有效降低病毒量，但並未徹底消除精液中之病毒。精液仍具污染，直接影響生殖器官、血液和組織中 (Andrioli *et al.*, 2006)。最後，透過配種造成 CAEV 傳染風險似乎很低，儘管研究表明該病毒存在精液，至今仍太少的研究可得明確的結論 (Blacklaws *et al.*, 2004; Reina *et al.*, 2011)。本研究已完成使用 CAEV 序列設計特異性引子，測定 CAEV 序列存在於血液、精液之樣品，並結合相關研究討論，加強對 CAEV 特性的研究，監測技術與產業結合，才能加強根除本疾病之效益。

誌 謝

本試驗承行政院農業委員會科技計畫 (103 農科 -2.6.1- 畜 -L1 及 104 農科 -2.6.1- 畜 -L1) 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

- 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.
- Adebayo, I. A., O. D. Olaleye and T. A. Awoniyi. 2010. Affinity (tropism) of caprine arthritis encephalitis virus for brain cells. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 39: 89-93.
- Ali Al Ahmad, M. Z., F. Fieni, J. L. Pellerin, F. Guiguen, Y. Cherel, G. Chatagnon, A. B. Bouzar and Y. Chebloune. 2008. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology* 69: 473-480.
- Andrioli, A., A. M. G. Gouveia, R. R. Pinheiro, M. A. Rocha, A. S. Martins and D. O. Santos. 1999. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 23: 420-421.
- Andrioli, A., A. M. G. Gouveia, R. R. Pinheiro, A. S. Martins and D. O. Santos. 2006. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pes. Agropec. Bras.* 41: 1313-1319.
- Barlough, J., N. East, J. D. Rowe, K. Van Hoosear, E. Deock, L. Bigornia and E. Rimsted. 1994. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods* 50: 101-114.
- Bélanger, D. and A. Leboeuf. 1993. CAE virus seroprevalence in a mixed goat herd. *Vet. Rec.* 133: 328-332.
- 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: 199-208.
- Brodie, S. J., L. D. Pearson, G. D. Snowden and J. C. De Martini. 1992. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Arch. Virol.* 130: 413-428.
- Celer Jr, V., V. Celer, H. R. Nemcova, R. Zanoni and E. Peterhans. 1998. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *Zentralbl. Veterinarmed.* 45: 183-188.
- Chebloune, Y., D. Sheffer, B. M. Karr, E. Stephens and O. Narayan. 1996. Restrictive type of replication of Ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* 222: 21-30.
- Clavijo, A. and J. Thorsen. 1996. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Rumin. Res.* 22:69-77.
- Cruz, J. C. M., A. M. G. Gouveia, K. C. Souza, G. F. Braz, B. M. Teixeira, M. B. Heinemann, R. C. Leite, J. K. P. Reis, R. R. Pinheiro and A. Andrioli. 2009. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Ruminant Res.* 85: 149-152.
- Daltabuit Test, M., A. de la Concha-Bermejillo, L. E. Espinosa, E. Loza Rubio and A. Aguilar Setién. 1993. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can. J. Vet. Res.* 63: 212-215.
- 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.
- Eggert-Kruse, W., I. Botz, S. Poh, G. Rohr and T. Strowitzki. 2000. Antimicrobial activity of human cervical mucus. *Human Reprod.* 15: 778-784.
- Extramiana, A. B., L. González, N. Cortabarría, M. García and R. A. Juste. 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Ruminant Res.* 44: 109-118.
- Gorrell, M. D., M. R. Brandon, D. Sheffer, R. J. Adams and O. Narayan. 1992. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *J. Virol.* 66: 2679-2688.
- Hamed, K. A., M. A. Winters, M. Holodniy, D. A. Katzenstein and T. C. Merigan. 1993. Detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen: Effects of disease stage and nucleoside therapy. *J. Infect. Dis.* 167: 798-802.

- Hanson, J., E. Hydrbring 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., G. H. Palmer and D. P. Knowles. 2007. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. *Virology* 362: 226-34.
- 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.
- Jordan, H. L., Y. Liang, L. C. Hudson and W. A. Tompkin. 1999. Shedding of Feline immunodeficiency virus in semen of domestic cats during acute infection. *Am. J. Vet. Res.* 60: 211-215.
- 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: 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: 107-114.
- Lamara, A., F. Fieni, G. Chatagnon, M. Larrat, L. Dubreil and Y. Chebloune. 2013. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 397-404.
- 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.
- McGuire, T. C., K. I. O'Rourke, D. P. Knowles and W. P. Cheevers. 1990. Caprine arthritis encephalitis lentivirus transmission and disease. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 160: 61-75.
- Mermin, J. H., M. Holodniy, D. A. Katzenstein and T. C. Merigan. 1991. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 164: 769-772.
- Mselli-Lakhal, L., F. Guiguen, C. Fornazero, D. Jian, J. Favier Durand, D. Grezel, S. Balleydier, J. F. Mornex and Y. Chebloune. 1999. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology* 259: 67-73.
- Narayan, O., J. S. Wolinsky, J. E. Clements, J. D. Strandberg, D. E. Griffin and L. C. Cork. 1982. Slow viruses replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goat. *J. Gen. Virol.* 59: 345-56.
- 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.
- Payne, S. L. and J. H. Elder. 2001. The role of retroviral dUTPases in replication and virulence. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2: 381-388.
- Paula, N. R. O., A. Andrioli, J. F. S. Cardoso, R. R. Pinheiro, F. M. L. Sousa, K. C. Souza, F. S. F. Alves, C. C. Campello, A. R. F. Ricarte and M. F. S. Teixeira. 2009. Profile of the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Ruminant Res.* 85: 27-33.
- 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.
- Peterson, K., J. Brinkhof, D. J. Houwers, B. Colenbrander and B. M. Gadella. 2008. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 69: 433-442.
- Phelps, S. L. and M. C. Smith. 1993. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203: 1663-1666.
- 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.
- Reina, R., I. Galaria, S. Cianca, H. Crespo, X. de Andrés, C. Goñi, J. M. Lasarte, L. Luján, B. Amorena and D. F. de Andrés. 2011. Use of small ruminant lentivirus-infected rams for artificial insemination. *Vet. J.* 189: 106-107.
- 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.
- Robinson, W. F. and T. M. Ellis. 1986. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. *Aust. Vet. J.* 63: 237-241.
- 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.
- 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: 347-364.
- Smith, M. C. and R. Cutlip. 1988. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193: 63-67.
- Travassos, C., C. Benoît, S. Valas, A. da Silva and G. Perrin. 1998. Detection of caprine arthritis encephalitis virus in sperm of experimentally infected bucks. *Vet. Res.* 29: 579-584.
- Travassos, C., C. Benoît, S. Valas, A. da Silva and G. Perrin. 1999. Caprine arthritis encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Res.* 32: 101-106.
- Valas, S., C. Benoît, C. Baudry, G. Perrin and R. Z. Mamoun. 2000. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J. Virol.* 74: 6178-6185.
- Van Rijn, P. A., G. I. Wellenberg, R. Hakze-van der Honing, L. Jacobs, P. L. Moonen and H. Feitsma. 2004. Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative RealTime PCR technology. *J. Virol. Methods* 120: 151-160.
- Woodard, J. C., J. M. Gaskin, P. W. Poulos, R. J. MacKay and M. J. Burrige. 1982. Caprine arthritis-encephalitis: clinicopathologic study. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2085-2096.
- Zanoni, R., U. Pauli and E. Peterhans. 1990. Detection of caprine arthritis encephalitis and maedi-visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia* 46: 316-319.
- Zink, M. C. and O. Narayan. 1989. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Virol.* 63: 2578-2584.
- Zink, M. C., J. A. Yager and J. D. Myers. 1990. Pathogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am. J. Pathol.* 136: 843-854.

Detection of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen of bucks ⁽¹⁾

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

Received: Dec. 23, 2015; Accepted: Mar. 28, 2016

Abstract

Artificial insemination (AI) is essential to improve animal production performance. Although it greatly reduces the risk of pathogen transmission, some studies have been performed to quantify this risk. The aims of this experiment were to perform caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) monitoring in semen, and to use a screening method named nested polymerase chain reaction (nested PCR) as a reference for the control of CAE. Blood samples of thirteen Nubian goats from a Taitung goat farm were used for test. The collected serum were evaluated for anti CAEV antibodies using a commercially available ELISA kit (Chekit ® CAEV/MVV, Liebefeld Bern, Switzerland). The DNAs were extracted from the blood and semen, and used nested PCR for viral detection. Semen samples were collected and separated into three distinct fractions: seminal fluid (SF), enriched non spermatozoa cell (NSC) and spermatozoa (SPZ). Nested PCR was used to detect the presence of CAEV proviral DNA in the blood and semen. Ten CAEV seropositive bucks were positive for nested PCR CAEV proviral DNA but only six semen samples were positive for CAEV DNA in non-spermatogenic cells and seminal plasma. No CAEV proviral DNA was identified in the spermatozoa fraction. The presence of CAEV proviral DNA in non spermatogenic cells and seminal plasma. This study clearly demonstrates the presence of proviral DNA in naturally infected caprine semen.

Key words: Goat, Caprine arthritis-encephalitis, Nested PCR.

(1) Contribution No. 2382 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.