



## Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelectrotransferencia

## Immunoelectrotransference detection of antibodies against caprine arthritis encephalitis virus (CAEV)

Emiliano Tesoro Cruz\*.\* \*  
Rafael Hernández González\*  
Alejandro Martínez Rodríguez\*\*\*  
Hugo Ramírez Álvarez\*\*\*  
María Elena Trujillo Ortega†  
Roberto Kretschmer Schmid\*\*  
Álvaro Aguilar Setián\*\*

### Abstract

Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is present in Mexico, but its precise prevalence and incidence remains unknown. In order to evaluate the use of immunoelectrotransference or western blot (WB) for the detection of anti-caprine arthritis encephalitis virus antibodies in goats, 50 random serum samples from indigenous animals were analyzed (25 from Amazcala, Queretaro and 25 from Cuatitlan, State of Mexico), and compared with the ELISA. Animals were considered positive for WB when at least a single protein was codified by the *gag* genes simultaneously with another gene: *env/pol*; the same criteria used for HIV/AIDS detection. Five antigen-antibody bands (12, 14, 25, 50 and 135 kDa) were considered reliable diagnostic markers. When ELISA was used, 33 sera were positive, and 17 were negative. All 33 ELISA-positive sera were also WB positive. Of the 17 negative ELISA-sera samples, nine were positive and eight were negative by WB. There is a significant correlation between ELISA and WB serological tests ( $P < 0.0003$ ). The WB had greater sensitivity than ELISA since it detected eight more positive sera. These results indicate that WB is a useful tool for confirmatory diagnosis of CAEV, as has been the case with VIH/AIDS in Mexico.

**Key words: CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS, WESTERN BLOT, ELISA.**

### Resumen

En México la artritis encefalitis caprina (AEC) está presente, pero se ignora la frecuencia y prevalencia. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la técnica de inmunoelectrotransferencia o *western blot* (WB) para la detección de anticuerpos anti-VAEC en sueros caprinos. Se evaluaron 50 sueros de cabras nativas seleccionadas al azar (25 de Amazcala, Querétaro, y 25 de Cuautitlán, Estado de México) por ensayo inmunoenzimático (ELISA) y WB. El criterio de positividad para WB fue el propuesto por la OMS para el diagnóstico de VIH/sida (identificación de al menos una

Recibido el 23 de julio de 2002 y aceptado el 30 de octubre de 2002.

\* Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Av. Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, 14000, México, D.F.

\*\* Unidad de Investigación en Inmunología Médica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720, México, D.F.

\*\*\* Departamento de Virología, FES-Cuautitlán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Teoloyucan km 2.5 s/n Cuautitlán de Romero Rubio C-4, CP 54700, Cuautitlán, Estado de México, México

† Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.



proteína codificada por el gen *gag* simultánea con otra codificada por el gen *env* o *pol*). Los sueros positivos revelaron cinco proteínas de interés diagnóstico, con pesos moleculares de 12, 14, 25, 50 y 135 kDa. De los 50 sueros, 33 resultaron positivos y 17 negativos por ELISA. De los 33 positivos, todos resultaron también positivos por WB. Por otra parte, de los 17 negativos mediante ELISA, nueve fueron positivos y ocho negativos por WB. Se encontró una correlación entre ambas pruebas serológicas ( $P < 0.0003$ ). WB resultó tener mayor sensibilidad que el ELISA ya que detectó ocho sueros más. El WB podría ser una herramienta útil para el diagnóstico confirmatorio de la AEC en México.

**Palabras clave:** VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA, INMUNOTRANSFERENCIA, ELISA.

## Introduction

Caprine arthritis encephalitis (CAE), caused by a *Lentivirinae* retrovirus (caprine arthritis encephalitis virus, CAEV)<sup>1,2</sup> is a chronic and progressive illness that causes weakness and decreased milk production in infected goats.<sup>1</sup> The CAEV has tropism for monocytes and macrophages, and is very closely linked, both genetically and antigenically, with the ovine progressive pneumonia virus (OPPV), also referred to as the *maedi-visna* virus (MVV),<sup>3,4</sup> another member of the *Lentivirinae* genus.<sup>1</sup> The lentivirus genome is composed of at least three structural genes: *gag*, *pol* and *env*. The *gag* gene codes for three internal viral proteins: capsid (CA), nucleocapsid (NC) and matrix protein (MP). The *pol* gene codes for the viral enzymes: reverse transcriptase (RT), integrase (IN) and protease (PR). The *env* gene codes for the transmembrane (TM) and superficial (SU) glycoproteins.<sup>5,6</sup>

In 1980, Crawford *et al.*<sup>1</sup> isolated the CAEV in the United States and in 1990 Saltarelli *et al.*<sup>7</sup> characterized the viral genome. In Mexico, CAEV was identified in 1998 by Leyva *et al.*<sup>8</sup> and the virus was first isolated in 1999 by Daltabuit *et al.*<sup>9</sup> CAE has worldwide distribution, with the greatest prevalence being found in developed countries.<sup>7</sup> Epidemiologic studies carried out in the United States found a seroprevalence fluctuating between 31% and 81%.<sup>10,11</sup> In developing countries, there is little epidemiologic information in this regard. In Mexico, a study carried out by Nazara *et al.*<sup>12,13</sup> using double immunodiffusion, found a CAE seroprevalence between 17 and 35% in imported goats, while in autochthonous goats serology tests were negative. Another study by Leyva *et al.*<sup>8</sup> carried out on 60 goats with clinical signs compatible with CAE, demonstrated positivity using radio immunodiffusion, and, in two of the 60 goats, histopathology and immunohistochemistry studies were done. However more studies are needed to calculate the incidence of the disease.

Goats acquire CAE during the neonatal period.<sup>14</sup> The principal transmission route is through colostrum and milk ingestion from diseased goats, but

## Introducción

La artritis encefalitis caprina (AEC) es una enfermedad crónica y progresiva que causa debilidad y disminución de la producción láctea en cabras infectadas<sup>1</sup> provocada por un retrovirus del género *Lentivirinae* (virus de artritis encefalitis caprina, VAEC).<sup>1,2</sup> El VAEC es un virus con tropismo para monocitos y macrófagos, está estrechamente relacionado tanto genética como antigénicamente con el virus de neumonía progresiva ovina (VNPO), también llamado virus de *visna maedi* (VVM)<sup>3,4</sup> que también es un retrovirus del género *Lentivirinae*.<sup>1</sup> El genoma de los lentivirus está conformado al menos por tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para tres proteínas internas del virus: cápside (CA), nucleocápside (NC) y proteína de matriz (MA). El gen *pol* codifica para las enzimas virales: transcriptasa reversa (TR), integrasa (IN) y proteasa (PR). El gen *env* codifica para la glicoproteína transmembranal (TM) y para la de superficie (SU).<sup>5,6</sup>

En 1980, Crawford *et al.*<sup>1</sup> aislaron el VAEC en Estados Unidos de América y en 1990 Saltarelli *et al.*<sup>7</sup> caracterizaron el genoma del virus. En México fue identificado el VAEC en 1998 por Leyva *et al.*<sup>8</sup> y el primer aislamiento se notificó en 1999 por Daltabuit *et al.*<sup>9</sup> La AEC tiene distribución mundial con una mayor prevalencia e incidencia en países desarrollados.<sup>7</sup> En estudios epidemiológicos realizados en EUA, se informó de una seroprevalencia que fluctuó entre 31% y 81%.<sup>10,11</sup> En países en vía de desarrollo existe poca información epidemiológica al respecto. En México en un estudio realizado por Nazara *et al.*<sup>12,13</sup> mediante la técnica de inmunodifusión doble se encontró una seroprevalencia de la AEC de entre 17% y 35% en cabras importadas, en tanto que en cabras autóctonas la serología fue negativa. Otro estudio realizado por Leyva *et al.*<sup>8</sup> en 60 cabras con semiótica clínica sugerente de AEC demostraron su positividad por la técnica de inmunodifusión radial, y en dos de las 60 cabras estudiadas se realizaron estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos. Sin embargo, faltan más estudios que permitan conocer la incidencia.

Las cabras adquieren AEC durante el periodo neonatal.<sup>14</sup> La forma principal de transmisión se realiza a través de la ingestión de calostro y leche de cabras enfermas,

horizontal transmission through physiologic secretions cannot be discarded.<sup>14,15</sup> Immunologic diagnosis is done using ELISA.<sup>16</sup> Goats infected with the CAEV remain seropositive throughout their lives given that the infectious mechanism is characterized by integrating the viral genome in the host's genome, and thus the lentivirus makes use of the host's cellular machinery for its own replication, making infected animals a continuous source of infection for susceptible animals<sup>17,18</sup> and making eradication possible only through elimination of the seropositive animals.

The clinical signs of the disease are mainly: encephalomyelitis in kids from two to four months of age (occasionally leukoencephalomyelitis),<sup>19</sup> arthritis and mastitis in goats older than 12 months of age.<sup>5,20</sup> As of yet there is no efficacious vaccine for the control of CAE. As such the detection of seropositive animals by reliable serological methods is of the utmost importance so as to maintain disease-free herds. Immunoelectrotransference or western blot (WB), a serologic technique which allows for the detection of antibodies directed against different viral proteins which are separated according to their molecular weight,<sup>21</sup> is the gold standard for diagnostic validation of other illnesses, such as HIV/AIDS.<sup>22,23</sup> The objective of this study was to evaluate whether WB is a more sensitive and specific technique than ELISA for the detection of anti-CAEV antibodies in goat sera.

## Material and methods

### Goat sera

Fifty randomly-selected mixed breed goats from farms located in Amazcala, in the state of Queretaro and from Cuatitlan, State of Mexico (15 females and 10 males from each farm, with ages ranging from 1.5 to 2.5 years), were used. Blood was obtained by jugular venipuncture, centrifuged at 800 *g* for five minutes to obtain serum, and conserved frozen (-20°C) prior to testing.

### Serological tests

ELISA was used to diagnose CAEV and MVV.\* The kit contained microplaques with inactivated CAEV/MVV antigen and an anti-IgG goat or sheep conjugate marked with peroxidase. Testing was carried out as per manufacturer's instructions. WB testing was done using the technique employed for the diagnosis of HIV/AIDS,<sup>22,23</sup> which was slightly modified to adapt it to test CAEV.

pero no se descarta la vía horizontal por secreciones fisiológicas.<sup>14,15</sup> El ELISA es la técnica que se usa para diagnóstico inmunológico.<sup>16</sup> Las cabras infectadas con el VAEC permanecen seropositivas de por vida ya que el mecanismo de infección de los lentivirus se caracteriza por integrar su genoma al genoma del hospedero, de esta forma los lentivirus aprovechan la maquinaria del hospedero para su replicación, de tal manera que los animales infectados se convierten en un continuo foco de infección para animales susceptibles<sup>17,18</sup> y para fines de erradicación se podría pensar en la eliminación de animales seropositivos.

Los signos clínicos de la enfermedad son principalmente: encefalomyelitis en cabritos de dos a cuatro meses de edad (ocasionalmente leucoencefalomyelitis),<sup>19</sup> artritis y mastitis en cabras mayores de 12 meses.<sup>5,20</sup> Aún no se dispone de una vacuna eficaz para el control de la AEC. Como consecuencia de lo anterior la detección de los animales infectados mediante pruebas serológicas confiables resulta primordial para mantener a los hatos libres de esta enfermedad. La inmunoelectrotransferencia o *western blot* (WB), técnica serológica que permite la detección de los anticuerpos dirigidos contra las diferentes proteínas del virus, separadas según su peso molecular,<sup>21</sup> es el estándar ideal para la validación del diagnóstico serológico en otras enfermedades como el VIH/sida.<sup>22,23</sup> El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la técnica de WB es más sensible y específica que el ELISA para la detección de anticuerpos anti-VAEC en sueros caprinos.

## Material y métodos

### Sueros caprinos

Se seleccionaron 50 cabras criollas al azar procedentes de explotaciones situadas en Amazcala, Querétaro, y Cuatitlán, Estado de México (15 hembras y diez machos de cada explotación; las edades de las cabras fluctuaron entre 1.5 y 2.5 años). La sangre se obtuvo por punción de la vena yugular y se centrifugó a 800 *g* durante cinco minutos para obtener el suero, que fue conservado en congelación (-20°C) hasta el momento de realizar las pruebas.

### Pruebas serológicas

Se utilizó ELISA para el diagnóstico de VAEC y VVM.\* El estuche contiene microplacas provistas con el antígeno inactivado VAEC/VVM y un conjugado anti-IgG de cabra o borrego marcado con peroxidasa. La técnica se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las pruebas de WB se hicieron siguiendo la técnica empleada para el diagnóstico del VIH/sida,<sup>22,23</sup> la cual fue adaptada para el VAEC con algunas modificaciones.

\* Chekit VAEC/VVM; Boehringer®.

The CAEV strain\* used was that characterized by Saltarelli *et al.*<sup>7</sup> This was replicated in primary cultures of  $5 \times 10^5$  cells/ml of goat synovial membrane cells (GSMC,  $5 \times 10^5$  cells/ml), cultured in Dulbecco modified Eagle media (DMEM) (50 ml)\*\* with bovine fetal serum,\*\*\* penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 mg/ml and 2mM of L-glutamine.<sup>9</sup> Cells were grown to monolayer on an 80 cm<sup>2</sup>† flat-bottomed flask, and were then infected when there was a monolayer with 100% confluence. The virus suspended in the supernatants was harvested 15 days after infection and semipurified by ultracentrifuge (51 000 g/2 h) through a 20% saccharose matrix. The button obtained was resuspended in 200ml of lysis-buffer solution (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton-X and 1% deoxycolic acid) and 200ml of sample buffer solution (3.2 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerol, bromophenol blue and 0.8 ml of bidistilled water). 50ml (2mg protein/ml) (Bradford reactive)‡ of the viral suspension were placed per polyacrilimide (SDS, PAGE 3%) gel (8 × 7 cm) with 5 ml of the molecular weight marker† and proteins were run at 60 V for 1 h.

Antigens were transferred to a nitrocellulose membrane† (*sandwich*), in which the middle part contained the gel, while on either side there were nitrocellulose membranes along with three sheets of blotting paper, o with a glass sheet on each side of the gel. The *sandwich* obtained was wrapped in adherent plasticoo and aluminum paper.ooo The package was placed beneath approximately 12 kg of weight and left for three days at room temperature.

Following the transferal of the viral proteins, the nitrocellulose membranes were blocked with bovine albumin (3% in PBS / 37°C / 1 h / constant agitation) and cut in 3 mm wide strips. Each strip was incubated with 25 ml of sample serum diluted in 1 ml of buffering solution (PBS with 0.2 % Tween 20 plus 1% bovine albumin), for 1 h at 37°C and constant agitation. Next, peroxidase-marked goat anti-IgG§ was added to each nitrocellulose strip (1:1000) (37°C/1h / constant agitation). 0.05% diaminobenzidene§ in PBS and 0.05% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were used as revealers.

The criterion for WB positivity was the same as that used for the diagnosis of AIDS (identifying at least one protein coding for the *gag* gene while simultaneously coding for the *env* or *pol* gene).<sup>22,23</sup> Two positive and one negative sera were run simultaneously as controls. The positive sera were from a goat experimentally-infected with CAEV<sup>9</sup> and from the CAEV double immunodiffusion diagnosis kit.\* The negative serum was from a goat which had not been allowed to drink colostrum and had remained in isolation at the CENID-INIFAP from birth.

Se utilizó el VAEC de la cepa,\* la cual fue caracterizada en 1990 por Saltarelli *et al.*;<sup>7</sup> se replicó en cultivos primarios  $5 \times 10^5$  células/ml de células de membrana sinovial de cabra (CMSC,  $5 \times 10^5$  células/ml), cultivadas en medio Eagle (50 ml) modificado por Dullbeco (DMEM)\*\* adicionado de suero fetal bovino\*\*\* penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 mg/ml y 2 mM de L-glutamina.<sup>9</sup> Dichas células crecen formando una monocapa sobre el piso de una botella de plástico de 80 cm<sup>2</sup> † que se infectan cuando se obtiene un monoestrato 100% confluyente. El virus suspendido en los sobrenadantes del cultivo fue cosechado 15 días después de la infección y semipurificado por ultracentrifugación (51 000 g/2 h) a través de un colchón de sacarosa al 20%. El botón obtenido fue resuspendido en 200 ml de solución amortiguadora de lisis (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 1% tritón X-100 y 1% ácido deoxicólico) y 200 ml de solución amortiguadora de muestra (3.2 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 4 ml SDS 10%, 2 ml glicerol, azul de bromofenol y 0.8 ml de agua bidestilada). Se depositaron 50 ml (2 mg proteína /ml) (reactivo de Bradford)‡ de la suspensión viral para cada gel (8 × 7 cm) de poliacrilamida (SDS, PAGE 3%) y 5 ml del marcador de peso molecular† corriendo las proteínas durante 1 hora a 60 v.

Los antígenos se transfirieron a membrana de nitrocelulosa† (*sandwich*), en la parte central se colocó el gel y en ambos lados las membranas de nitrocelulosa más tres hojas de papel *blotting* y un vidrio en cada cara del gel. El *sandwich* obtenido se envolvió con un plástico adherenteooo y con papel de aluminio.oo Sobre el paquete se colocó un peso de aproximadamente 12 kg y se dejó durante tres días a temperatura ambiente.

Después de la transferencia de las proteínas virales, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con albúmina bovina (3% en PBS/37°C/1 hora/en agitación) y cortadas en tiras de tres milímetros de ancho. Cada tira se incubó con 25 ml del suero problema diluido en 1 ml de solución amortiguadora (PBS con Tween 20 al 0.2% más 1% de albúmina bovina), durante una hora en agitación a 37°C. Posteriormente, a cada tira de nitrocelulosa se le agregó anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa§ (1:1000) (37°C/1 hora/en agitación). Para el revelado se preparó una solución de diaminobencidina§ al 0.05% en PBS y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 0.05 %.

El criterio de positividad para WB fue el mismo que se utiliza en el diagnóstico de sida (identificación de al

\* COATCC, 1991.

\*\* In vitro SA. México, DF. México.

\*\*\* Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA.

† Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA.

‡ Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA.

o Beckman blotters, USA.

oo Ega pack®.

ooo Alu pack®.

§ Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA.

## Statistical analysis

Results were analyzed using a Chi-squared test.<sup>24</sup>

## Results

Of the 50 goat sera evaluated using ELISA\*\* 33 were positive, while 17 were negative (Table 1).

The molecular weights of the antigens of the positive electrophoretic pattern of CAEV were 12, 14, 19, 25, 32, 50, 62, 71, 90 and 135 kDa. The 12, 14, 25, 50 and 135 kDa bands correspond to viral proteins. The antigens encoded by the *gag* gene correspond to 12 kDa nucleocapsid (NC), 14 kDa matrix (MA) and 25 kDa capsid (CA) proteins, while those encoded by the *env* gene correspond to the 50 kDa transmembrane (TM) and 135 kDa superficial (SU) proteins. The antigens recuperated most frequently were those weighing 12, 14, 25, 50 and 135 kDa (Figure 1).

The 33 sera that were positive through ELISA were also positive by WB, while of the 17 negative sera by ELISA, nine were positive by WB (Figure 2) (Table 1). Chi-squared analysis showed that there is a correlation between ELISA and WB tests ( $P < 0.0003$ ).

## Discussion

The results obtained in the present study show that ELISA produces some false negative results. Using WB, eight of the 17 negatives were detected as positive; this proves that WB has greater sensitivity than ELISA, detecting 84% of the positive goats, whereas ELISA only detected 66%. In addition, the WB strips showed the presence of proteins specific for the *gag* (12, 14 and 25 kDa) and *env* (50 and 135 kDa) genes in all the positive sera, thus indicating 100% specificity for WB. The 90, 71 and 62 kDa bands, which are not

menos una proteína codificada por el gen *gag* simultánea con otra codificada por el gen *env* o *pol*).<sup>22,23</sup> En la misma corrida de los sueros problema se probaron dos sueros positivos y uno negativo de referencia como testigos. Los sueros positivos procedían de una cabra infectada experimentalmente con VAEC<sup>9</sup> y de un estuche para el diagnóstico del VAEC por inmunodifusión doble.\* El suero negativo provenía de una cabra a la que se le impidió tomar calostro y que permaneció en aislamiento en el CENID-INIFAP desde su aparición.

## Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Ji cuadrada.<sup>24</sup>

## Resultados

De los 50 sueros caprinos evaluados por ELISA,\*\* 33 resultaron positivos y 17 negativos (Cuadro 1).

Los pesos moleculares de los antígenos del patrón electroforético positivo del VAEC fueron de 12, 14, 19, 25, 32, 50, 62, 71, 90 y 135 kDa. Las bandas de 12, 14, 25, 50 y 135 kDa corresponden a proteínas virales. Los antígenos codificados por el gen *gag* corresponden a proteínas de nucleocápside (NC) de 12 kDa, de matriz (MA) de 14 kDa y cápside (CA) de 25 kDa, en tanto que los codificados por el gen *env* corresponden a la proteína transmembranal (TM) de 50 kDa y de superficie (SU) de 135 kDa. Los antígenos revelados con mayor frecuencia fueron los de 12, 14, 25, 50 y 135 kDa (Figura 1).

Los 33 sueros que resultaron positivos mediante ELISA también resultaron positivos por WB, en tanto que de los 17 sueros negativos por ELISA, nueve pre-

\* Caprine arthritis encephalitis/ovine progressive pneumonie antibody test kit, Veterinary Diagnostic Technology, USA.

\*\* Chekit VAEC/VVM; Boehringer®.

**Cuadro 1**  
RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA Y WESTERN BLOT (WB)  
RESULTS OBTAINED USING ELISA AND WESTERN BLOT TECHNIQUES

|    |       | Elisa | Elisa |    |
|----|-------|-------|-------|----|
| WB | +     | 33    | 9     | 42 |
| WB | -     | 0     | 8     | 8  |
|    | Total | 33    | 17    | 50 |

$\chi^2 = P < 0.0003$

specific for CAEV, were detected with less frequency, and, since these are easily distinguished by WB using molecular weight, they do not interfere with the test's specificity. These results indicate that WB is a better diagnostic technique than either ELISA or double immunodiffusion. Furthermore, since CAEV is a lentivirus, it is generally quite difficult to demonstrate its presence; therefore, the presence of specific bands corresponding to viral genes confirms infection, such as occurs when WB is used to confirm HIV/AIDS infection.<sup>22</sup>

WB has been used frequently to confirm the diagnosis of the visna virus, and its use in Iceland was instrumental in eradicating this disease, when used in conjunction with drastic epidemiological vigilance.<sup>5</sup> In industrialized countries such as France, the US and Switzerland, among others, CAE acquired economic and management importance, reaching prevalence indexes and frequencies of up to 81% in milk producing goat herds.<sup>10,11,14</sup>

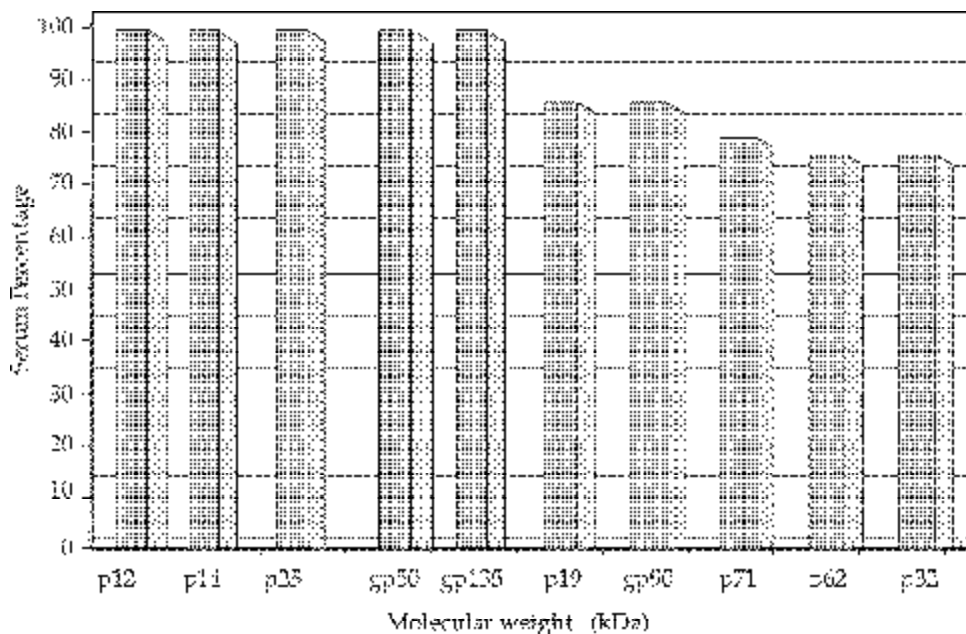
In Mexico, where goats are imported for genetic improvement, the prevalence of CAE is highest in imported goats, followed by local goats who are contact with imported goats, while it is low to non-existent in local goats that are not in contact with imported animals.<sup>12</sup> Currently there is no efficacious vaccine for use in the control of CAE. It is therefore very important to use trustworthy serological tests when attempting to detect infected animals. This is key in protecting herds that are still free of CAE, and thus these tests should be applied to all animals that will be joining a susceptible herd.

sentaron positividad por WB (Figura 2) (Cuadro 1). Por medio de la prueba de Ji cuadrada se demostró que existe una correlación entre las pruebas de ELISA y WB ( $P < 0.0003$ ).

## Discusión

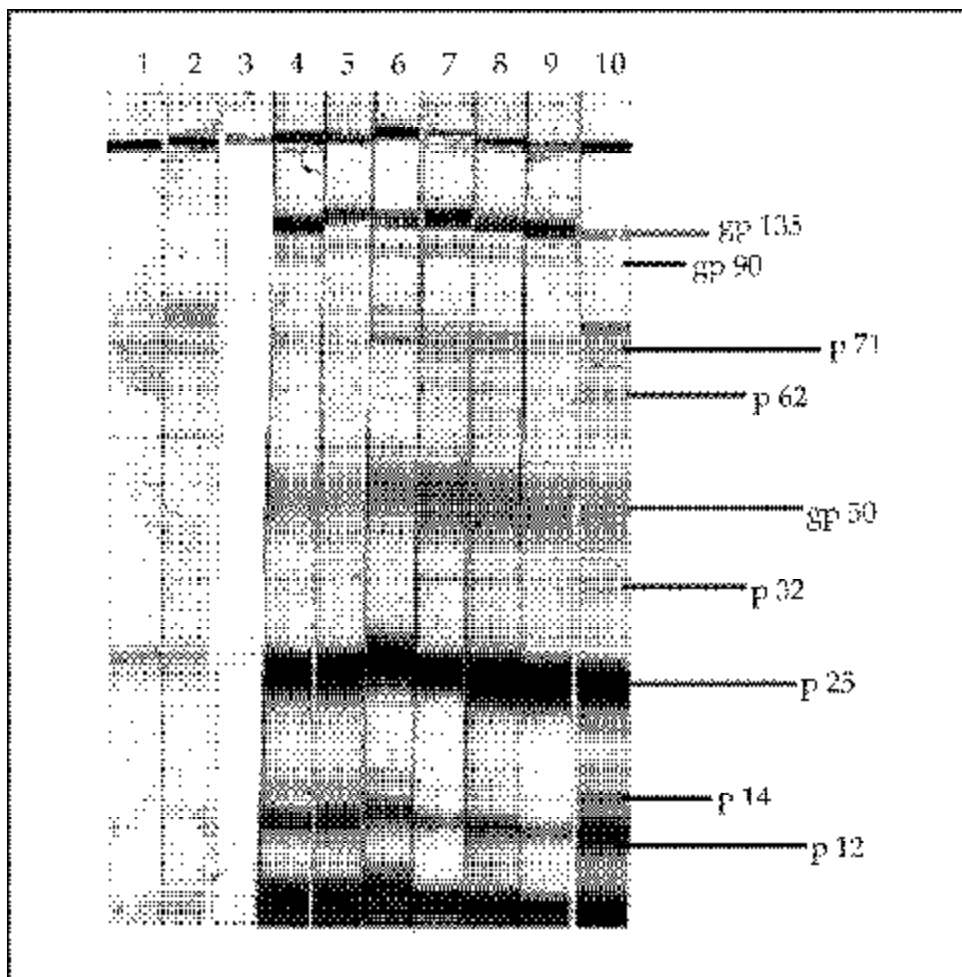
Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que el ELISA dio resultados falsos negativos. Con la prueba de WB, ocho de los 17 negativos fueron detectados como positivos; esto comprueba que el WB tiene mayor sensibilidad que el ELISA, ya que detectó 84% de las cabras positivas y el ELISA detectó 66%. Adicionalmente las tiras de WB mostraron la presencia de las proteínas específicas del *gag* (12, 14 y 25 kDa) y del gen *env* (50 y 135 kDa) en todos los sueros positivos, lo que indica que la especificidad del WB fue de 100%. Las bandas de 90, 71 y 62 kDa, que no son específicas del VAEC, fueron las que se detectaron con menor frecuencia, y, como se pueden discernir fácilmente en el WB por su peso molecular, no interfieren con la especificidad de la prueba. Estos resultados indican que el WB es una mejor técnica diagnóstica que el ELISA y que la inmunodifusión doble. Por otro lado, debido a que el VAEC es un lentivirus, por lo general no es posible demostrar su presencia, así que la presencia de bandas específicas de los principales genes del virus confirma que las cabras están infectadas, como sucede con el WB que se utiliza para la confirmación de enfermos con VIH/sida.<sup>22</sup>

El WB ha sido utilizado con frecuencia para confirmar el diagnóstico del virus visna, cuya utilización en Islandia



**Figura 1.** Porcentaje de reconocimiento de las proteínas del virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) en WB con 42 sueros positivos de caprinos.

Percentage recognition of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proteins using WB in 42 positive caprine sera.



**Figura 2.** Sueros representativos (positivos y negativos) contra artritis encefalitis caprina (CAEV). 1, 2 y 3 son negativos, 4 a 10 son positivos. Representative caprine positive and negative sera against caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). One, two and three WB strips are negatives and from four to ten are positives.

Furthermore, ELISA produces false negative results which could put at risk the healthy animals in a herd and alter eradication or protection programs for CAE-free herds. It would be highly recommendable to use a test with greater sensitivity and specificity, such as WB.

At the time of sampling none of the goats in the study had signs of arthritis or any other sign seen with CAE, despite these animals being adults between 1.5 to 2.5 years of age. This suggests that the CAEV which circulates in the areas studied could be of low pathogenicity. Highly detailed molecular and cellular level studies would be necessary to allow the characterization of strains or Mexican variants involved, as well as to determine the similarities and differences with American and European strains that have already been characterized.<sup>25-28</sup> These types of studies would clarify whether the CAEV found in Mexico originated in other countries or whether it was present before massive imports began (in the 1980's). Studies by Nazara *et al.*<sup>12,13</sup> found CAE seropositivity between 17% and 35% in imported goats,

contribuyó a erradicar esta enfermedad debido a estas pruebas y a una drástica vigilancia epidemiológica.<sup>5</sup> En países industrializados, como Francia, EUA, Suiza, entre otros, la AEC adquirió importancia económica y zootécnica, además de que se registraron índices de prevalencia y frecuencia de hasta 81% en hatos de cabras lecheras.<sup>10,11,14</sup>

En México se importa ganado caprino para programas de mejoramiento genético, la prevalencia de la AEC es alta en los animales importados, seguida por la de los animales locales que estén en contacto con los importados, pero es baja o inexistente en las cabras locales que no están en contacto con los importados.<sup>12</sup> En la actualidad no se dispone de una vacuna eficaz para el control de la AEC, por ello la detección de los animales infectados que son sometidos a pruebas serológicas es confiable, ello es de primordial importancia para proteger a los hatos que aún quedan libres de la AEC por lo que estas pruebas deben aplicarse a todo animal que se pretenda incorporar al hato susceptible. Además, el ELISA da resultados los falsos negativos que podrían poner en riesgo de infección a los animales sanos del hato y alterar programas de erradicación o de protección de hatos libres de la AEC; por

whereas autochthonous goats were not seropositive. However, the test used in that study was agarose gel double immunodiffusion (AGDI)<sup>29</sup> which is less sensitive than WB.<sup>21-23</sup>

## Acknowledgements

The authors would like to thank Amalia Barquet MC from the "Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos" of the "Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos" and Dr. Diego Arenas Monrroy of the "Unidad de Investigación Médica en Genética" at the "Instituto Mexicano del Seguro Social" for their help. This study was financed by the "Coordinación de Investigación" at the "Instituto Mexicano del Seguro Social", project number 0038/765.

## Referencias

1. Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 1980;207:997-999.
2. Narayan O, Cork LC. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev Inf Dis* 1985;7:89-98.
3. Gogolewski R, Adams DS, McGuire TC, Banks KL, Cheevers WP. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J Gen Virol* 1985;66:1233-1240.
4. Ellis TM, Wilcox GE, Robinson WF. Antigenic variation of caprine arthritis-encephalitis virus during persistent infection of goats. *J Gen Virol* 1987;68:3145-3152.
5. Murphy F, Gibbs E, Horzinek M, Studdert M. *Veterinary virology*. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego (Ca); Academic Press, 1999.
6. Tesoro CE. Estudio de relaciones inmunológicas entre el virus de artritis encefalitis caprina (VAEC) y el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Ciencias. UNAM, 2001.
7. Saltarelli M, Quetat G, Konings DAM, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 1999;179:347-364.
8. Leyva GVH, Martínez RHA, González RG, Cornejo CMA, Rosales ME, Garrido FG *et al*. Identificación del virus de la artritis encefalitis caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México. *Rev Latinoam Microbiol* 1998;40:33-38.
9. Daltabuit TM, De la Concha BA, Espinosa LEL, Loza RE, Aguilar SA. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can J Vet Res* 1999;63:212-215.
10. Crawford TB, Adams DS. Caprine arthritis encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *Am J Vet Med Assoc* 1981;178:713-719.
11. Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Sacks JM, Weaver AL. Prevalence of antibody to caprine arthritis - encephalitis virus in goats in the United States. *Am J Vet Med Assoc* 1992;200: 802-805.

tanto, será recomendable usar una prueba de mayor sensibilidad y especificidad como el WB.

En el momento del muestreo ninguna de las cabras estudiadas presentó signos de artritis u otro propio de la AEC, a pesar de que estos animales eran adultos y su edad fluctuaba entre 1.5 y 2.5 años. Este hecho sugiere que el VAEC que circula en los lugares estudiados podría ser de baja patogenicidad. Será necesario realizar estudios minuciosos a nivel molecular y celular que permitan una caracterización fina de las cepas o variantes mexicanas involucradas, así como determinar las similitudes y diferencias con las cepas americanas y europeas que ya se han caracterizado.<sup>25-28</sup> Con esta clase de estudios se podría aclarar si el VAEC que se encuentra en el territorio nacional proviene de otros países o si ya existía desde antes de las importaciones masivas (década de los ochenta del siglo pasado), ya que en los estudios realizados por Nazara *et al*.<sup>12,13</sup> se encontró una seropositividad de la AEC de entre 17% y 35% en cabras importadas, en tanto que en cabras nacionales la serología fue negativa. Sin embargo, la prueba empleada en el estudio fue inmunodifusión doble en geles de agarosa (AGID)<sup>29</sup> que tiene menor sensibilidad que el WB.<sup>21-23</sup>

## Agradecimientos

Se agradece a Amalia Barquet, de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, y al Dr. Diego Arenas Monrroy, de la Unidad de Investigación Médica en Genética, Instituto Mexicano del Seguro Social, por su asistencia. Este trabajo se realizó con financiamiento de la Coordinación de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, número 0038/765.

12. Nazara CS, Trigo FJ, Suberbie E. Estudio serológico de la artritis encefalitis caprina en México. *Téc Pec Méx* 1985;48:9-18.
13. Nazara CS, Trigo FJ, Suberbie E, Madrigal U. Estudio clínico patológico de la artritis encefalitis caprina en México. *Rev Vet Méx* 1985;16:91-100.
14. Petursson G, Hoff-Jorgensen R. *Developments in veterinary virology "maedi-visna and related diseases"*, 2<sup>nd</sup> ed. (CA, USA) Kluwer Academic Publishers, 1990.
15. Martinez HA, Ramirez H, Tortora PJJ, Montaraz CJA. Detection of antibodies in seminal liquid of animals infected with goat arthritis encephalitis by western blotting. *International Conference and Workshop on Animal Retroviruses Memories*; September 3-6 2000; Queens' College, Cambridge (UK). Cambridge, UK, 2000.
16. Schroeder BA, Oliver RE, Cathcart A. The development and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat sera. *NZ Vet J* 1985;33:213-215.
17. Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* 1989; 70:1617-1639.



18. Wilkerson MJ, Davis WC, Baszler TV, Cheevers WP. Immunopathology of chronic lentivirus - induced arthritis. *Am J Pathol* 1995;146:1433-1443.
19. Cork LC, Hadlow WJ, Crawford TB, Gorham, JR, Piper RC. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J Inf Dis* 1974;129:134-141.
20. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carloson JL, McGuire TC, Gorham JR. Transmission and control of caprine arthritis - encephalitis. *Am J Vet Res* 1983;44:1670-1675.
21. Zaroni R, Krieg A and Peterhans. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by the protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J Clin Microbiol* 1989; 27:580-582.
22. Dodd RY, Fang CT. The western immunoblot procedure for HIV antibodies and its interpretation. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:240-245.
23. World Health Organization. Guidelines for biological safety cabinets. AIDS No 9 Geneva, Switzerland: WHO, 1992.
24. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Basic and clinical biostatistics. 2<sup>nd</sup> ed. Norwalk, (Co): Appleton & Langue, 1994.
25. Sonigo P, Alizon M, Staskus K, Klatzmann D, Cole S, Danos O, *et al*. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 1985;42:369-382.
26. Braun MJ, Clements JE, Gonda MA. The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the env gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *J Virol* 1987;61:4046-4054.
27. Querat G, Audoly G, Sonigo P, Vigner R. Nucleotide sequence analysis of SA - OMVV, a visna related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 1990;175: 434-447.
28. Sargan DR, Bennet ID, Cousens C, Roy DJ, Blacklaws BA, Dlaziel RG, Watt NJ, McConnel I. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi - visna virus. *J Gen Virol* 1991;72:1893-1903.
29. Knowles DP, Evermann JF, Shropshire C, Vanerschalie J, Bradway D, Gezon HM, Cheevers WP. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis -encephalitis virus. *J Clin Microbiol* 1994;32:243-245.