

DIAGNÓSTICO DE SITUACIÓN DE ARTRITIS-ENCEFALITIS CAPRINA EN PEQUEÑOS Y MEDIANOS ESTABLECIMIENTOS DE PRODUCCIÓN CAPRINA

Angeloni, Franco¹, Marengo, Rafael², Moore, Karen³, Orcellet, Viviana⁴

¹ Alumna Becaria Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. (FCV-UNL)

² Alumno. FCV. UNL

³ Docente de Zoología, Diversidad y Ambiente. FCV.UNL

⁴ Docente Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Genética Veterinaria y Mejoramiento Animal. FCV.UNL

Director: Recce, Sebastián

Codirectora: Peralta, Andrea Verónica

Área: Ciencias de la Salud

Palabras clave: Artritis-Encefalitis, cabras, retrovirus.

INTRODUCCIÓN

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) es una enfermedad producida por un virus de la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*. Este virus se integra al ADN de los monocitos y, por lo tanto, las secreciones que tengan estos elementos serán las más infecciosas; los animales infectados se convierten en portadores crónicos. La vía de transmisión láctea es una de las más importantes por lo que la mayoría de los animales se infectan de forma temprana, al beber calostro o leche infectados. El virus también se puede propagar durante el contacto cercano, por aerosoles mediante la vía respiratoria, por vía venérea a través de los leucocitos infectados que se encuentran en el semen y en menor medida es también posible la transmisión vertical a través de la vía intrauterina. Tanto los animales que presentan síntomas como los que no, pueden transmitir este virus. La mayoría de las infecciones con AEC son asintomáticas pero una vez que aparecen los signos clínicos, la enfermedad es progresiva y, por lo general, mortal. El virus afecta especialmente cuatro tejidos en las cabras: el articular, el glandular mamario, el pulmonar y el tejido nervioso. Debido a esto, las presentaciones clínicas son cuadros de artritis crónica (deformante y progresiva que afecta principalmente las articulaciones del carpo y del tarso, pero también de las articulaciones interfalángicas y coxal), mastitis (produciendo mastitis intersticial con fibrosis), neumonía y fenómenos nerviosos. Las formas nerviosas se ven en general en las cabras muy jóvenes, entre los dos y cuatro meses, y conllevan dificultades para mantenerse en pie y encefalitis, llegando incluso hasta la muerte.

Título del proyecto: Producción Caprina: una alternativa para el desarrollo sustentable de pequeños y medianos productores en el centro-norte de Santa Fe (Código Trámite: 50120150100058LI).

Año de convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director: Orcellet, Viviana

- ción
científica.
- Adoptar una actitud crítica en el aprendizaje, generosa en la enseñanza, y solidaria en el trabajo.

- Determinar la prevalencia de Artritis Encefalitis Caprina en pequeños y medianos productores de los departamentos San Cristóbal y 9 de Julio de la provincia de Santa Fe.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la investigación se realizaron dos muestreos, uno correspondiente al hato caprino de la Facultad de Ciencias Veterinarias donde se muestrearon 16 animales y otro donde se extrajo sangre a 40 cabras (38 hembras y 2 machos), ambos ubicados en el Departamento Las Colonias. En el establecimiento se realizó una pequeña encuesta diseñada para arribar a una información general del sistema productivo. Las muestras se tomaron de establecimientos pequeños a medianos de subsistencia, donde las cabras se alimentan a base de pastura natural con el uso de suplementación estratégica en momentos en los que no se cuenta con la cantidad suficiente de alimento en las praderas naturales. Luego de realizada la encuesta se extrajeron entre 5 a 10 ml sangre con anticoagulante de cabritos y cabras (machos y hembras) de la vena yugular con aguja y jeringa estériles.



Las muestras de sangre entera fueron enviadas al Instituto de Biotecnología (IB) del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA)-INTA Castelar. En dicho Centro se realizó la extracción de ADN a la fracción de glóbulos blancos con el fin de detectar el ADN proviral (si lo hubiera) mediante la realización de la PCR-Anidada desarrollada por Grego y col 2007 que amplifica una región de 800pb que comprende la mayor parte del gen gag y el comienzo del gen pol. Se eligió el uso de esta PCR-anidada porque es capaz de detectar y amplificar el ADN proviral de los genotipos A y B (genotipos mayoritarios de AEC).

Las muestras provenientes del primer hato caprino fueron procesadas empleando el método de la Proteínasa K para realizar la extracción de ADN. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2000rpm por 20 minutos donde se recuperó la capa de glóbulos blancos. Dicha capa fue re suspendida en 5ml de buffer de lisis (RBC) en tubos eppendorf y centrifugada nuevamente a 2000rpm por 10 minutos. Este paso fue repetido hasta que el pellet de glóbulos blancos se observara lo más limpio y libre de glóbulos rojos posible. Al obtener un pellet limpio se realizó el lavado con 1ml de buffer fosfato salino (PBS) y se lo dispuso en un nuevo tubo eppendorf, llevando al mismo a centrifugar a 1800rpm por 10 minutos. Una vez realizado esto, se adicionó 500 microlitros de buffer de proteínasa K y 10 microlitros de proteínasa K (a una concentración de 10mg/ml) dejándolos reposar por una hora y media en termobloque a 56°C con shaker. A continuación, se realizó una extracción de ácidos nucleicos con un solvente orgánico. Se recuperó el sobrenadante y se lo colocó en 300 microlitros de isopropanol dispuestos en un tubo eppendorf para realizar la precipitación de ADN. Esto fue centrifugado a 10000rpm por 20 minutos. Posteriormente se quitó el sobrenadante, se adicionaron 100 microlitros de etanol 70% y se centrifugó a 10000rpm por 5 minutos. Una vez realizado este paso se desechó el sobrenadante y los pellets se secaron a 37°C. Una vez secos, el pellet de ADN (en muchos casos se trabajó a ciegas ya que no se observó pellet), se resuspendió en 50ul de agua suplementada con ARNasa a (0,2ul de una concentración 10mg/ml).y se llevó a secar a cámara de 37°C.

[Escribir texto]

Con el fin de visualizar la calidad y estimar la cantidad del ADN extraído, se preparó el gel de agarosa 1% y se realizó la siembra de una fracción de las muestras de ADN que fue sometida a electroforesis a 80 volts por 25 minutos.

Lamentablemente, las 16 muestras que se procesaron mediante el método de la Proteinasa K la mayoría presentó una lisis defectuosa, probablemente por una insuficiente cantidad de buffer de lisis o de proteinasa K, solamente se pudo obtener ADN de 2 animales.

Las muestras provenientes del segundo establecimiento (40 muestras) fueron procesadas de otra manera. Se seleccionaron 7 muestras que rindieron mayor cantidad de células blancas y que dividió en dos tubos eppendorfs para evaluar la extracción de ADN con dos protocolos: método de Proteinasa K y el método Dellaporta (sin solventes orgánicos y sin Proteinasa K. Se observó una extracción de ADN más exitosa utilizando el método Dellaporta por lo tanto, el resto de las muestras fueron procesadas utilizando este protocolo.

RESULTADOS PRELIMINARES

Del total de las 40 muestras procesadas (provenientes del segundo establecimiento), se obtuvieron resultados positivos para 15 muestras siendo todas pertenecientes a hembras y 2 muestras dieron como resultado un débil positivo, 16 resultaron negativas a la prueba de Nested-PCR siendo 14 de estas correspondientes a hembras y 2 a machos de 10 meses. Las 7 muestras restantes no se pudieron analizar a través de Nested-PCR debido a que en algunas de ellas la sangre extraída presentó hemólisis y no se pudo recuperar suficiente cantidad de células blancas mientras que en otras muestras se obtuvo una escasa cantidad de ADN.

CONCLUSIÓN

Los resultados positivos a la Nested-PCR confirman los datos serológicos obtenidos hace una década atrás en la provincia de Santa Fe y demuestran la presencia del virus a pesar de no detectarse animales con sintomatología clínica.

BIBLIOGRAFÍA

Dillon, M. J. H., Rossi, A. G. L., Ferro, M. J. L., Zenobi, M. C., & Toledo, J. R. MANUAL DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO SEROLOGICO PARA MAEDI VISNA y ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA (AEC).

Robles, C. A., Layana, J. A., Cabrera, R. F., Raffo, F., & Cutlip, R. (2003). Estudio serológico retrospectivo de Maedi (Neumonía Progresiva) en ovinos y de Artritis-Encefalitis en caprinos de Patagonia, Argentina. REVISTA DE MEDICINA VETERINARIA-BUENOS AIRES-, 84(3), 96-99.

Vet. Arg. – Vol. XXXIV – Nº 353 – Septiembre 2017. Trezeguet, M.A.; Gallardo, I.C.R., Debenedetti, R; Barral, L.; Suarez, M.; Rodriguez Eugui, J.; Bonastre, P.; Fabeiro, M.; Balette, C.I.; Grave, E; Rodriguez Gordillo, E.; Rossi, S.; Zapata, E; Valdes, G.; Boatti, A.; Ydiart, P. C.; Anselmi, G.; Videla Paez; E.; Periolo, F.; Rodriguez, C.; Maidana, C.

[Escribir texto]

Extramiana, A. B., González, L., Cortabarría, N., García, M., & Juste, R. A. (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 Research*, 44(2), 109-118.

Reina, R., Berriatua, E., Luján, L., Juste, R., Sánchez, A., de Andrés, D., & Amorena, B. (2009). Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *The Veterinary Journal*, 182(1), 31-37.

Mussi, J. M. S., Gouveia, A. M. G., Cortez, A., Pereira Lage, A., Guimarães, A. D. S., & Bryan Heinemann, M. (2015). Use of serological diagnostic techniques in the control and eradication of caprine arthritis encephalitis: an update. *Braz. j. vet. res. anim. sci*, 52(4), 283-297.